



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI**

PAULA VIRGÍNIA DE VASCONCELOS SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE
INFECÇÕES VIRAIS BASEADOS EM ELETRODOS
QUIMICAMENTE MODIFICADOS**

**RECIFE-PE
2014**

PAULA VIRGÍNIA DE VASCONCELOS SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE
INFECÇÕES VIRAIS BASEADOS EM ELETRODOS
QUIMICAMENTE MODIFICADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Co-orientador: Dr. Gustavo Alves do Nascimento

**RECIFE-PE
2014**

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

Souza, Paula Virgínia de Vasconcelos

Desenvolvimento de biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados / Paula Virgínia de Vasconcelos Souza. – Recife: O Autor, 2014.

124 f.: il.

Orientadores: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior; Gustavo Alves do Nascimento

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2014.

Inclui referências

1. Viroses 2. Diagnostico microbiológico 3. Papilomavírus 4. Dengue I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orient.) II. Nascimento, Gustavo Alves do (coorient.) III. Título.

616.91

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-205

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE
INFECÇÕES VIRAIS BASEADOS EM ELETRODOS
QUIMICAMENTE MODIFICADOS**

**Tese de Doutorado elaborada por:
PAULA VIRGÍNIA DE VASCONCELOS SOUZA**

**Aprovada em 30 de junho de 2014
BANCA EXAMINADORA**

Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
(Presidente)

Dr. José Luiz de Lima Filho
(Membro Titular)

Dr. Gustavo Alves do Nascimento
(Membro Titular)

Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
(Membro titular)

Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo
(Membro titular)

Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
(Membro suplente)

Dr. Roberto Afonso da Silva
(Membro suplente)

AGRADECIMENTOS

- À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB/CCB), em especial Adenilda Eugênia.
- Aos professores Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior e ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho pelo apoio e dedicação, proporcionando a realização do meu trabalho.
- Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) que forneceu todo suprimento físico e material, principalmente os Laboratórios: Biotecnologia (Biossensores), Bioquímica e Microscopia (LIKA/AGGEU).
- Às agências de fomento CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro, essencial à realização do estudo.
- Aos amigos Gustavo Alves do Nascimento (co-orientador), Rafaella Nascimento, Mízia Sabóia, Natália Oliveira e Caio Dias que caminharam sempre ao meu lado.
- Às professoras Danyelly Bruneska e Rosângela Ferreira Frade de Araújo pelo auxílio e sugestões na Banca de Qualificação.
- Ao IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) por ceder generosamente amostras biológicas de Papilomavírus Bovino.
- Aos meus pais, Carlos Queiróz de Souza (*in memorian*) e Vânia de Vasconcelos Gico, meu incentivou a cada dia com muita dedicação e amor.
- À toda minha família, irmãos, madrinha, tias e primos e principalmente meus queridos sobrinhos Helena Vasconcelos (afilhada) e Evan Gico, que me inspiram muito com seus sorrisos e renovam o meu ser.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Revisão de literatura

- Figura 1** - Organização genômica de BPV-1: genes virais E1, E2, E4, E5, E6, E7, L2, L1, região longa de controle (LCR) e regiões intergênicas19
- Figura 2** - Ilustração microscópica da infecção pelo papilomavírus e expressão dos genes BPV E5 e E7 em epitélio cutâneo.....20
- Figura 3** - Árvore filogenética provável com base em sequências de nucleotídeos L1 de PVs. Compreende 12 tipos de BPV e isolados do Brasil dos gêneros *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus* e *Xipapillomavirus*21
- Figura 4- a)** Esquema dos principais locais de infecção do BPV; **b)** Exemplos de infecções em tetas e úberes.....22
- Figura 5-** Distribuição mundial do risco de Dengue - relatórios combinados da OMS e do Centro de controle e prevenção de doenças nos EUA.....27
- Figura 6-** Representação esquemática do vírus da Dengue e seu genoma.....29
- Figura 7-** Esquema de funcionamento e componentes de um sistema biossensor.....33
- Figura 8** - (a) Sinal de excitação da VC. (b) Representação de voltametria cíclica típica, representando os parâmetros obtidos com esta técnica: (I_{pa}) corrente de pico anódica, (I_{pc}) corrente de pico catódica, (E_{pa}) potencial de pico anódico e (E_{pc}) potencial de pico catódico, potencial de inversão (E_i)36
- Figura 9- a)** Medição de Sinal na voltametria de pulso diferencial (ΔE) corrente livre de ruído **b)** Gráfico comparativo: (1) voltametria de pulso diferencial e (2) voltametria de pulso normal.....37
- Figura 10-** Esquema representativo de genossensor. A hibridização entre sonda e alvo ocorre na camada de reconhecimento do transdutor.....39
- Figura 11-** Principais Estratégias de Imobilização: (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) encapsulamento e (e) afinidade.....40

Figura 12- a) Sonda de DNA dentro do nanoporo da membrana; b) Membrana funcionalizada por grafeno e ssDNA imobilizado visto de cima.....	44
Figura 13- Sistema biossensor eletroquímico de DNA e o mecanismo de detecção de hibridação a partir de PCR.....	45
Figura 14- Esquema de funcionamento de genossensor baseado em membrana de alumina	45
Figura 15- Estrutura química dos polímeros condutores mais utilizados.....	48
Figura 16- Esquema geral de genossensores baseados em polímeros condutores.....	48
Figura 17- Estrutura geral da PANI.....	49
Figura 18- Esquema de transferência de elétrons no eletrodo polimerizado por PANI em biossensor amperométrico.....	50
Figura 19- Representação do princípio de funcionamento de biossensores baseados em polímeros funcionalizados com DNA.....	50
Figura 20- Representação esquemática da imobilização e hibridização do DNA no ERGNO/PANI/GCE	52
Figura 21- Estrutura do biossensor PANINT–IL/chitosan/AuNP SPE	53
Figura 22- Ilustração esquemática de aptasenor eletroquímico baseado em nanocompósitos GR-PANI	53
Figura 23 Representação esquemática da detecção eletroquímica de hibridização de DNA baseado em nanopartículas de platina combinado com MWNTs	57

Capítulo II

Artigo Científico I

Figura 1- Estrutura química da polianilina.....81

Figura 2- Esquemas de imobilização e reação em eletrodos revestidos por polímeros de grupos amino reativos respectivamente.....83

Capítulo III
Artigo Científico II

Fig. 1. Schematic representation of the fabrication genosensor.....	97
Fig. S1. SEM pictures of (A) AAO membrane (B) AAO-PANI-GLUT (C) AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe electrode at 10 KX.....	100
Fig. 2. Electrochemical characterization by successive differential pulse voltammetry of AAO electrode at different stages of the experiment: AAO; AAO-PANI; AAO-PANI-GLUT; AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe (10 μ M). Conditions: potential range -1.0 V to 1.5 V performed with a scan rate of 100 mVs ⁻¹ and amplitude modulation of 50 mV.....	101
Fig. 3. Differential pulse voltammograms obtained by comparing AAO polymerized electrode and unpolymerized polyaniline: AAO-PANI-GLUT-BPV_probe (10 μ M); AAO-GLUT-BPV_Probe (10 μ M). Conditions: potential range 0.8 V to 1.2 V performed with a scan rate of 100 mV s ⁻¹ and amplitude modulation 50 mV.....	103
Fig. 4. Differential pulse voltammograms for the guanine oxidation signal on AAO-PANI-GLUT-BPV_probe (10 μ M) electrode hybridized with different BPV target concentrations: (a) 0.0625 μ M; (b) 0.125 μ M; (c) 0.25 μ M; (d) 0.50 μ M and (e) 1 μ M. Conditions: potential range 0.8 V to 1.2 V performed with a scan rate of 100 mVs ⁻¹ and amplitude modulation 50 mV. Inset represents the linear regression at a concentration range of 0.0625 – 0.5 nM.....	104
Fig. 5. Differential pulse voltammograms for the guanine electrochemical oxidation of (a) bare electrode AAO-PANI-GLUT; (b) 10 μ M BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT after hybridization with 1 μ M BPV target; (c) 10 μ M BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT after hybridization with 46.90 μ g/mL sample of extracted viral DNA from blood bovine; (d) 10 μ M BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT after hybridization with 1 μ M non-complementary sequence; (e) 10 μ M BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT. Conditions: potential range 0.8 V to 1.2 V performed with a scan rate of 100 mVs ⁻¹ and amplitude modulation 50 mV.....	105

Capítulo IV

Artigo Científico III

Figura 1. (A) TEM images of synthesized AuNRs; (B) UV-vis absorption spectrum of synthesized AuNRs.....117

Figura 2. Scheme for the preparation of anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate. Inset: UV-vis absorption spectra of (a) synthesized AuNRs, (b) Cys-modified AuNRs, and (c) anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate.....117

Figura 3. (A) Cyclic voltammograms of PPy-PPa films electrochemically deposited on the SPE surface at different Py:Pa ratios: (a) 50/50; (b) 60/40; (c) 70/30; and (d) 80/20 (%). (B) Effect of the Py ratio on the sensor response.....118

Figura 4. Schematic illustration of the stepwise preparation of the immunosensor. Inset: Cyclic voltammograms of the immunosensor for each immobilization step: (a) bare SPE; (b) PPy-PPa/SPE; (c) anti-NS1-Cis-AuNR/PPy-PPa/SPE; and (d) Glycine/anti-NS1-Cis-AuNR/PPy-PPa/SPE. Scans performed in 5 mmol L⁻¹ of K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆, at a scanning rate of 0.05 V s⁻¹119

Figura 5. Comparison of responses for NS1 without and with AuNR.....120

Figure 6. (A) Cyclic voltammograms of immunosensor in different NS1 concentration; (B) Calibration curve.....121

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1- Imunossensores para detecção de anticorpos anti-NS1.....	32
Tabela 2- Principais técnicas de imobilização de biomoléculas.....	41
Tabela 3- Principais referências de eletrodos baseados em membranas AAO.....	46
Tabela 4- Principais referências de genossensores baseados em polianilina (PANI).....	54

Capítulo II

Tabela 1- Principais referências de genossensores baseados em polianilina (PANI).....	87
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔE - Amplitude de pulso
 $\Delta R_{ct}(\%)$ -valor da transferência de carga
AAO- Membrana de Alumina Anódica
ADMA- dimetilarginina
Ag/AgCl- prata/cloreto de prata
Au- Ouro
AuNP- Eletrodo de ouro
AuNR- Nanobastões de ouro (*Nanorods*)
BDC-AVIDINA– Complexo biotina-estreptavidina
BPV- Papilomavírus Bovino
DENV- Vírus da Dengue
DNA- Ácido desoxirribonucleico
dNTPs -Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA- *double strand* DNA (fita dupla)
EI- potencial de inversão
EIS- Espectroscopia de impedância
Epa- potencial de pico anódico
Epc- potencial de pico catódico
Fmol- Femtomol
FT-IR- Espectroscopia infra Vermelho
GCE- Eletrodo de carbono vítreo
GLUT- Glutaraldeído
GNPs- Nanopartículas de ouro
GR/ ERGNO- Grafeno
HHFAu- Microesferas de ouro
HPV- Papilomavírus humano
Ipa- corrente de pico anódica
IPA- Instituto Agrônomo de Pernambuco
Ipc- corrente de pico catódica
ITO- Indium tin-oxide
LOD- Limite de detecção
MB- azul de metileno

MEV/SEM- Microscopia eletrônica de varredura

MWNT/ CNT- Nanotubos de carbono

nanoSPAN- nanofibras de polianilina

PANI- Polianilina

PATP- monocamada p-aminotiofenol

PCs- Polímeros condutores

PNA- Ácido nucleico peptídico

PPy- Polipirrol

PVs- Papilomavírus

RNA- Ácido Ribonucléico

RT-PCR- Reação polimerase em cadeia

S₁- Corrente capacitiva

S₂- Corrente faradáica

SA – ácido esteárico

SCE- eletrodo saturado de calomelano

ssDNA- *single strand* DNA (fita simples)

UV-Vis- Espectroscopia ultravioleta-visível

VC/CV- Voltametria cíclica

VOQ/SWV- Voltametria de onda quadrada

VPD/DPV- Voltametria de pulso diferencial

RESUMO

Os métodos de diagnósticos clínicos convencionais, para detecção de infecções virais, geralmente demandam tempo, alto custo, reagentes e equipamentos laboratoriais. Os biossensores voltamétricos são excelentes alternativas de detecção viral, pois apresentam grande praticidade, rapidez, portabilidade, baixo custo e alta sensibilidade. Eletrodos quimicamente modificados (EQM) por polímeros condutores (poliacetileno, polianilina, polipirrol e politiofeno), são bastante sensíveis, com grande potencial de aplicação, constituindo excelentes alternativas para melhorar o desempenho de um sensor. Tais polímeros são constituídos por ligações duplas conjugadas que são responsáveis pelo aumento de condutividade. O objetivo deste estudo foi o desenvolver métodos diagnósticos *label-free* para detecção dos vírus papilomavírus bovino (BPV) e dengue (DENV), fabricados em eletrodos quimicamente modificados por Polianilina (PANI) e polipirrol (PPy) respectivamente. Foi utilizado como método para detecção viral de BPV um sistema genossensor elaborado a partir de eletrodos baseados em membranas de alumina anódica (AAO), polimerizadas quimicamente por Polianilina. Sondas de oligonucleotídeos de alta seletividade, alinhadas por bioinformática, foram imobilizadas no suporte proposto e, em seguida, a hibridização dos ácidos nucleicos complementares e amostras biológicas (positivas) foram avaliadas. A caracterização do perfil eletroquímico foi realizada e o sinal de oxidação da guanina verificado por voltametria de pulso diferencial (VPD) e as superfícies das membranas (AAO) foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). O sistema exibiu uma resposta rápida, sensível e seletiva com detecção limite de 51 nM. Outro sistema para detecção da proteína NS1 do DENV (imunossensor), foi desenvolvido em eletrodos de carbono impresso, eletropolimerizados por polipirrol/polipirrol-2-ácido carboxílico (PPy-PPa) e nanobastões de ouro (AuNR). Análises do bioconjugado foram realizadas por espectroscopia UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a caracterização eletroquímica por voltametria cíclica (VC). Os resultados demonstraram uma detecção limite de $0.0079 \mu\text{gml}^{-1}$. Os dois sistemas de detecção desenvolvidos demonstraram grande potencial eletroquímico no diagnóstico de infecções virais.

Palavras-chave: Biossensor. Papilomavírus bovino. Dengue. Polianilina. Polipirrol.

ABSTRACT

The conventional clinical methods of diagnosis, for detection of viral infections, often require time, high cost, reagents and laboratory equipment. Amperometric biosensors are excellent alternatives for viral detection, because they present great practicality, speed, portability, low cost and sensitivity. Chemically modified electrodes (CMEs) by conductive polymers (polyacetylene, polyaniline, polypyrrole and polythiophene), are quite sensitive, with great potential for application constituting excellent alternatives to improve the performance of a sensor. Such polymers are constituted by conjugated double bonds which are responsible for increasing conductivity. In this study, we aimed to develop diagnostic label-free methods for the detection of bovine papillomavirus (BPV) and dengue virus (DENV), made in chemically modified electrodes by polyaniline (PANI) and polypyrrole (PPy). The method used for detection of viral BPV was a genosensor system drawn from membrane electrodes anodic alumina (AAO), chemically polymerized by polyaniline. Oligonucleotide probes of high selectivity, aligned by bioinformatics, were immobilized in the proposed carrier, and then the hybridization of complementary nucleic acids, and biological samples (positive) were evaluated. The electrochemical characterization of the profile was performed and the signal of oxidization of guanine verified by differential pulse voltammetry (DPV), the surfaces of the membranes (AAO) were analyzed by scanning electronic microscopy (SEM). The system exhibited a rapid, sensitive and selective detection with limit 51NM response. Another system for detection of protein NS1 of DENV (immunosensor) was developed in printed carbon electrodes, electropolymerized by polypyrrole/polypyrrole-2-carboxylic acid (PPA-PPy) and gold nanorods (AuNR). Analyzes of the bioconjugate were performed by UV-Vis spectroscopy, transmission electronic microscopy (TEM) and electrochemical characterization by cyclic voltammetry (CV). The results showed a detection limit of $0.0079 \mu\text{gml}^{-1}$. The two detection systems developed have shown great electrochemical potential in the diagnosis of viral infections.

Keywords: Biosensor. Bovine Papillomaviruses. Dengue fever. Polyaniline. Polypyrrole.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO I	
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Papilomavírus bovino (BPV)	18
2.1.1 Papilomatose bovina	23
2.1.2 Diagnóstico e terapêutica.....	25
2.2 Dengue.....	27
2.2.1 O vírus da Dengue (DENV)	29
2.2.2 Diagnóstico laboratorial.....	30
2.3 Biossensores.....	32
2.3.1 Definição e características	33
2.3.2 Técnicas eletroanalíticas.....	35
2.3.3 Classificação dos biossensores.....	38
2.3.4 Métodos de imobilização em eletrodos.....	40
2.4 Eletrodos quimicamente modificados (EQM): Polímeros e nanomateriais.....	41
2.4.1 Membranas de alumina anódica (AAO).....	43
2.4.2 Eletrodos de carbono impresso.....	47
2.4.3 Polímeros condutores: Polianilina e Polipirrol (PANI e PPy).....	47
2.4.4 Nanobastões de ouro (Nanorods).....	57
3. OBJETIVOS.....	59
3.1 Objetivo geral.....	59
3.2 Objetivos específicos.....	59
4. REFERÊNCIAS.....	60

CAPÍTULO II.....	79
-------------------------	-----------

Artigo Científico I

Avanços recentes em biossensores de DNA baseados em polianilina (PANI)

CAPÍTULO III.....	95
--------------------------	-----------

Artigo Científico II

Label-free electrochemical genosensor for bovine papillomavirus detection on anodic aluminum oxide/ polyaniline composites

CAPÍTULO IV.....	112
-------------------------	------------

Artigo Científico III

Label-Free Immunosensor Using Gold Nanorod Bioconjugates for Diagnosis of Dengue Virus (NS1)

1. INTRODUÇÃO

Os Biossensores são dispositivos analíticos utilizados em diversas áreas, tais como detecção química, bioquímica, genética e imunológica. Além disso, têm demonstrado grande importância no monitoramento de parâmetros em diferentes aplicações como diagnósticos clínicos, indústria de alimentos, monitoramento ambiental, detecção de drogas e ciência forense.

Os métodos diagnósticos *gold-standard* de infecções virais causadas pelo Papilomavirus bovino (BPV) e o vírus da dengue (DENV) apresentam limitações consideradas significantes, principalmente quando técnicas convencionais de biologia molecular, citologia, histopatologia e imuno-histoquímica são empregadas. Ensaio moleculares para a detecção viral, em geral, são dependentes dos métodos de hibridização *in situ*, captura híbrida *microarray* e reação em cadeia da polimerase RT-PCR e MAC-ELISA.

Na área de diagnósticos, os sensores eletroquímicos apresentam-se como ferramenta promissora na detecção precoce, devido a características vantajosas como velocidade de resposta, detecção direta do analito sem envolvimento de diversas etapas bioquímicas, reutilização, miniaturizáveis, baixo custo e praticidade e isenção de mão de obra especializada.

Nesse contexto, os eletrodos quimicamente modificados (EQM) por polímeros condutores e nanomateriais são fabricados de forma simples, se tornando mais sensíveis, com grande potencial de aplicação, constituindo excelentes alternativas para melhorar o desempenho de um sensor e são denominados “biossensores de terceira geração”. Os polímeros condutores (PCs) contêm elétrons policonjugados que conferem propriedades tais como condutividade elétrica, baixa energia de transmissão ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica, semelhantes a materiais inorgânicos. Neste sentido, os EQM, quando submetidos a modificações químicas apropriadas, podem exibir um intervalo de condutividades desde semicondutor até condutor, chegando a condutividades comparáveis às do cobre (10^6 S.cm^{-1}).

Dentre as famílias mais estudadas estão o poliacetileno, polianilina, polipirrol e politiofeno. Tais compostos são constituídos por ligações duplas conjugadas, que são responsáveis pela superposição das nuvens eletrônicas, contribuindo portanto, para a condução. Estes passam do estado isolante para condutor após processos reversíveis de oxidação e/ou redução do sistema π conjugado. As reações de oxidação ou redução na cadeia poliênica têm como consequência a formação de cargas deslocalizadas, positivas ou

negativas, as quais são balanceadas pela incorporação de contra-íons, ânions ou cátions, denominados de dopantes.

No presente estudo, dois sistemas biossensores de diagnósticos *label-free* foram desenvolvidos para detecção de papilomavírus bovino e dengue, a partir de eletrodos quimicamente modificados por Polianilina (PANI) e polipirrol (PPy) respectivamente.

CAPÍTULO I

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Papilomavírus bovino

O nome papilomavírus origina-se do latim *papila* (diminutivo de *papula*) que significa projeção ou saliência em forma de mamilo e da desinência *-oma*, usada pelos antigos médicos gregos para designar as tumorações ou entumescimentos (Rosa et al., 2009). Desde a antiguidade, tratados de medicina relatam a existência de verrugas palmares, plantares e genitais em pacientes (Celsus, 1961). Os médicos da época foram os primeiros a observar a transmissão sexual dessas lesões. No final do século XIX, foi registrada a natureza infecciosa das verrugas. Em 1891, Joseph F. Payne, em Londres, publicou um artigo clássico, *On the contagiousness of common warts*, no qual descreve o desenvolvimento por auto-inoculação de papilomavírus em seu polegar.

No século XX, o cientista G. Ciuffo foi o primeiro a propor que a infecção seria causada por vírus. Em 1933, Richard E. Shope, em Princepton, descobriu que os papilomas podiam ser transmitidos de coelhos selvagens (*cottontail rabbits*) para coelhos domésticos e que o agente causador desses tumores era um vírus, que foi denominado de papilomavírus. Em 1935, Peyton Rous e J. W. Beard, do Instituto Rockefeller em Nova Iork, observaram que os papilomas de Shope – tumores epiteliais benignos de coelhos, causados por vírus – podiam tornar-se malignos, progredindo para carcinomas escamosos. Em 1949, Maurice Strauss e outros pesquisadores da Escola de Medicina da Universidade de Yale visualizaram por microscopia eletrônica partículas semelhantes a vírus em amostras retiradas de papilomas da pele. Posteriormente, Strauss e colaboradores identificaram o papilomavírus humano – HPV – como o agente etiológico das verrugas (Garfield, 1988).

Os papilomavírus são pequenos vírus de simetria icosaédrica, com diâmetro em torno de 55nm e capsídeo não envelopado, com aproximadamente 2nm de espessura. Quanto à

morfologia, a partícula viral consiste de uma capa protéica e um capsídeo que envolve o genoma viral (Fig 1) (Doorbar; Sterling, 2001).

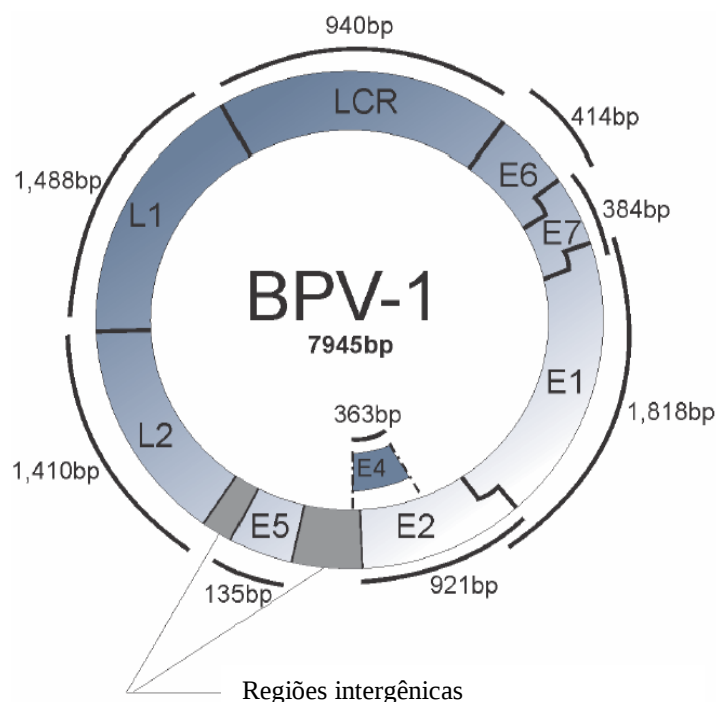


Figura 1 - Organização genômica de BPV-1: genes virais E1, E2, E4, E5, E6, E7, L2, L1, região longa de controle (LCR) e regiões intergênicas (Freitas et al., 2011).

O genoma viral é constituído por uma fita dupla de DNA circular, variando de 5 a 8 Kbp que contém 10 sequências abertas de leitura ORF (*open reading frames*), que são divididas nas seqüências precoce, tardia e região longa de controle. O segmento inicial (*E-early*) é constituído por oito ORFs, o segmento tardio (*L-late*) contém duas ORFs e há um terceiro segmento denominado LCR (*long control region*). O segmento *E* codifica proteínas não-estruturais, o segmento *L* codifica as proteínas estruturais L1 e L2 e o LCR contém elementos promotores e reguladores da replicação viral. A proteína gênero-específica L1 é a principal proteína do capsídeo: contém epítomos que induzem anticorpos neutralizantes e, mesmo na ausência do genoma e da outra proteína, pode formar partículas semelhantes a vírions (Florin et al., 2002; Finnen et al., 2003).

Além disso, a L1 é a região mais conservada do genoma. Por essa razão, tem sido utilizada para a identificação de novos tipos virais. Um novo tipo do vírus é reconhecido quando o sequenciamento da ORF L1 demonstrar diferença de identidade nos nucleotídeos superior a 10% (De villiers et al., 2004; Alfieri et al., 2007; Bernard, 2010).

Segundo estudos de Nasir; Campo (2008) três proteínas são necessárias para o processo carcinogênico do BPV, proteínas estas denominadas de oncoproteínas, sendo elas a E5, E6 e E7. A principal proteína da transformação de BPV é a E5, uma proteína muito pequena e hidrofóbica associada às atividades oncogênicas. Os mecanismos cancerígenos da E5 foram amplamente investigados *in vitro*. Entretanto, algumas descobertas têm destacado o papel oncogênico desta oncoproteína transmembranaral. A proteína E6 é conhecida por ter uma grande variedade de ligantes, exercendo diversas atividades sobre o ciclo de vida do vírus. O gene E7 do BPV é considerado como um gene transformante mediador subjacente da carcinogênese. Postula-se que a E7 coopera com a E5 na transformação celular (Fig 2) (Corteggio et al., 2013).

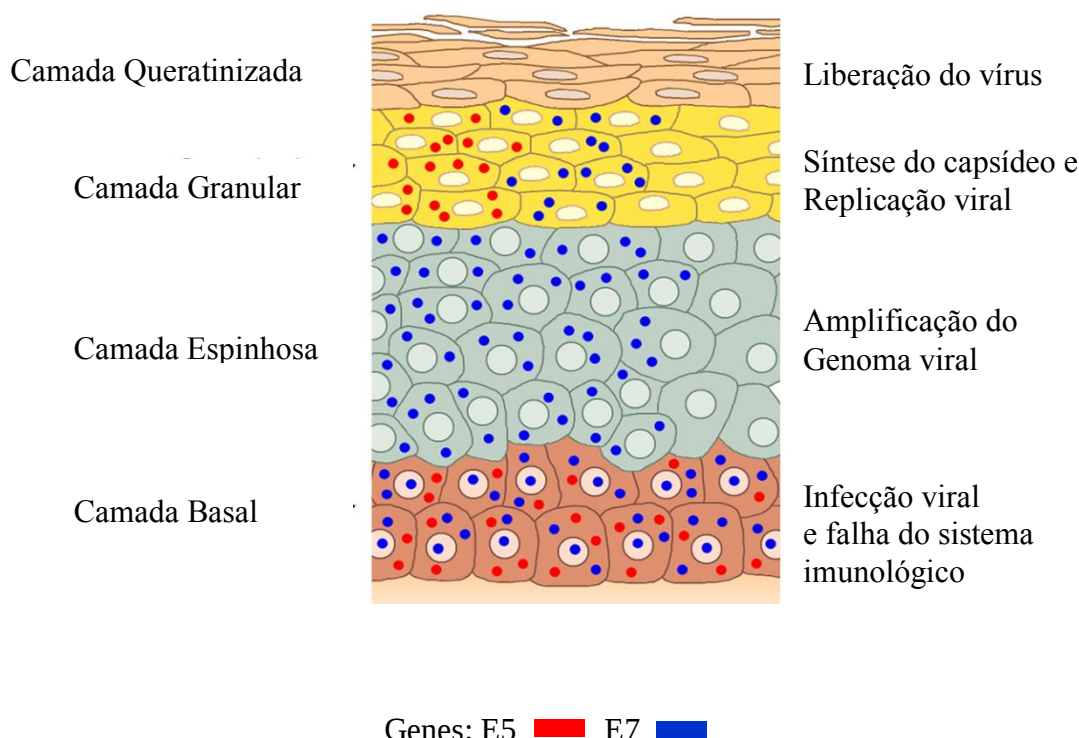


Figura 2 - Ilustração microscópica da infecção pelo papilomavírus e expressão dos genes BPV E5 e E7 em epitélio cutâneo (Adaptado de Corteggio et al.,2013).

Os tipos de papilomavírus foram classificados em números de sequências de acordo com sua descoberta, como por exemplo: BPV-1, BPV-5 BPV-8 e BPV-10. A classificação em sorotipos não é aplicada ao gênero, devido à impossibilidade de testes de neutralização que permitam a distinção entre sorotipos de vírus, impossibilidade esta causada pela dificuldade em cultivá-los em células. Assim, sua classificação é feita com base nas diferenças do próprio

genoma. Nesse contexto, os tipos de papilomavírus são classificados em genótipos e não sorotipos. Atualmente, os tipos baseiam-se na comparação de seqüências de nucleotídeos do gene L1 (Hatama et al., 2008).

Até o momento, treze tipos de BPV têm sido classificados em três gêneros distintos: *Deltapapillomavirus* (BPV-1, -2 e -13), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 e -8) e *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11 e -12), além de um gênero de BPV ainda não atribuído (BPV-7) (Claus et al., 2008; Bernard et al., 2010; Hatama et al., 2011; Zhu et al., 2013; Mengual-Chuliá et al., 2012; Lunardi et al., 2013; Silva et al., 2013).

A árvore filogenética que apresenta a distribuição dos gêneros de BPV e alguns tipos baseados em seqüências nucleotídicas está demonstrada na fig 3.

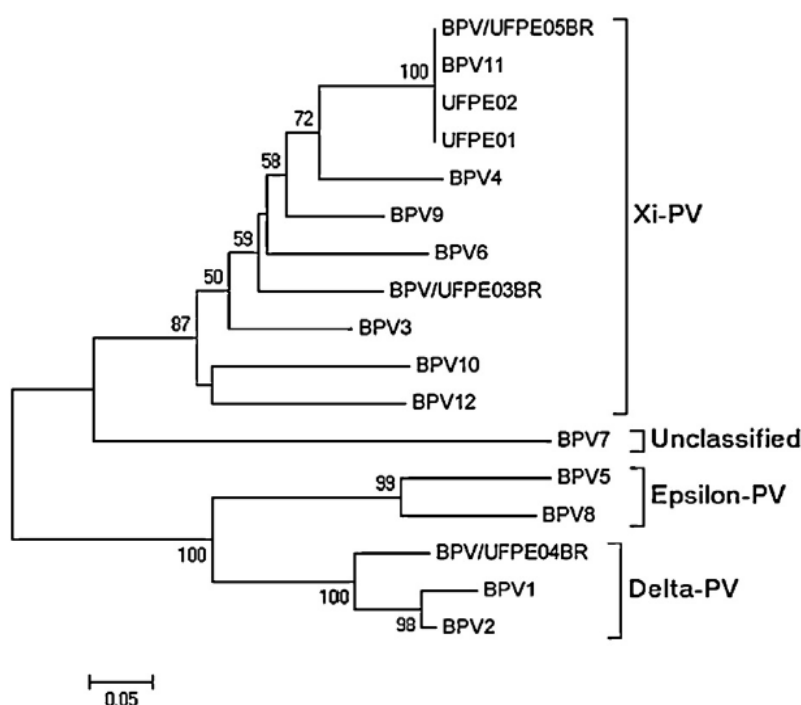


Figura 3 - Árvore filogenética provável com base em seqüências de nucleotídeos L1 de PVs. Compreende 12 tipos de BPV (isolados no Brasil) dos gêneros *Deltapapillomavirus*, *Epsilonpapillomavirus* e *Xipapillomavirus* (Adaptado de Silva et al., 2013).

O ciclo biológico do papilomavírus tem início quando as partículas virais penetram no epitélio e infectam células da camada profunda, células menos diferenciadas com atividade mitótica. O vírion entra na célula pela interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da superfície celular. Estudos *in vitro* apontaram a alfa-6 integrina como um

receptor celular para os papilomavírus. Depois de penetrar na célula, o vírion perde seu capsídeo, expondo seu DNA à ação de enzimas nucleares, o que favorece a expressão dos genes virais (De Villiers et al., 2004).

O BPV apresenta tropismo para células epiteliais, causando infecções na pele e mucosas dos animais (Fig 4). O ciclo de vida viral está diretamente relacionado com a diferenciação neoplásica das células epiteliais basais da célula hospedeira, principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer (Freitas et al., 2011). Primeiramente, o vírus infecta queratócitos basais, expressa parte de seus genes em camadas basais e suprabasais, replica e diferencia seus genes nas camadas espinhosa e granulosa, expressa genes estruturais, empacota o DNA nas camadas escamosas e a nova infecção viral é finalmente lançada em camadas queratinizadas (Corteggio et al., 2013).

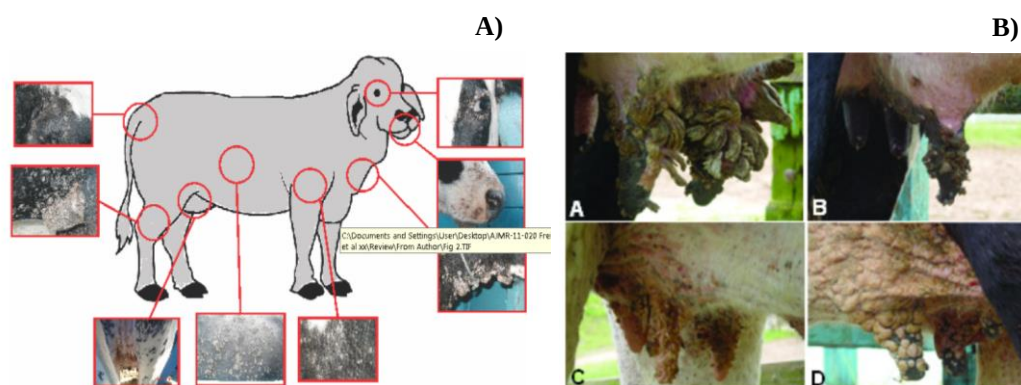


Figura 4- **A)** Esquema dos principais locais de infecção do BPV (Diniz et al., 2009); **B)** Exemplos de infecções em tetas e úberes (Freitas et al., 2011).

Apesar dos PVs serem vírus epiteliotrópicos por infectarem queratinócitos e fibroblastos, também podem ser encontrados em outros tecidos ou fluídos corporais. Segundo Schuch (1998), a infecção pelo papilomavírus apresenta-se pela proliferação das “verrugas” e não pela destruição celular. Ou seja, ocasionam, na maioria das vezes, mudanças na morfologia e função celular, justamente pelas alterações genéticas e fisiológicas tais como perda progressiva do ciclo celular, imortalização celular e transformação tumoral. O BPV é normalmente “espécie-específico”, ou seja, infecta principalmente a espécie bovina.

Alguns cofatores ambientais estão associados à infecção viral e tais interações com o papilomavírus podem ser responsáveis pelo desencadeamento do carcinoma (Nasir et al., 2008; Silvestre et al., 2009). Estudos de tais interações foram demonstrados

experimentalmente, onde o BPV-2 causou cancro da bexiga urinária e o BPV- 4 causou câncer do tubo digestivo superior em bovinos que se alimentavam de samambaia da espécie *Pteridium aquilinum* (Freitas et al.,2011).

2.1.1 Papilomatose bovina

O papiloma vírus bovino é um fator de grande preocupação pertinente à pecuária no mundo. O Brasil é o segundo produtor mundial com cerca de 200 milhões de cabeças de gado. Segundo o Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento, desde 2004 o Brasil lidera exportações mundiais da carne bovina, contribuindo com um quinto do montante de carne comercializada internacionalmente, exportada para mais de 180 países.

A Papilomatose bovina é uma enfermidade infecto-contagiosa causada pelo Papilomavírus bovino. É transmissível, pertence a um grupo heterogêneo de vírus DNA epiteliotrópicos, que se distingue pelo crescimento aumentado das células basais do epitélio estratificado, levando a formação de lesões tumorais, cutâneas e mucosas, também conhecidas popularmente como “verrugas ou figueiras” (Alfieri et al., 2007; Claus et al., 2007). Os tumores benignos geralmente regredem por meio do sistema imunológico, todavia, ocasionalmente podem persistir pela ação de outros fatores, sendo foco para transformação maligna (carcinoma) de células escamosas (Campo, 1997).

Os sintomas provocados pelo BPV são bastante desagradáveis ao gado, como fribropapillomas cutâneos (BPV-1 e -2), câncer do trato gastrointestinal superior (BPV-4), Papilomatose de tetas e úberes (BPV-1, -5, -6, -9 e 10), do pênis (BPV-1), cancro da bexiga urinária (BPV-1 e -2) e papilomas cutâneos (BPV-8) (Borzacchiello; Roperto, 2008). Mesmo a progressão benigna exige atenção, uma vez que lesões hiperplásicas podem desvalorizar a pele em animais afetados e, quando localizado no úbere, podem acarretar problemas de lactação. Campo (2006) relatou diversas consequências econômicas relacionadas à infecção pelo BPV, tais como vacas com papilomas nas tetas que, por isto, não podem ser ordenhadas, não podem amamentar bezerros jovens e, muitas vezes, nos locais infectados, podem sofrer mastite, tendo como consequência uma distorção nos canais de leite. Na verdade, os animais também podem desenvolver papilomas extensos no trato gastrointestinal superior e, conseqüentemente, apresentam dificuldade para se alimentar e respirar, resultando em um animal debilitado que pode vir a óbito (Campo, 1997).

Durante vários anos, os seis primeiros tipos de BPVs foram bem caracterizados e descritos como agentes causadores de lesões específicas em locais do corpo diferentes de bovinos: o BPV-1 causava cancro na teta e fibropapilomas peniano; o BPV-2 foi descrito como o agente causador de verrugas e fibropapilomas esofágico; os BPV-3 e -8 nos papilomas epiteliais da pele; o BPV-4 foi descrito como agente de papilomas do canal alimentar, exibindo especificidade para o epitélio mucoso, o BPV-5 causava fibropapilomas no úbere e o BPV-6 foi isolado a partir de papilomas de tetas, enquanto que os BPV-9 e -10 têm sido associados a papilomas epiteliais do úbere (Campo, 1997; Borzacchiello; Roperto, 2008).

No entanto, nos últimos anos, uma diversidade de infecção múltipla BPV foi descrita em mamíferos bovinos e outros animais (Ogawa et al., 2004; Bogaert et al., 2008; Noel et al., 2009; Van Dyk et al., 2011), sugerindo que certos tipos virais não afetam áreas restritas como se pensava anteriormente. Claus et al. (2009), observaram a ocorrência de vários tipos de BPV numa região anatômica específica; a detecção do mesmo tipo de vírus em diferentes locais do corpo evidencia que o vírus pode atuar de forma total no organismo, gerando lesões com características morfológicas semelhantes, causadas pelos mesmos tipos de papilomavírus.

Nesse contexto, o interesse cada vez maior de estudos sobre a presença do BPV no sangue revelou que o vírus pode vir a se espalhar nos animais infectados através dos tecidos e fluídos não epiteliais (Stocco dos Santos et al., 1998; Freitas et al., 2007). Esta hipótese pode ser confirmada pela detecção do mesmo tipo de BPV em diferentes tecidos e células, incluindo os locais reprodutivos como oócitos, ovário, útero e células da camada granulosa. A transmissão vertical do BPV também foi confirmada (Freitas et al., 2003; Yagui et al., 2006; Lindsey et al., 2009).

O vírus BPV tem sido amplamente diagnosticado em rebanhos ao redor do mundo. Diversos casos foram relatados na Europa, América, Ásia e Oceania. Os tipos BPV-1, -6, -8 e -10 foram encontrados em verrugas bovinas de um estábulo alemão (Schmitt et al., 2010). No Japão, foram encontradas novilhas com tumores benignos nas tetas causados pelo BPV-6 (Maeda et al., 2007). Ogawa et al. (2004) detectaram os BPV-1, -3, -5 e -6 em amostras de papilomas. Verrugas cutâneas de bovinos foram notificadas na Índia e identificadas como tipos de BPV - 1 e - 2 Singh et al. (2009), Pangty et al. (2010) e Rai et al. (2011) identificaram o tipo BPV-10 em tetas de vacas em uma fazenda na Índia.

No Brasil, a doença está amplamente difundida nos rebanhos bovinos e o número de casos que realmente ocorre é muito mais elevado do que o descrito na literatura. Na última

década, houve um aumento significativo de estudos sobre infecção de BPV no gado brasileiro. Na região sul foi detectada notável diversidade entre os tipos de papilomas, identificando-se os tipos BPV-1, -2, -6 e -8 em lesões cutâneas (Claus et al., 2007; Sá; Silva, 2010). O estudo identificou quatro novos tipos de BPV putativos designados como BPV/BR-UEL2, BPV/BR-UEL3, BPV/BR-UEL4 e BPV/BR-UEL5 (Claus et al., 2008). Os resultados de Freitas, et al. (2011) também revelaram a presença de dez diferentes tipos de BPV nas amostras do nordeste do Brasil, no estado de Pernambuco/UFPE, com exceção do BPV-7. A análise filogenética, utilizando sequências de ORF L1 completo, revelou que um dos tipos isolados foi semelhante ao BPV-4 (78%), o que sugere a sua classificação no gênero *Xipapillomavirus* (Lunardi et al., 2010). Além disso, outras variantes foram encontradas em amostras desse rebanho, cujas análises sequenciais indicaram a presença de dois novos tipos isolados: BPV/UFPE01 e BPV/UFPE02, descritos por Claus et al. (2008).

As principais vias de transmissão do BPV ainda precisam ser exploradas (Bravo et al., 2010). Sabe-se que as populações confinadas são mais vulneráveis porque a disseminação do vírus pode ocorrer de forma direta, pelo contato da pele dos animais ou de modo indireto, a partir de objetos contaminados (Hama et al., 1988. Nasir; Campo, 2008). Além disso, diversas vias de contaminação vêm sendo sugeridas como, por exemplo, a transmissão por vetores (artrópodes) e transmissão vertical (Freitas et al., 2003; Finlay et al., 2009). O gado não confinado, tanto pode ser contaminado pelo contato com feridas existentes, como pode adquirir a infecção BPV no pasto contaminado, tendo em vista a plasticidade do genoma viral, infectando e coinfetando diversos grupos de animais.

2.1.2 Diagnóstico e terapêutica

O diagnóstico inicial dos papilomavírus em geral, assim como a determinação do tipo viral, apresenta limitações consideradas significantes, principalmente quanto às técnicas convencionais de biologia molecular, citologia, histopatologia e imuno-histoquímica. O diagnóstico é baseado na identificação do DNA viral por meio de técnicas de hibridização *in situ*, captura híbrida *microarray* e reação em cadeia da polimerase (PCR) (Molijn et al., 2005; Rama et al., 2006; Park et al., 2014).

A PCR baseia-se na amplificação específica de segmentos do DNA alvo e tem potencial para a detecção de níveis muito baixos de carga viral em células e tecidos, mesmo em infecções ditas não produtivas (Bagarelli; Oliani, 2004; Payan et al., 2007). O uso de

primers universais permite, teoricamente, a detecção de todos os tipos de Papilomavírus existentes (Cubie et al.,2004). As técnicas que utilizam PCR são, em geral, mais sensíveis, e podem ser combinadas com a detecção por sondas específicas (*linear array*) ou análise de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição [RFLP] para determinar os vários tipos virais (Novaes et al.,2006; Turan et al.,2007; Castle et al.,2009).

Diferentes sequências de oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) foram desenhadas com o objetivo de identificação dos BPV-1, BPV-2, BPV-4 e BPV-5 (Wosiacki et al., 2002). Ensaio de PCR utilizando iniciadores degenerados que amplificam fragmentos parciais do gene L1, seguido de sequenciamento, sugeriram a existência de vários tipos de BPV ainda não caracterizadas em rebanhos de diversas regiões geográficas. Os *primers* FAP59/FAP64 (BPV), MY09/MY11 (Papilomavírus), GP 5+/6+ e, recentemente, novos conjuntos de *primers*, subAup / subAdw e subBup / subBdw, permitiram a detecção em largo espectro, utilizados para o reconhecimento de novos tipos de BPV (Hatama, et al.,2011; Silva et al.,2013; Taniwake et al.,2013).

A genotipagem é realizada, quer por detecção em tempo real (Rai et al., 2011), por análise sequencial (Brandt et al.,2008) ou por polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Carr et al.,2001). Iniciadores consenso foram descritos como sendo capazes de identificar diversos tipos de BPV simultaneamente. Além disso, os ensaios de PCR, concebidos originalmente para a detecção do vírus do Papilomavírus humano têm sido utilizados para genotipagem de diferentes tipos de BPV em bovinos (Antonsson; Hansson, 2002; Ogawa et al., 2004).

O primeiro estudo com a vacinação contra diferentes tipos de BPV foi realizado por Jarrett et al. (1990), no qual os autores sugeriram que a imunidade para o papilomavírus é tipo-específica. As vacinas autógenas foram obtidas através da inativação de um macerado de papilomas coletado do animal infectado. Alguns experimentos já indicaram os efeitos positivos desta imunização. A regressão da infecção depende de vários fatores associados, como preparação da vacina, imunidade do animal, estágio de evolução da enfermidade e do tipo do papiloma envolvido. Muitas outras formas de tratamento são descritas com resultados inconsistentes como a extirpação cirúrgica de alguns ou de todos os papilomas, tratamentos medicamentosos locais ou sistêmicos com vários produtos (Tozato et al.,2013).

Em relação à prevenção e controle da doença, os pecuaristas devem adotar medidas que vão desde a aquisição de novos indivíduos do plantel até o isolamento de animais infectados. Técnicas preventivas como esterilização de agulhas, seringas e materiais

cirúrgicos, utilização de materiais descartáveis, assim como o controle de vetores, como moscas e carrapatos e o manejo dos animais doentes devem ser criteriosamente considerados de acordo com Muro et al. (2008).

Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos diagnósticos rápidos e portáteis como Biossensores são um excelente método de detecção alternativo, de fácil realização, altamente reprodutível, com alta especificidade e sensibilidade, além de ser passível de automatização. A praticidade desse tipo de diagnóstico clínico *point-of-care* (portátil), facilita a detecção em áreas isoladas e restritas como, por exemplo, a detecção do BPV em fazendas onde o gado não tem fácil possibilidade de deslocamento, além de poder ser realizada uma quantidade elevada de testes diagnósticos em um único dia.

2.2 Dengue

A Dengue é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial entre as doenças causadas por arbovírus e acomete, principalmente, indivíduos que vivem nas regiões tropicais e subtropicais. Cerca de dois quintos da população mundial, o que equivale a aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas, reside em áreas endêmicas da Dengue (Fig 5) (Gibbons; Vaughn, 2002; Murrell et al., 2011). Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde) (Who, 2012), 50 a 100 milhões de pessoas infectam-se anualmente em mais de 100 países. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da Dengue (Seabra; Mendonça, 2011). A Fig 5 apresenta as principais áreas de risco da dengue no mundo.

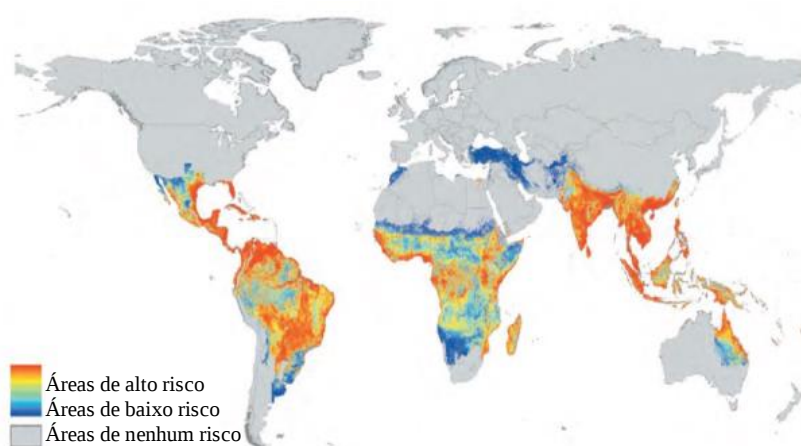


Figura 5- Distribuição mundial do risco de Dengue - relatórios combinados da OMS e do Centro de controle e prevenção de doenças nos EUA (Simmons et al., 2012).

A dengue é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por um vírus que recebe o nome abreviado de DENV (dengue Vírus). Trata-se de uma enfermidade de notificação compulsória (BRASIL, 2011), caracterizada por epidemias sazonais, podendo apresentar comportamento endêmico com aumento da incidência em períodos chuvosos. É classificada como arbovirose humana (doença viral transmitida ao homem por vetores artrópodes) e pode ser causada por quatro sorotipos diferentes (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) (Halstead, 2007; Poloni, 2009; Machado et al., 2013).

Ao ser infectado pelo mosquito transmissor da Dengue (*Aedes aegypti*), o indivíduo passa por um período de incubação do vírus que varia entre 3 a 7 dias. Infecções primárias, ou seja, no primeiro contato do organismo com o patógeno, pode não desencadear manifestações claras, apenas uma febre indiferenciada.

A doença pode desenvolver-se de forma assintomática ou com quadro clínico que varia desde uma febre indiferenciada e autolimitada, passando pela febre clássica da Dengue (DF- *Dengue fever*), até quadros graves de febre hemorrágica da Dengue (DHF - *Dengue hemorrhagic fever*) ou Síndrome do Choque da Dengue (DSS *Dengue shock syndrome*) (Sam et al., 2013). A forma grave está intimamente relacionada à reinfecção e, por isso, é de grande importância clínica e epidemiológica conhecer os sorotipos circulantes e evitar a co-circulação de mais um sorotipo através de medidas de combate ao vetor.

No Brasil, a primeira epidemia documentada clínica e laboratorialmente ocorreu em 1981-1982, em Boa Vista (RR), causada pelos sorotipos 1 e 4. Em 1986, ocorreram epidemias, atingindo o Rio de Janeiro e algumas capitais da região nordeste. Desde então, a Dengue vem ocorrendo no Brasil de forma continuada, intercalando-se com a ocorrência de epidemias, geralmente associadas com a introdução de novos sorotipos em áreas anteriormente não atingidas e ou alteração do sorotipo circulante. Na década de 90, foi identificada a circulação de um novo sorotipo, o DENV-2, também no estado do Rio de Janeiro. A circulação do DENV-3 foi reconhecida, pela primeira vez, em 2000, no estado do Rio de Janeiro e, posteriormente, no estado de Roraima, em 2001. E em 2004, 23 dos 27 estados do país já apresentaram a circulação simultânea dos sorotipos 1, 2 e 3 do DENV (Nogueira et al., 2007; BRASIL, 2010). O aumento significativo da incidência é reflexo da ampla dispersão do mosquito *Aedes aegypti* no território nacional e, sobretudo, nos grandes centros urbanos das regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, responsáveis pela maior parte dos casos notificados. As regiões Centro-Oeste e Norte foram acometidas mais tardiamente, com

epidemias registradas a partir da segunda metade da década de 90 (Siqueira Júnior ; Martelli, 2008).

2.2.1 O vírus da Dengue (DENV)

O vírus DENV pertence à família *Flaviviridae* e ao gênero *Flavivirus*. A inclusão do DENV neste gênero é baseada na sua reatividade antigênica com outros *flavivírus*, bem como na organização do genoma. O vírus apresenta-se como uma partícula esférica medindo 40-50 nm de diâmetro, com um envelope lipídico e RNA de fita simples, com polaridade positiva. Possui um genoma de aproximadamente 11 kb que codifica três proteínas estruturais, capsídeo (C), proteína da membrana (M) e glicoproteína do envelope viral (E) (Fig 6-a) e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, (Fig 6-b) (Guzman et al., 2010; Murrell et al., 2011). Enquanto as proteínas estruturais dispõem a arquitetura da partícula viral, as proteínas NS estão envolvidas nos processos de replicação e montagem dos novos vírions (Kinney; Huang, 2001; Chambers et al., 1990).

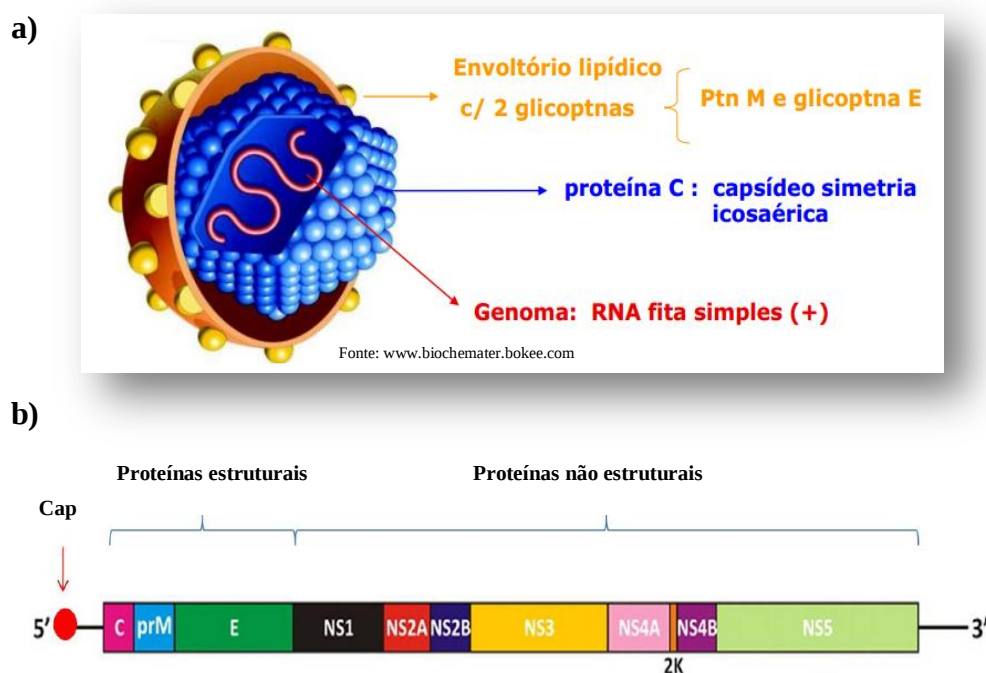


Figura 6- Representação esquemática do vírus da Dengue e seu genoma. (Assenberg et al., 2009; Guzman et al., 2010).

Quando infecta uma célula saudável, o genoma viral é transcrito em uma poliproteína, que é então direcionada ao retículo endoplasmático, onde é processada por proteases provenientes do vírus e da própria célula infectada. Ao atingir a conformação ativa, as proteínas NS iniciam a replicação do genoma viral. Apesar do processo de replicação viral ser entendido de maneira geral, falta ainda informação estrutural e funcional com relação às proteínas NS, principalmente as NS1, NS2A e NS4A/B (Perera; Kuhn 2008; Rodenhuis-Zybert et al., 2010).

Os quatro sorotipos de DENV são geneticamente relacionados, compartilhando aproximadamente 65% da sequência de nucleotídeos que compõem seus genomas. Assim, a individualidade de cada sorotipo é reforçada. Além disso, os DENV1-4 são antigenicamente distintos, principalmente devido às diferenças 25-40% encontradas nas sequências de aminoácidos (aa) presentes na proteína E dos diferentes sorotipos virais (Shrivastava et al., 2011).

O NS1 foi reconhecido primeiramente como antígeno de fixação de complemento solúvel em cultura de célula infectada (Brandt et al., 1970). O antígeno FCS foi reconhecido como uma glicoproteína viral de 46 KD (Smith; Wright, 1985) e posteriormente denominado de NS1 pela analogia ao NS1 do FAV (Rice et al., 1985). A glicoproteína com cerca de 353 - 354 aminoácidos, que possui elevada quantidade de aminoácidos e nucleotídeos homólogos entre flavivírus, não faz parte da partícula viral, mas é liberada das células infectadas pelo DENV (Blok et al., 1992; Young et al., 2000). Dentre as proteínas não estruturais, é a mais conservada e apresenta elevado grau de reação cruzada entre os 4 sorotipos (Zainah et al., 2009a). O NS1, encontrado no soro ou plasma durante a fase aguda da doença, tem oferecido um novo caminho para o diagnóstico precoce e rápido ainda na fase inicial da infecção.

2.2.2 Diagnóstico laboratorial

Uma vez que, até agora, não existem vacinas licenciadas ou terapias específicas para Dengue, o manejo do paciente depende de um diagnóstico precoce e de um tratamento adequado (Felix et al., 2012). O diagnóstico da Dengue é difícil quando baseado exclusivamente em aspectos clínicos, tendo em vista os sintomas poderem ser confundidos com outras doenças, pois os sintomas são comuns a outras infecções febris agudas. Deste modo, é importante considerar a confirmação laboratorial da infecção pelo DENV e imprescindível, em muitos casos, o diagnóstico diferencial (GUBLER et al., 1981).

Basicamente, o diagnóstico laboratorial da Dengue pode ser feito pelo isolamento do vírus, pela detecção do genoma viral, pela detecção de antígenos virais e sorologia (IgG e IgM). Embora mais sensíveis e precisos, os testes moleculares possuem custo mais elevado e necessitam de laboratórios especializados, razão pela qual os testes sorológicos são os mais utilizados na rotina (Blacksell et al., 2008). No entanto, os testes com anticorpos IgM e IgG somente resultarão positivo após vários dias (Guzman et al., 2010).

A abordagem laboratorial para investigação da Dengue pode abranger vários tipos de exames: *Immunoglobulin M* (IgG e IgM), *capture enzyme linked* (Elisa), *immunosorbent assay* (MAC-Elisa), *indirect immunoglobulin G* (IgG), fixação de complemento, teste de inibição da hemaglutinação e teste de neutralização. A combinação de testes imunossorológicos e testes baseados na detecção do RNA viral por PCR-transcriptase reversa (RT-PCR) constituem os atuais métodos para o diagnóstico da doença. O isolamento do vírus é o *gold standard* para diagnóstico e sorotipagem das infecções pelo DENV, no entanto, este método é demorado e trabalhoso, além de não ser conveniente para determinação rápida em surtos ou semi-surtos epidemiológicos, nos quais se usa o teste Panbio Dengue Duo - ensaio simultâneo para IgM e IgG (Yamada et al., 1999a; De oliveira poersch et al., 2005; Blacksell et al., 2011).

Ensaio imunoenzimáticos e imunocromatográficos para a detecção da proteína viral NS1 estão disponíveis no mercado: NS1 Ag Strip (Bio-Rad); Duo Test (Bio-Rad) ELISA; Platelia NS1 (Bio-Rad) ELISA e Early ELISA NS1 (Panbio) (Alcon et al., 2002a). No entanto, diante da necessidade da realização de métodos de diagnósticos mais rápidos, práticos, precisos e de custo reduzido, os biossensores destacam-se, pois, combinando características desejadas, podem ser desenvolvidos para operarem em serviços descentralizados. Além do mais, comparados aos testes imunocromatográficos para NS1 (Zainah et al., 2009a), eles têm a vantagem de poder fornecer resultados quantitativos, além de requererem amostras de pequenos volumes, na ordem de poucos microlitros. Deste modo, visando à minimização de tempo e custo, os biossensores apresentam-se como excelentes ferramentas. A tabela 1 ilustra os imunossensores desenvolvidos na detecção de NS1.

Tabela 1- Imunossensores para detecção de anticorpos anti-NS1

Título	Limite de detecção	Referência
Piezoelectric immunochip for the detection of Dengue fever in viremia phase.	1.727 $\mu\text{g/mL}^{-1}$	Wu et al., 2005
A label-free immunosensor based on recordable compact disk chip for early diagnostic of the Dengue virus infection.	0.33 ng/mL	Cavalcanti et al., 2012
A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the Dengue virus NS1 protein.	12 ng/mL ⁻¹	Dias et al., 2013

2.3 Biossensores

Os Biossensores são uma alternativa bastante atraente por terem diversas características, tais como facilidade, rapidez, baixo-custo e praticidade, permitindo uma vasta aplicação em diversas áreas. Centros de pesquisas no mundo vêm desenvolvendo inúmeros estudos nessa área, aperfeiçoando cada vez mais tal metodologia (Zacco et al., 2007; Siqueira jr et al., 2010; Nascimento et al., 2012).

Eles têm demonstrado ser um dos mais atrativos métodos analíticos no ramo da detecção química, bioquímica, genética e imunológica. Além disso, tem demonstrado importância no monitoramento de parâmetros em diferentes áreas como: diagnósticos clínicos, indústria de alimentos, monitoramento ambiental, detecção de drogas e ciência forense (Zhu et al., 2007; He et al., 2007; Monosik et al., 2012).

Pesquisas recentes demonstram a aplicação de biossensores baseados em nanotecnologia sendo bastante utilizada na área de diagnóstico clínico, tornando-se produtos comerciais portáteis e cada vez mais miniaturizados. Biossensores eletroquímicos, óticos, mecânicos e físicos tem sido desenvolvidos a partir de novas tecnologias baseadas em nanotubos de carbono, partículas magnéticas, nanopartículas de ouro e polímeros. Destacam-se também na utilização em biomarcadores de câncer, análises de DNA, doenças autoimunes, marcadores cardíacos, infecções virais e bacterianas (D'orazio, 2011; Iost; Crespilho et al., 2012).

2.3.1 Definição e características

De acordo com a União Internacional de Química Aplicada (IUPAC), os biossensores podem ser definidos como dispositivos analíticos que incorporam um material biologicamente ativo a um transdutor, que, por sua vez, converte a resposta da interação com o analito de interesse em um sinal elétrico passível de ser quantificado (Fatibello-filho;Capelato, 1992; Mousty, 2004; Càmpas et al., 2008). O início do desenvolvimento de tais ferramentas pode ser datado de 1962, quando Clark, conhecido como o pai do conceito de biossensores, publicou um experimento no qual a glicose oxidase (GOX) foi aprisionada em um eletrodo de oxigênio usando uma membrana de diálise (Clark jr.; Lyons1962).

O funcionamento destes sensores baseia-se na interação seletiva do analito com o biorreceptor, esta interação resulta na variação de alguma propriedade físico-química que é reconhecida e medida por um transdutor adequado, e, finalmente, ocorre a amplificação e o processamento do sinal correspondente à concentração do analito na amostra (Fig 7) (Mello; Kubota, 2002; Campàs et al., 2008).

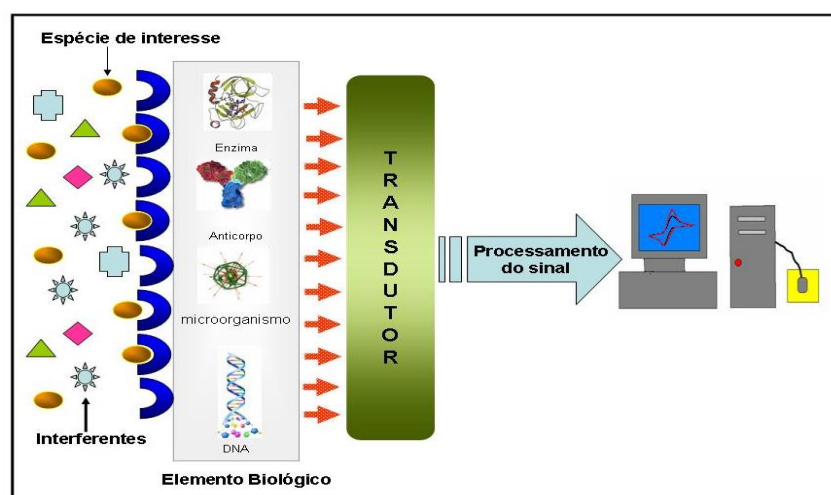


Figura 7- Esquema de funcionamento e componentes de um sistema biossensor (Silva et al.,2014).

O elemento biosseletivo, conhecido como biorreceptor, é o componente responsável pela seletividade/especificidade dos biossensores, podendo ser composto por enzimas, anticorpos, DNA, ou quaisquer outras células ou organelas de seres vivos. É o elemento biosseletivo que possui o papel de reconhecer, reagir ou se ligar ao analito, fornecendo uma

resposta físico-química que será convertida por meio de um transdutor adequado em uma grandeza mensurável, como por exemplo, absorbância e corrente elétrica (fatibello-filho; Capelato, 1992; Melo, 2008; Càmpos et al., 2008).

O transdutor pode operar baseado em diferentes propriedades físico-químicas, sendo classificado em eletroquímico (amperométrico, potenciométrico e condutimétrico), ópticos (colorimétrico, fluorescente e luminescente), calorimétrico (variação de temperatura) e piezelétrico (variação de massa) (Fatibello-filho; Capelato, 1992; Mello; Kubota, 2002; Melo, 2008).

O princípio da transdução de sinal em sensores amperométricos é baseado na medida de uma corrente elétrica que seja diretamente proporcional à concentração da espécie de interesse (analito) (Rahman et al., 2010). A medida consiste em aplicar um potencial constante no eletrodo de referência, mantido geralmente por uma fonte externa, e medir a corrente fluindo através do eletrodo de trabalho em função do tempo (Vidal et al., 2004; Zajoncova; Pospiskova, 2009).

Os biossensores amperométricos são assim denominados devido ao seu mecanismo de transdução. Durante as medidas amperométricas, é mantido um potencial constante entre o Eletrodo de Trabalho (ET) e o Eletrodo de Referência (ER). A corrente gerada pela oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do Eletrodo de Trabalho é medida e o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativas (Schuhmann et al., 2000; Lowinsohn et al., 2006). Essa corrente observada a partir de oxi-redução é faradáica, denominada assim por obedecer à lei de Faraday, na qual a corrente faradáica gerada é produzida pela reação redox de espécies eletroativas na superfície sensora, sendo diretamente proporcional à concentração do analito (Chaubey; Malhotra, 2002). Este processo obedece à lei de Faraday, a qual determina que a quantidade de reagentes formados ou consumidos na interface do eletrodo é proporcional à corrente (Lowinsohn et al., 2006).

A corrente medida é gerada por uma espécie redox na superfície sensora. Além disso, os circuitos dos sistemas amperométricos são baseados em amplificadores, portanto, são mais simples que os mencionados, possuem nível de ruídos e interferências aceitáveis e são mais facilmente portabilizados (Rivas et al., 2007).

Em sensores voltamétricos, o potencial do eletrodo de trabalho é controlado por um potenciostato e, durante a varredura, a corrente produzida devido às reações de oxirredução dos compostos com a superfície do eletrodo de trabalho é medida (Ahammad et al., 2009). Além dos biossensores amperométricos que utilizam marcadores (*label*) para a detecção do

analito como foi visto anteriormente, é possível realizar o monitoramento do analito sem o uso de marcadores (*label free*). Na literatura, é crescente o número de trabalhos sem o uso de marcadores (Wu et al., 2007; Lee et al., 2007). Essa configuração de biossensor oferece algumas vantagens em relação aos sistemas que utilizam marcadores, tais como detecção em tempo real, menor custo da análise, redução nas etapas de manipulação e redução nos resultados falso-positivos (Daniels; Pourmand, 2007; Nirschl et al., 2011). Nestes biossensores, a detecção é baseada nas mudanças das propriedades elétricas da superfície, por exemplo, aumento na constante elétrica e resistência na presença da molécula-alvo.

2.3.2 Técnicas eletroanalíticas

A eletroquímica possibilita estabelecer relação entre a concentração do analito e as propriedades elétricas, tais como corrente, potência, condutividade, resistência e cargas elétricas. A técnica se refere a fenômenos químicos associados à transferência de elétrons, que podem ocorrer homogeneamente em solução ou heterogeneamente na superfície do eletrodo (Lowinsohn et al., 2006).

Uma das principais vantagens dessa técnica é a possibilidade de análise direta da amostra, sem a necessidade de etapas de separação ou pré-tratamento (Power; Morrin, 2013). Além disso, pode favorecer opções viáveis para mediar problemas na construção de novos métodos para o diagnóstico clínico (Justino et al., 2010). Outra vantagem é a não utilização de grandes quantidades de reagentes nas análises eletroquímicas e fácil controle de variáveis que, combinadas de formas diversas, levam a técnicas eletroquímicas particulares, tais como VC, VOQ e VPD.

O voltamograma baseia-se no potencial que é aplicado entre os dois eletrodos em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva de corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma (Medeiros et al., 2012).

O eletrodo de trabalho é onde ocorre a reação de interesse e pode ser composto de diferentes materiais, tais como carbono, ouro e prata (Noorbakhsh; Salimi, 2011; Yang et al., 2009; Huang et al., 2012). O eletrodo de referência permite o monitoramento de potencial do eletrodo de trabalho, sendo composto geralmente por um eletrodo saturado de calomelano (SCE) ou prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). O eletrodo auxiliar atua no controle da corrente necessária para sustentar a eletrólise que ocorre no eletrodo de trabalho. Nesta situação, a

corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar evitando que ocorram distúrbios (como eletrólise, por exemplo) no eletrodo de referência, o que acarretaria a mudança no potencial do mesmo. A voltametria encontra aplicações nas mais diversas áreas do conhecimento, tais como a área ambiental, médica, química e bioquímica (Wang, 2001; Souza et al., 2003).

- *Voltametria cíclica*

A voltametria cíclica (VC) mostra-se particularmente eficiente quando se deseja conhecer a eletroatividade de compostos (especialmente moléculas biológicas), investigar reações químicas acopladas, analisar íons e estudar superfícies de eletrodos de acordo com Brusciotti; Duby. (2007) e Silva. (2010). A técnica também fornece informações a respeito da reversibilidade eletroquímica de um sistema, a qual está associada à troca rápida de elétrons entre as espécies redox e o eletrodo (Wang, 2001; Silva, 2010).

É uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente *versus* potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma célula eletroquímica (Silva, 2010). Na VC, o potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho corresponde a uma onda triangular, ou seja, primeiramente a varredura de potencial é feita em uma direção e, em seguida, na outra, enquanto a corrente é medida. Assim, esse programa de potenciais produz uma curva voltamétrica que constitui um ciclo, pois o potencial é varrido no sentido direto e depois no sentido inverso, sendo o ponto onde ocorre a reversão chamado de potencial de inversão (Fig 8).

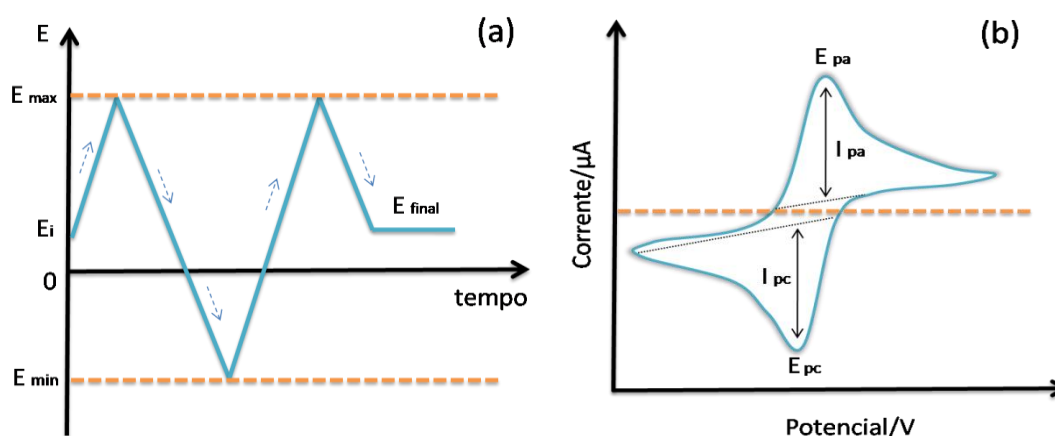


Figura 8 -(a) Sinal de excitação da VC. (b) Representação de voltametria cíclica típica, representando os parâmetros obtidos com esta técnica: (I_{pa}) corrente de pico anódica, (I_{pc}) corrente de pico catódica,

(Epa) potencial de pico anódico e (Epc) potencial de pico catódico, potencial de inversão (Ei). (Bard ; Faulkner, 2006).

Os potenciais de inversão devem ser escolhidos de maneira que se possa observar a oxidação ou redução, controlada por difusão, de uma ou mais espécies de interesse (Skoog et al., 2002; Harris, 2005). Na curva voltamétrica corrente-potencial, os processos de oxidação e de redução ocorrendo no eletrodo de trabalho são representados por correntes de pico anódica (ipa) e catódica (ipc). Outros parâmetros importantes considerados em VC são os potenciais de pico anódico (Epa) e catódico (Epc), a velocidade de varredura do potencial (v) e o potencial de inversão (Ei).

A técnica voltametria de pulso diferencial (VPD) traz uma melhoria significativa nas respostas das técnicas de pulso. A instrumentação é desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial sejam realizados em intervalos de tempo muito pequenos. Assim, a corrente é lida em dois momentos, no início (S_1) e no final do pulso (S_2). A corrente plotada no gráfico *versus* o potencial aplicado é a variação entre a corrente capacitiva (S_1) e a corrente faradaica (S_2), isto é, a corrente final é produto da subtração das duas correntes, eliminando possíveis ruídos (Fig 9) (Wang, 2001).

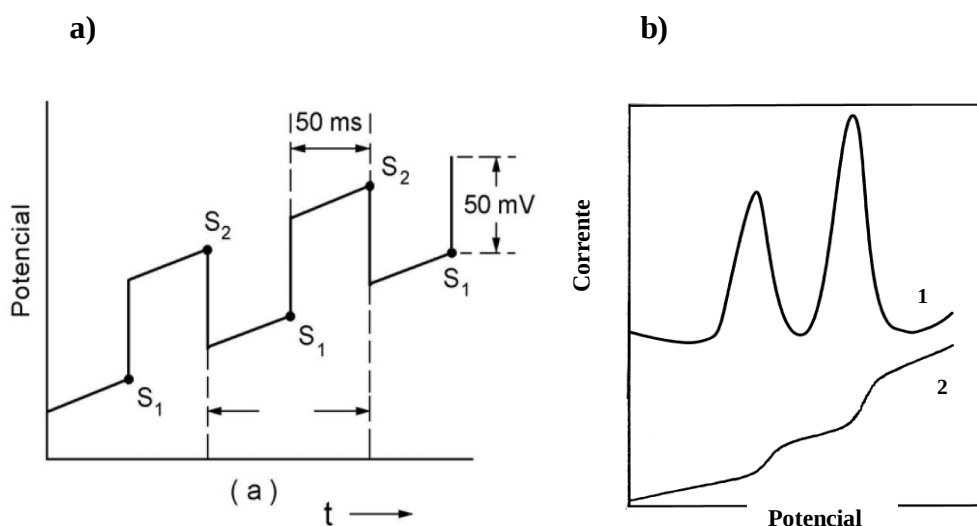


Figura 9- a) Medição de Sinal na voltametria de pulso diferencial (ΔE) corrente livre de ruído **b)** Gráfico comparativo: (1) voltametria de pulso diferencial e (2) voltametria de pulso normal (Wang,2001).

2.3.3 Classificação dos biossensores

De acordo com o tipo de biorreceptor, os biossensores podem ser enzimáticos, imunológicos, microbiológicos, genossensores, baseados em aptâmeros entre outros.

✓ *Biossensores enzimáticos*

O princípio de biossensores enzimáticos se baseia na detecção de substâncias químicas geradas ou consumidas pela reação que ocorre entre uma enzima e seu analito. Geralmente, a enzima interage de forma específica com um dado analito, fato este que permite o desenvolvimento de biossensores com elevada especificidade. Um dos biossensores enzimáticos mais investigados emprega a imobilização da enzima glicose oxidase na superfície de um polímero conjugado, tal como o polipirrol, a polianilina ou o politiofeno (Oliveira et al.,2013).

✓ *Biossensores Microbiológicos*

O biossensor microbiológico consiste na ligação de uma célula microbiológica ligada a um transdutor. Os microrganismos têm uma infinidade de vantagens no uso de biossensores, pois têm capacidade de se adaptar a condições adversas e desenvolver a habilidade de degradar novas moléculas com o tempo. Além disso, a utilização de microrganismos evita etapas de purificação e preserva a enzima em seu ambiente natural, protegendo-a da inativação por agentes tóxicos externos (D'souza, 2001; Lei et al.,2006).

✓ *Biossensores baseados em aptâmeros*

Aptâmeros são pequenas moléculas de oligonucleotídeos capazes de reconhecer e ligar-se ao alvo com afinidade e especificidade elevada (Farokhzad et al.,2006). Biossensores baseados nestas moléculas utilizam uma sequência de oligonucleotídeos (DNA ou RNA) de cadeia simples, sintetizada artificialmente, que são capazes de reconhecer diversas moléculas com afinidade e especificidade mais elevadas do que os genossensores (Feriotto et al.,2001).

✓ *Imunossensores*

O Imunossensor é um tipo de biossensor que se baseia em uma reação imunológica específica, onde o antígeno liga-se ao anticorpo que é imobilizado na superfície do transdutor

(Riccardi et al., 2002). No imunoensaio, o sítio combinatório do anticorpo interage especificamente com porções mais superficiais (determinantes antigênicos) do antígeno, formando um complexo antígeno-anticorpo (Vo-dinh; Cullum, 2000). A característica básica da reação antígeno-anticorpo é a especificidade, representada por uma estreita relação de complementaridade entre as estruturas tridimensionais das duas moléculas (Mozaz et al., 2004; Ferreira et al., 2005).

A biomolécula marcada com enzima é conhecida como conjugado. Por conseguinte, a medida da corrente elétrica será correlacionada em função do produto da reação enzimática após a adição do substrato na célula eletroquímica. Portanto, a determinação do analito da interação antígeno-anticorpo é baseada na reação de afinidade e não na reação catalítica (Thévenot et al., 2001; Riccardi et al., 2002).

✓ *Biossensores de Ácidos nucleicos (genossensores)*

Os genossensores são constituídos de oligonucleotídeos imobilizados em eletrodos de trabalho como sondas (ssDNA), ácido nucleicos peptídicos (PNA) e aptâmeros. A detecção eletroquímica de uma molécula de DNA apresenta uma ligação de alta afinidade, sensibilidade e seletividade pela complementaridade das bases de nucleotídeos, no processo de hibridização (Fig 10) (Borgmann et al., 2011). O reconhecimento se dá basicamente de duas formas: por oxidação direta ou catalisada de bases de DNA, ou por resposta eletroquímica gerada por enzima ou outro marcador redox por uma reação específica com o DNA alvo (Marraza et al., 2001; Murphy, 2006; Wang et al., 2008).

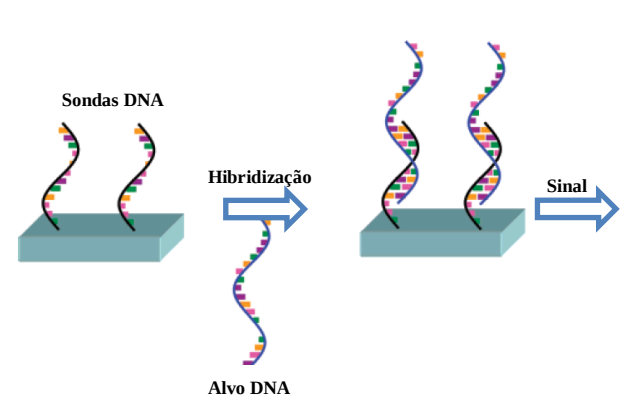


Figura 10- Esquema representativo de um sistema genossensor. A hibridização entre sonda e alvo ocorre na camada de reconhecimento do transdutor (Adaptado de Sassolas et al., 2008).

2.3.4 Métodos de imobilização em eletrodos

Os métodos de imobilização de moléculas biológicas são um fator fundamental nas etapas de desenvolvimento dos biossensores. Essa escolha traz consequências diretas na reprodutibilidade e sensibilidade do sistema. As principais estratégias de imobilização são: adsorção, ligação covalente, encapsulamento, ligação cruzada ou afinidade (Ahuja et al., 2007). Um esquema reunindo as técnicas está demonstrado na Fig 11.

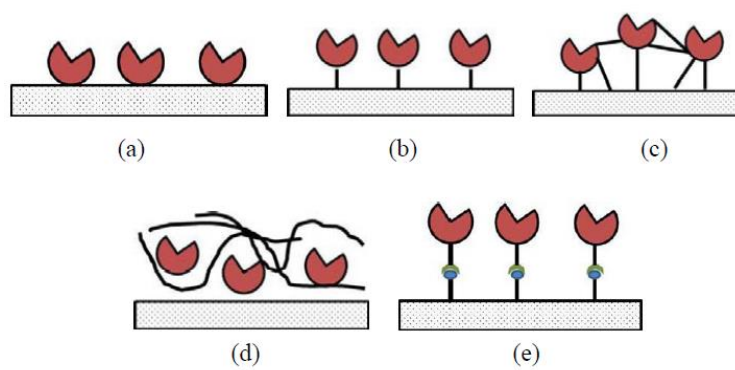


Figura 11 - Principais Estratégias de Imobilização: (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) encapsulamento e (e) afinidade (Oliveira et al., 2013).

O tipo de imobilização afeta a atividade e estabilidade das biomoléculas. Fatores como a precisão das medidas e a repetibilidade são fortemente influenciados pela estabilidade da biomolécula imobilizada (Sassolas et al., 2012). A escolha da técnica de imobilização mais adequada depende da natureza da biomolécula, do transdutor e do método de detecção que será empregado. O melhor método de imobilização também será uma função da propriedade de interesse que desejamos focar durante o projeto do biossensor (Qi et al., 2013).

A necessidade do desenvolvimento de sensores cada vez mais sensíveis e com menor limite de detecção direcionou a investigação de novas estratégias de imobilização. O encapsulamento foi o método utilizado em alguns dos sensores desenvolvidos recentemente. Nele, o elemento biológico se encontra envolto por uma membrana que limita sua contaminação e deterioração. O encapsulamento pode proteger o componente biológico de mudanças na temperatura, pH, força iônica e composição química. Além disso, a membrana

pode ser permeável a algumas substâncias (moléculas pequenas, gases e elétrons) que se deseja detectar (Bucko et al., 2012).

Uma das técnicas utilizadas atualmente consiste na imobilização através de nanoestruturas de polímeros conjugados obtidos por diversas rotas químicas e físicas e que permitem o controle da morfologia e propriedades do sistema híbrido polímero/elemento biológico a nível molecular (Du et al., 2012; Hu et al., 2013; Yang et al., 2013). A tabela 2 reúne informações sobre os principais tipos de imobilização de biomoléculas.

Tabela 2- Principais técnicas de imobilização de biomoléculas. (Adaptado Oliveira et al., 2013)

Método	Natureza	Vantagens	desvantagens	Referência
Adsorção	Ligação fraca	Simplicidade	Dessorção	Goda;Miyahara. (2012) Palacio;Bhushan. (2012)
Ligação covalente	Ligações entre grupos funcionais molécula/matriz	Estabilidade	Matriz não regenerável	Liu et al. (2013) Chlichtiger et al. (2013)
Encapsulamento	Incorporação de gel na matriz polimérica	Versatilidade	Barreira de difusão	Choi et al. (2011) Ozdemir et al. (2012)
Ligação Cruzada	Ligação molécula/agente reticulante	Simplicidade	Perda de atividade biológica	Colak et al. (2012) Yadav et al. (2012)
Afinidade	Afinidade entre grupos funcionais	Imobilização controlada e orientada	Necessidade de grupos específicos	Faharani et al. (2012) Williams et al. (2013)

2.4 Eletrodos quimicamente modificados (EQM): Polímeros e nanomateriais

O termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido por Murray e colaboradores em 1975, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas, deliberadamente imobilizadas em suas superfícies, com o objetivo de pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo/solução. Essa modificação deliberada da superfície do eletrodo permite controlar sua reatividade e/ou seletividade, possibilitando o desenvolvimento de eletrodos para vários propósitos e aplicações (Pereira et al.,2002).

A escolha do material para o eletrodo base, cuja superfície sofrerá a modificação, é um aspecto muito importante da preparação de um EQM. Este substrato deve apresentar

características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais estão ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, pasta de carbono, Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono entre outros (Sotiropoulou et al.,2003; Galli et al.,2006).

Outra técnica utilizada na preparação de eletrodos modificados é o recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos (polianilina, polipirrol, poliacetileno, grafeno etc), que devem ser condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e à espécie de interesse. A incorporação de compósitos também é uma técnica de modificação dos eletrodos para aumentar a eficiência no desenvolvimento de biossensores (Pei et al.,2001).

Nanomaterias de carbono, metálicos, nanopartículas de sílica (PN), *quantum dots* (QDs), *protein cages* e outras nanopartículas (NPs) funcionalizadas têm sido empregadas para a concepção de sensores (Genc et al.,2011; Ge et al.,2013). Os nanomateriais podem ser utilizados como transportadores para carregar marcadores de sinal ou diretamente como repórteres de sinal para detectar biomarcadores de alta sensibilidade, acelerando a transferência de elétrons quando utilizados sobre as superfícies dos eletrodos (Zhang et al.,2011; Ge et al., 2014).

Nanomateriais possuem graus estruturais na ordem de 10^{-9} m ou um nanômetro, que é igual a um milionésimo de milímetro ou um bilionésimo de metro e apresentam propriedades especiais em virtude de sua escala nanométrica. Nanopartículas, nanoesferas e outros materiais nanoestruturados são nanomateriais de interesse por apresentarem aplicações em biotecnologia. Os nanocompósitos são formados pela união de dois ou mais componentes, sendo que em um deles, as suas partículas possuem dimensões da ordem de nanômetros. Estas dimensões aumentam a interação entre a partícula e o meio, melhorando em muito algumas propriedades do nanocompósito em relação ao componente puro (Chen; Chatterjee, 2013).

Eletrodos modificados por nanomateriais, como nanotubos de carbono (CNT), possuem vantagens em termos de elevada área superficial, resistência mecânica, excelente condutividade elétrica e boa estabilidade química (Sotiropoulou et al., 2003; Pan et al., 2010). Em outra abordagem, nanopartículas de ouro podem ser bastante interessantes, como por exemplo, a ligação de nanopartículas à cisteamina. Outros autores têm utilizado nanobastões de ouro (*nanorods*), que podem ser depositados numa superfície plana ou perpendicular, possuindo um diâmetro de cerca de 20 nm e um comprimento de até 2 μ m (Richard et al.,2009; Guo et al.,2011).

Além de propiciar a obtenção de sensores eletroanalíticos mais seletivos e sensíveis, outra característica importante dos EQMs é o fato de possibilitarem a utilização de reagentes imobilizados (Souza, 1996).

2.4.1 Membranas de alumina anódica (AAO)

Diversos tipos de membranas artificiais têm sido investigadas por biotecnólogos, para utilização como suporte para imobilização de biomoléculas. Tais materiais possuem diversas propriedades interessantes como elevada área superficial por unidade de volume e possibilidade de combinar separação com reação química. Dentre os vários tipos de suportes desenvolvidos até o momento, as membranas (AAO) parecem ser um dos materiais mais atraentes para utilização como superfície de matriz nano-estruturados. Este tipo de membrana é uma matriz auto-ordenada com nano-poros adequados para diversas aplicações (Takmakov, et al., 2006; De la escosura –Muñiz; Merkoçi, 2012).

Na área de biossensoriamento, são excelentes suportes para a retenção de grande quantidade de composto bioativo em um filme fino, o que é importante para aumentar a sensibilidade do biossensor e facilitar a difusão de espécies eletroativas em direção à superfície do eletrodo. Devido ao aumento de área superficial, a imobilização de componentes bio-específicos como oligonucleotídeos, enzimas e aptâmeros é mais eficaz, o que aumenta a região de medida dinâmica do sensor. Além disso, promove a diminuição do tempo de resposta e boa estabilidade operacional (Tsou et al., 2010; Venkatesan; Bashir, 2011)

A membrana disponível comercialmente “ANOPORE” (Anodisc 25) é constituída por uma matriz de alumina de alta pureza, que é fabricada por via eletroquímica com as seguintes características: espessura média 60 μm , diâmetro 21 mm, porosidade 25 a 50%, tamanho do poro 0.1 μm e densidades de poros que varia entre 10^8 a 10^{12} poros por cm^2 (Poinern et al., 2011).

A Fig 12-a apresenta um corte esquemático mostrando ssDNA passando por um nanoporo. O detector é constituído por dois eletrodos espaçados ~ 1 nm de distância em lados opostos dos nanoporos. Alterações na corrente de penetração passam através do nanoporo que podem ser usadas para identificar a sequência de bases do DNA. A fig 12-b exibe o esquema do ssDNA passando por uma membrana nanoporosa e grafeno incorporado, mostrando como o DNA se posiciona. A funcionalização dos poros aumenta ainda mais as interações específicas de nucleotídeos.

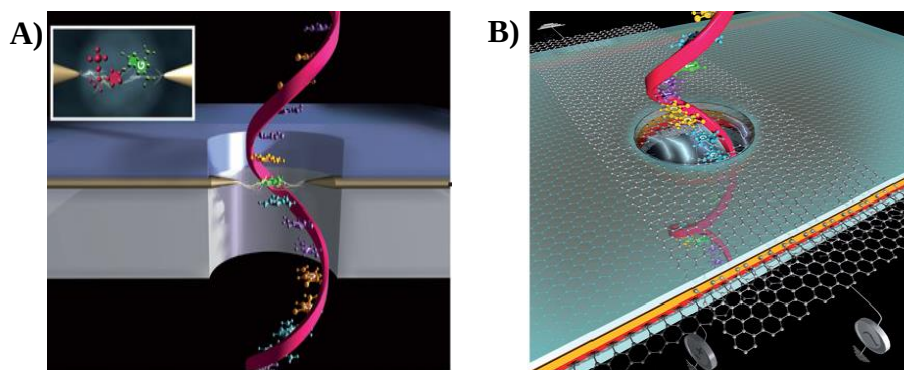


Figura 12- **A)** Sonda de DNA dentro do nanoporo da membrana; **B)** Membrana funcionalizada por grafeno e ssDNA imobilizado visto de cima (Adaptado de Venkatesan; Bashir, 2011).

Trabalhos de revisão foram apresentados por Venkatesan; Basir (2011); Poinern et al. (2011); De la Escosura–Muñiz; Merkoçi (2012), onde descreveram o processo de fabricação das membranas (AAO), detalhando metodologias e características químicas das mesmas, os diversos tipos de caracterizações de nanocanais e materiais nanoporosos, assim como sua aplicação em ambos os sistemas de sensoriamento ótico e eletroquímico. O estudo demonstra como ocorre o transporte seletivo em nanocanais presentes na membrana e seu comportamento para a aplicação em biossensores e desenvolvimento de sistemas baseados em biossensoriamento (Singer et al., 2010; Wanunu et al., 2010; Garaj et al., 2010; Wei et al., 2012). Os autores demonstraram como as membranas (AAO) podem ser utilizadas em uma variedade de aplicações em nanotecnologia, aplicações biológicas, biossensores, dispositivos nano-eletrônicos e membranas filtrantes.

Takmakov et al. (2006) apresentou um tratamento hidrotermal dos poros da membrana AAO. A técnica diminuiu significativamente o tamanho dos nanoporos, permitindo que os oligonucleotídeos fossem imobilizados covalentemente, promovendo um aumento na impedância maior que 50%. Detecção de *Escherichia coli* O157: H7 foi demonstrado por Wang et al. (2009). Foram utilizadas as técnicas de VC e EIS. O estudo apresentou limite de detecção 0.5 nM, e se apresenta como um método rápido e fácil na detecção de bactérias (Fig 13).

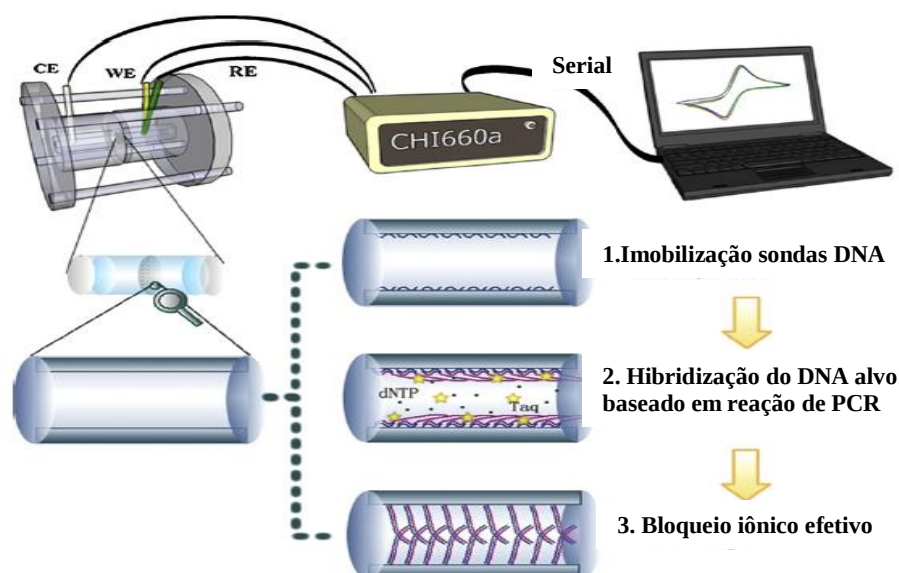


Figura 13-Sistema biossensor eletroquímico de DNA e o mecanismo de detecção da hibridação a partir de PCR (Adaptado Wang et al.,2009).

Li et al. (2010) propuseram um método de detecção *Label free* para análise de DNA morfolino. O limite de detecção encontrado no sistema foi de 0,1nM . Rai et al., (2012) apresentaram um genossensor para detecção do vírus da Dengue. As técnicas eletroquímicas utilizadas foram VC e VPD. O sistema demonstrou um aumento na ordem de grandeza em torno de 6 vezes maior e limite de detecção ultra-sensível de 9.55×10^{-12} M para a quantificação de sequência DNA (Fig 14).

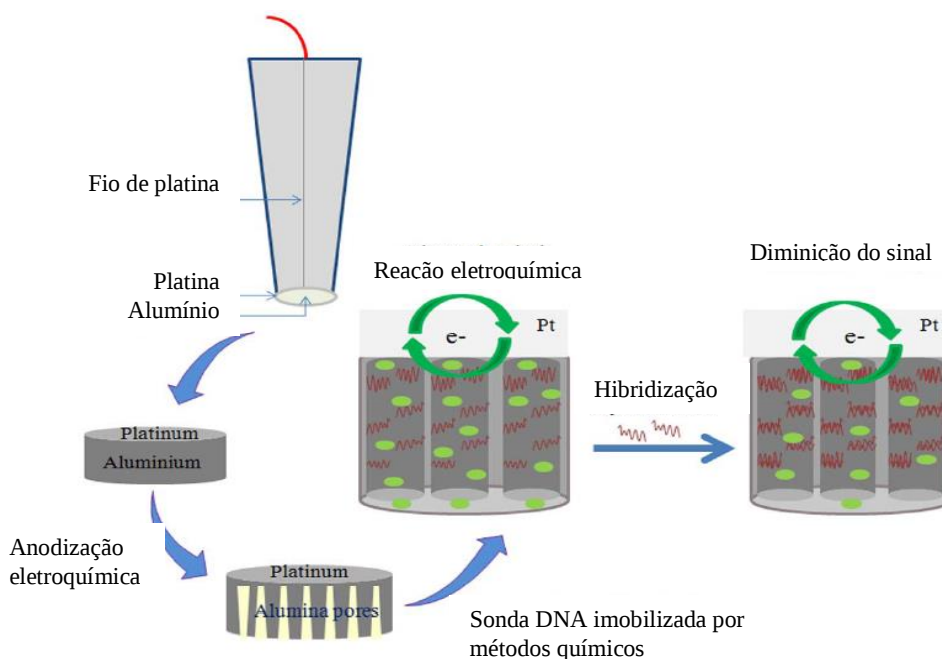


Figura 14- Esquema de funcionamento de genossensor baseado em membrana de alumina (Rai et al., 2012).

Deng; Toh (2013) apresentou um sistema *label-free* para detecção do vírus da Dengue. A técnica de impedância eletroquímica foi utilizada para detectar mudanças dentro dos nanoporos da membrana mediante ligação do DNA. A resistência dos poros (R_p) aumentou linearmente em resposta para o aumento da concentração do DNA alvo na gama de 1×10^{-12} a 1×10^{-6} M.

Um Imunossensor ótico *Label-free* foi desenvolvido para detecção de células tumorais circulantes (CTCs). Um anticorpo biotinilado (anti-EpCAM) foi ligado para detecção de células cancerígenas humanas do pâncreas (PANC-1). Os resultados mostram um limite de detecção de <1000 células/mL, o tempo de resposta de <5 min e o volume da amostra de 50µL (Kumeria et al., 2012). Nguyen et al. (2012) também demonstraram um imunossensor baseado em impedância para detecção de partículas virais do sorotipo 2 de dengue a partir de anticorpo específico IgG. A tabela-3 apresenta trabalhos baseados em eletrodos (AAO).

Tabela 3- Principais referências de eletrodos baseados em mebranas AAO.

Eletrodos		Métodos	Resultados	Detecção	Referência
Genossensor hidrotérmica	AAO-	Impedância	ssDNA ($220 \text{ K}\Omega\text{cm}^{-2}$), dsDNA ($352 \text{ K}\Omega\text{cm}^{-2}$), dsDNA -uréia ($241 \text{ K}\Omega\text{cm}^{-2}$), DNA $\tilde{N}$ comp. ($243 \text{ }\Omega\text{cm}^{-2}$)	Tratamento hidrotermal poros da membrana	Takmakov; Smirnov. (2006)
Genossensor-Aminossilanos – Glu	AAO-	VC e impedância	LOD 0.5 nM		Wang et al. (2009)
Imunossensor Au-AAO-Biotina- estreptavidina		Espectroscopia de interferência reflectométrica	1000–100,000 cells/mL LOD: <1000 cells/mL		Kumeria et al. (2012)
Genossensor-AAO	Platina-	VC e VPD	Aumento corrente 6 vezes maior LOD 9.55×10^{-12} M		Rai et al. (2012)
Imunossensor-AAO		Espectroscopia de Impedância	Denv2 and CHK (R1: $p=0.14$; R2: $p=0.003$; Q2: $p=0.043$); Denv2 and WNV (R1: $p=0.014$; R2: $p=0.002$; Q2: $p=0.74$); CHK and WNV (R1: $p=0.107$; R2: $p=0.047$; Q2: $p=0.060$).		Nguyen et al. (2012)
Genossensor AAO	–Platina-	VPD e Impedância	1×10^{-12} a 1×10^{-6} M		Deng; Toh. (2013)

2.4.2 Eletrodos de carbono impresso

O desenvolvimento de eletrodos de carbono impressos (EIs) ou *screen printing* oferece um completo sistema de eletrodos projetados com grande simplicidade, economia, alta reprodutibilidade e facilidade de fabricação (Bergamini; Zanoni, 2005). O uso dessa tecnologia na produção serial de eletrodos para a determinação eletroquímica é baseado na deposição de filmes finos sobre substratos inertes, sendo bastante adequada para produção em massa de dispositivos portáteis (Nascimento; Angnes, 1998).

Os EIs são produzidos a partir da impressão de diferentes tintas e vários tipos de substratos inertes, a maioria de PVC, policarbonato, poliéster ou cerâmica (Wang et al., 2008). Tintas de carbono ou metálicas (platina, ouro e prata) têm sido comumente utilizadas para impressão de sensores. Em particular, as tintas de carbono têm se destacado como filme condutor mais utilizado na fabricação de EIs, devido às suas características atrativas, tais como ampla janela de potencial, boa condutividade elétrica, estabilidade, baixa corrente residual e baixo custo (Uslu; Ozkan, 2007; Zhang et al., 2011). O material impresso pode ser alterado pela adição de diferentes substâncias, tais como metais, enzimas, polímeros, agentes complexantes, dentre outros. Assim, a seletividade e a sensibilidade requeridas para cada análise são determinadas pela composição da pasta utilizada para impressão dos eletrodos (Renedo et al., 2007; Mello; Kubota, 2002; Avramescu et al., 2002).

2.4.3 Polímeros condutores: Polianilina (PANI) e Polipirrol (PPy)

Os polímeros condutores (PCs) são caracterizados por uma sequência de ligações duplas conjugadas na cadeia polimérica, alternando o estado de isolantes a condutores e vice-versa através de um processo de oxidação-redução, também conhecido como dopagem e desdopagem (Dhand et al., 2011).

Polímeros condutores são constituídos por ligações duplas conjugadas que são responsáveis pela superposição das nuvens eletrônicas, contribuindo, portanto, para a condução. Estes passam de isolantes para condutores após processos reversíveis de oxidação e/ou redução do sistema π conjugado. As reações de oxidação ou redução na cadeia poliênica têm como consequência a formação de cargas deslocalizadas, positivas ou negativas, as quais são balanceadas pela incorporação de contra-íons (ânions ou cátions) denominados de dopantes (Medeiros et al., 2012).

Os PCs contêm elétrons policonjugados que conferem propriedades características como condutividade elétrica, baixa energia de transmissão ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica, semelhantes a materiais inorgânicos. Com modificações químicas apropriadas, eles podem exibir um intervalo de condutividades desde semicondutor até condutor, chegando a condutividades comparáveis à do cobre (10^6 S.cm^{-1}). Dentre as famílias mais estudadas estão o poliacetileno, polianilina, polipirrol e politiofeno (Fig 15) (Daltamir et al., 1999; Peng et al., 2009).

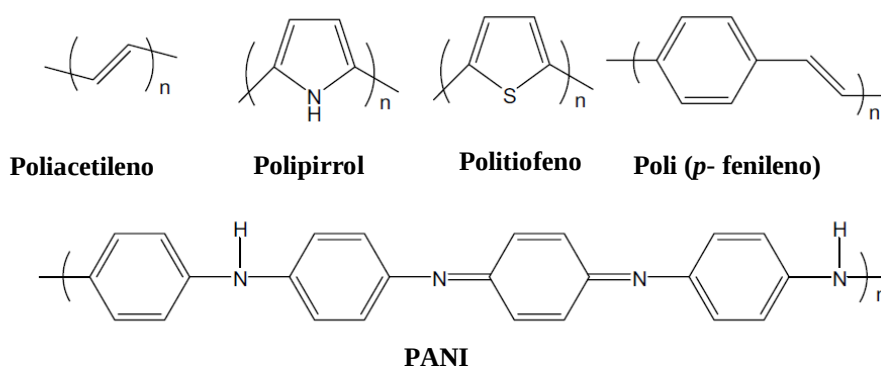


Figura 15- Estrutura química dos polímeros condutores mais utilizados em biossensores (Adaptado de Peng et al., 2009).

Alguns autores demonstraram a formação do complexo PANI-DNA para fabricação de biossensores (Fig 16). Diferentes tipos de superfícies foram utilizadas, tais como Eletrodos de grafite (Wang; Kawde, 2001), (Kang et al., 2004) ouro (Kerman et al., 2003) polipirrol (Wang et al., 2011; Monosik et al., 2012; Huang et al., 2012).

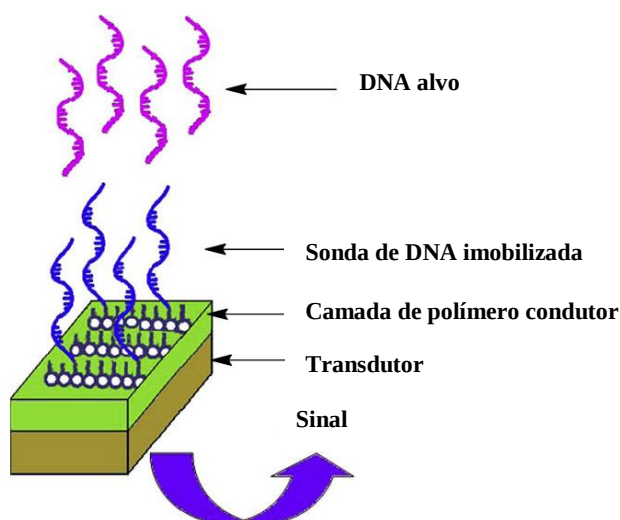


Figura 16- Esquema geral de genossensores baseados em polímeros condutores (Adaptado de Peng et al., 2009).

✓ Polianilina

Dentre os polímeros derivados da anilina, a PANI é sem dúvida, o polímero condutor que tem recebido maior atenção, devido principalmente à estabilidade química de sua forma condutora, facilidade de polimerização e dopagem de baixo custo (Fig 17). As PANIs representam uma classe de polímeros cuja composição química na forma base, não dopada, consiste de unidades repetitivas alternadas pelas formas reduzida (n- diamina benzóide) e oxidada (m- diamina quinoide), unidades onde o estado de oxidação podem ser definidas pelo valor de “m”. As PANIs podem existir em vários estados de oxidação, cada um dos quais tem um nome que foi atribuído originalmente por Green e Woodhead (Stejkal; Gilbert, 2002).

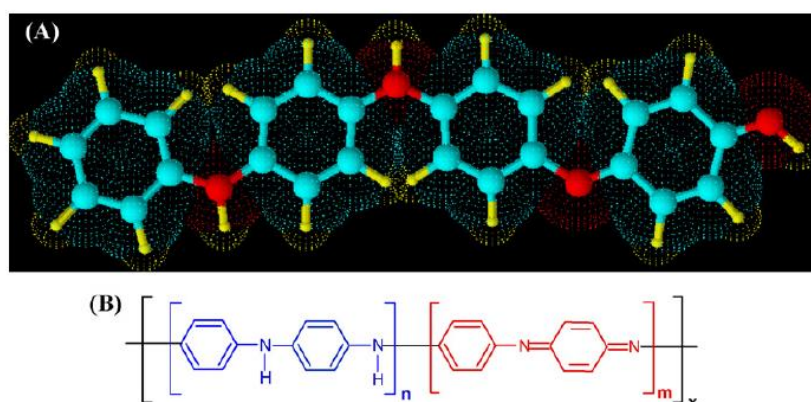


Figura 17- Estrutura geral da PANI (Adaptado de Dhand et al.,2011)

Esses estados vão desde a forma completamente reduzida/Leucoesmeraldina (LE), parcialmente oxidada/Esmeraldina (EB) até a completamente Oxidada/ Pernigranilina (PG). A forma esmeraldina da PANI, muitas vezes referida como base esmeraldina (EB), neutra ou dopada, apresenta nitrogênios imina protonados por um ácido. A EB é considerada como a forma mais útil de PANI devido à sua elevada estabilidade à temperatura ambiente e, além disso, a sua forma dopada (sal esmeraldina; ES) é eletricamente condutora. As outras duas formas são pobres condutoras, mesmo quando dopadas com um ácido. Estas formas podem ser interconvertidas por oxidação química e/ou eletroquímica ou redução.

No entanto, a PANI pode ser dopada por protonação, isto é, sem que ocorra alteração no número de elétrons associados à cadeia polimérica. Nitrogênios imínicos e amínicos destas espécies podem estar total ou parcialmente protonados, dependendo do pH da solução à qual o

polímero foi exposto, obtendo-se o polímero na forma de sal (forma dopada). O sal esmeraldina é a forma estrutural onde a PANI alcança os maiores valores de condutividade (Dhand et al., 2011). Através de reações de oxidação e redução, bem como de tratamentos com ácidos e bases, é possível converter reversivelmente a PANI em suas diferentes formas, o que confere a este polímero um grande potencial de aplicações tecnológicas (Fig 18) (Syed; Dinesan, 1991).

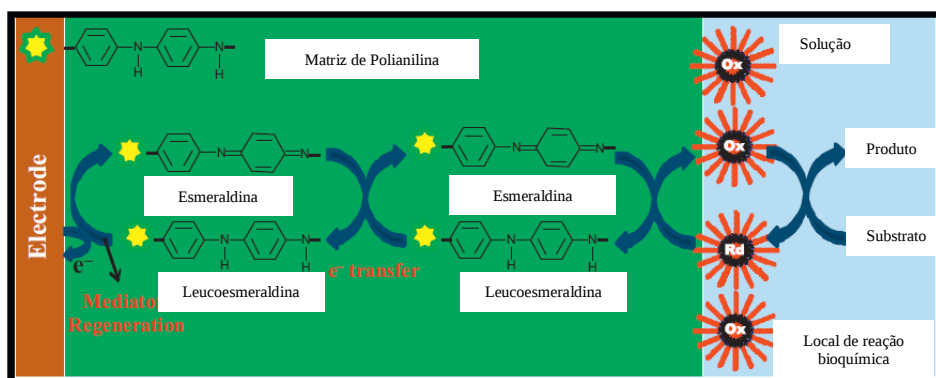


Figura 18- Esquema de transferência de elétrons no eletrodo polimerizado por PANI em biossensor amperométrico (Dhand et al., 2011).

O princípio do reconhecimento molecular de biossensores de DNA utilizando polímeros condutores é realizado pela hibridização das moléculas de oligonucleotídeos presentes na superfície do sensor mediada pelo polímero condutor (Arora et al., 2007; Liu et al., 2012). Tal processo pode causar mudanças conformacionais na estrutura do polímero que refletem em mudanças em suas propriedades eletroativas (Fig 19).

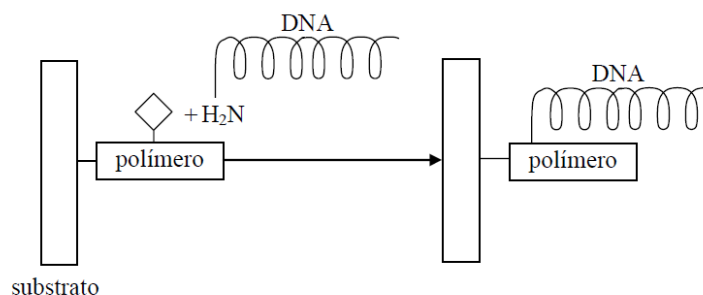


Figura 19- Representação do princípio de funcionamento de biossensores baseados em polímeros funcionalizados com DNA (Oliveira et al., 2013).

Segundo Dhand et al. (2011) a PANI apresenta diversas características vantajosas na utilização em plataformas para biossensores : 1) deposição direta e fácil sobre o eletrodo sensor; 2) controle de espessura; 3) características de condutividade e redox polieletrólito; 4) área de superfície elevada; 5) especificidades químicas; 6) a estabilidade ambiental a longo prazo; e 7) propriedades controladas.

Recentemente foram demonstrados na literatura diversos estudos de genossensores utilizando PANI como polímero condutor (Zhang et al., 2009 a,b; Zhou et al., 2009; Du et al., 2010; Ren et al., 2010; Sheng et al., 2010; Bo et al., 2011; Dhand et al., 2011; Nascimento et al., 2011; Spain et al., 2011; Narang et al., 2012; Singh et al., 2012; Du et al., 2012; Chen et al., 2012; Zhao et al., 2012; Hu et al., 2013; Yang et al., 2013).

Biossensores para detecção de DNA baseados em grafeno e grafite foram quantitativamente desenvolvidos recentemente. Um genossensor ultra-sensível utilizando eletrodo de grafite e nanotubos de PANI foi usado para detecção de mutações genéticas. O biossensor demonstrou boa capacidade de diferenciar o oligonucleotídeo alvo, sendo bastante específico mesmo em concentração de 37.59 fM (Chang et al., 2007). Bo et al. (2011) desenvolveu um genossensor baseado em eletrodo de carbono vítreo e modificado por grafeno oxidado e nanofios de PANI (ws). A resposta da corrente do sensor aumentou linearmente com concentração de alvo a partir de 2.12×10^{-6} e 2.12×10^{-12} mol L⁻¹ e coeficiente relativo de 0,9938. O limite de detecção encontrado foi 3.25×10^{-13} mol L⁻¹.

Outros genossensores baseados na redução eletroquímica de óxido de grafeno e PANI foram demonstrados. Um foi preparado com PANI modificado o eletrodo de carbono vítreo (GCE). A sonda de DNA foi ligada à superfície do eletrodo através do empilhamento π - π entre as nucleobases e estrutura do nanocompósito conjugado. O biossensor apresentado teve uma detecção limite de 2.5×10^{-16} mol/L, devido ao efeito sinérgico do nanocompósito. O gene sintético *fosfinotricina-acetiltransferase (PAT)* também foi detectado, demonstrando a capacidade de ERGNO / PANI (Fig 20) (Yang et al., 2013).

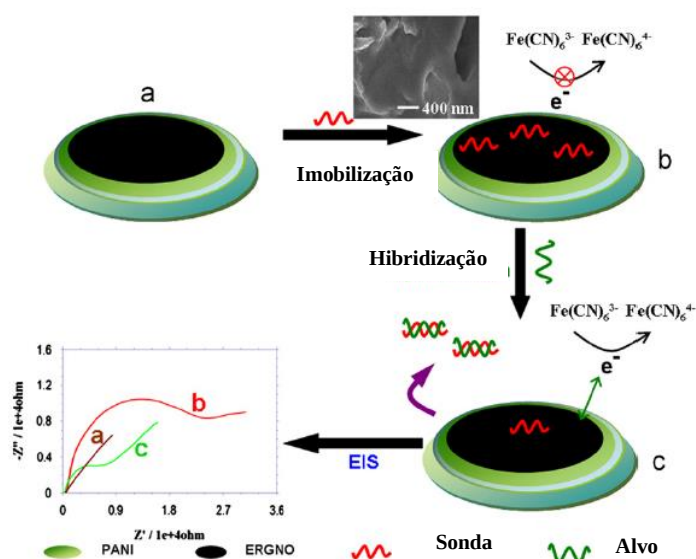


Figura 20- Representação esquemática da imobilização e hibridização do DNA no ERGNO/PANI/GCE (Yang et al.,2013).

Sistemas para detecção de uma sequência específica do gene do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S) foram descritos por Du et al. (2012), Hu et al. (2013) e Wang et al. (2011). No primeiro trabalho, o eletrodo de carbono vítreo foi preparado a partir de síntese eletroquímica por óxido de grafeno reduzida (ERGNO) e nanofibras de polianilina (PANI). No segundo trabalho, a dopagem por PANI (SPAN) foi adotada como plataforma de um biossensor DNA *Label-free*. O híbrido reticulado foi ligado a um eletrodo de ouro por uma monocamada p-aminotiofenol (PATP), previamente, com base na ligação fosforamidato entre PATP-ssDNA.

Os autores Du et al.(2010), Ren et al. (2010) e Wang et al.(2011), demonstraram genossensores baseados em PANI combinada com nanopartículas de ouro. Um eletrodo à base de nanofibras de PANI sulfonada (SPAN) e nanopartículas de ouro/cisteamina CA-G_{NP} em camadas alternadas foi preparado. O DNA alvo foi detectado até 2.13×10^{-13} mol /L e a viabilidade para a detecção de DNA não complementar também foi demonstrada Du et al.(2010). Outro sensor cronocoulométrico de DNA com eletrodo *screen-printed* dopado por nanotubos de PANI (PANINTs) e sondas marcadas por nanopartículas de ouro foram utilizados. O limite de detecção foi de 8.0×10^{-17} M (Fig 21) (Ren et al.,2010).

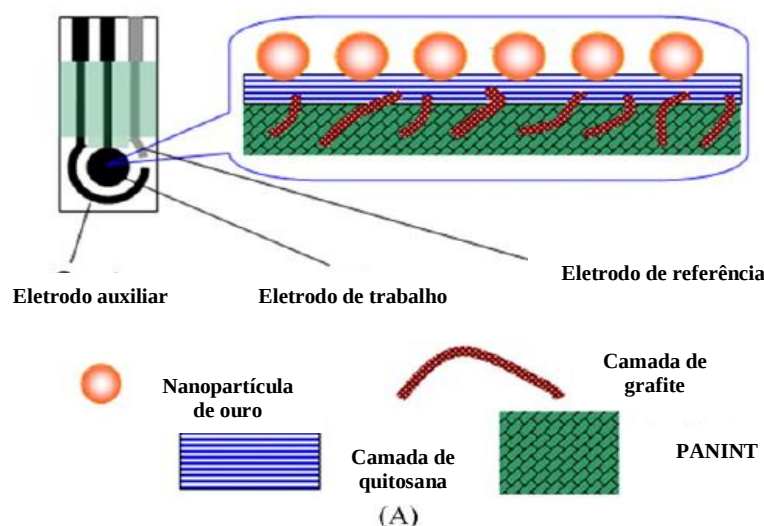


Figura 21-Estrutura do biossensor PANINT-IL/chitosan/AuNP SPE (Ren et al.,2010).

Outro eletrodo de ouro foi modificado por nanopartículas de ouro e PANI (AuNpPANI) para o desenvolvimento do sensor. O sistema foi desenvolvido para detecção de sorotipos 1, 2 e 3 da Dengue (Fig 22) (Nascimento et al.,2011).

Biossensores baseados em aptâmeros possuem mais especificidade do que os que utilizam sondas oligonucleotídicas de menor tamanho. Um aptasensor *Label-free* baseado em nanocompósitos de grafeno e PANI (GR-PANI) foi demonstrado para detecção de dopamina (DA) em amostras de soro humano. A nanoestrutura altamente condutora biocompatível foi caracterizada por microscopia de varredura MEV, VC e EIS. O aptasensor apresentou resposta linear de (0.007-90 nmol/L) e limite de detecção de 0.00198 nmol / L ($S/N = 3$) (Fig 23) (Liu et al., 2012).

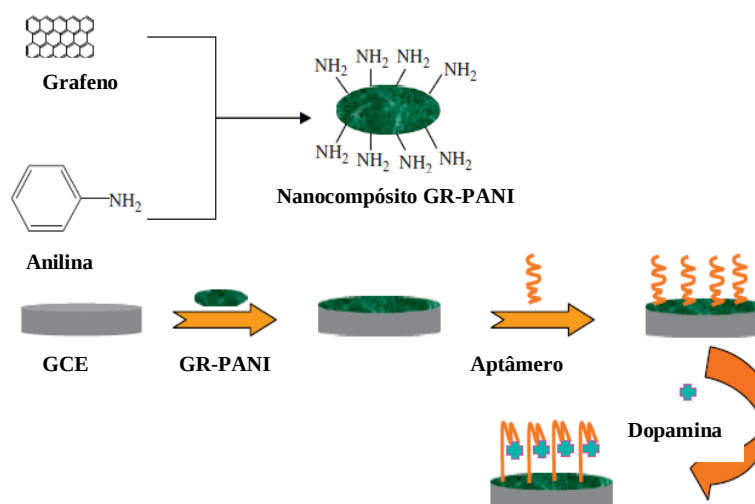


Figura 22-Ilustração esquemática de aptasensor eletroquímico baseado em nanocompósitos GR-PANI (Liu et al.,2012).

A tabela 4 ilustra sistemas genossensores baseados em PANI como polímero condutor.

Tabela 4- Principais referências de genossensores baseados em polianilina (PANI).

Eletrodos	Métodos	Resultados	Deteção	Referência
Genossensor-BDC-avidina-PANI	VPD e EIS	0.00025–0.125 fmol LOD 0.125 fmol	<i>E.coli</i>	Arora et al. (2007)
Genossensor-AAO-Grafite-PANI	VC eVPD	De 1.0 fmol a 37.59 fmol	mutações genéticas	Chang et al. (2007)
Genossensor PNA-PANI/Au DNA-PANI/Au	VC, VOQ, EIS e FT-IR	PNA-PANI/Au (0.125×10^{-18} M) DNA-PANI/Au (2.5×10^{-18} M)	<i>M.tuberculosis</i>	Prabhakar et al. (2008)
Genossensor-3DOM-SPAN/PB	VC e Cronoamperometria	De 2 a 1600 μ M LOD 0.4 μ M	Glicose sanguínea	Chen et al. (2008)
Genossensor DNA-PNA-PANI	SPR	<5nM	PNA-HRP	Su et al. (2008)
Genossensor-Fe₂O₃/SPAN	VC e EIS	1.0×10^{-13} to 1.0×10^{-7} mol/L, LOD- 2.1×10^{-14} mol/L	fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase)	Zhang et al. (2009)
Genossensor-ssDNA tiolado/PANI	VC	LOD 0.1 nM	Mutações genéticas	Zhou et al. (2009)
Genossensor-SPAN- CA-G_{NP}	EIS e Cronoamperometria	LOD 2.13×10^{-13} mol / L	Sequências de DNA incompatíveis	Du et al. (2010)
Genossensor-PANINT-IL/chitosan/AuNP SPE	VC e Cronocoulometria	1.0×10^{-16} M a 1.0×10^{-14} M e LOD 8.0×10^{-17} M	Sequências de DNA incompatíveis	Ren et al. (2010)
Genossensor-AuPANI/Biotina-estreptavidina-HRP	VC,EIS,PCR	LOD 0.5pM	<i>T. pallidum</i>	Sheng et al.(2010)
Genossensor -aDNA-Glu-PANI-CNT/ITO	VC, VPD e FT-IR	1×10^{-6} e 1×10^{-17} LOD 1.2×10^{-17}	<i>N. gonorrhoeae</i>	Singh et al. (2010)
Genossensor-Grafeno-PANIw-	VC e EIS	2.12×10^{-6} e 2.12×10^{-12} mol L ⁻¹ LOD	Sequências de	Bo et al. (2011)

DNA		$3.25 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$	DNA incompatíveis	
Genossensor- AuNP/PANI	EIS e VC	ΔR_{ct} (%) - ST1 (87.5%), ST2 (71.03%) e ST3 (64%)	Dengue (sorotipos 1, 2 e 3)	Nascimento et al. (2011)
Genossensor- HHFAu/nanoSPA N/GCE	VC e EIS	$1.0 \times 10^{-13} \text{ M}$ to $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$ e LOD 1.9×10^{-14}	vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S)	Wang et al. (2011)
Aptassensor- DNA/PANI- SA/ITO	VC, EIS e FT-IR	$1.21 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ LOD - 0.1ng/mL	<i>Aspergillus</i> <i>Ochraceus</i> / <i>Penicillium</i> <i>Verrucosum</i>	Prabhakar et al. (2011)
Genossensor PANI-NF-AuNP	VC e EIS	150×10^{-12} to $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	<i>S. aureus</i>	Spain et al. (2011)
Aptassensor- GR- PANI	VC, VOQ e EIS	0.007-90 nmol/L LOD- 0.00198 nmol / L	Dopamina em soro humano	Liu et al. (2012)
Genossensor- GCE-ERGNO- PANI	VC, VPD, VPD e EIS	1.0×10^{-13} a $1.0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ LOD- $3.2 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$.	vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S)	Du et al. (2012)
Aptasensor- CNTs-PANI	VC e EIS	LOD 80nM (SWCNT) 71 nM (PANI)	Trombina	Duzgun et al. (2013)
Genossensor-Au- SPAN PATP	VC e EIS	$1.0 \times 10^{-14} \text{ mol L}^{-1}$ a $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ¹ LOD- $2.3 \times 10^{-15} \text{ mol L}^{-1}$	vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S)	Hu et al. (2013)
Aptassensor- ERGNO-PANI- GCE	EIS	1.0×10^{-15} a $1.0 \times 10^{-8} \text{ mol / L}$ LOD $2.5 \times 10^{-16} \text{ mol / L}$	fosfinotricina-acetiltransferase (PAT)	Yang et al. (2013)
Aptâmeros PANI- DNA-HRP	CV e VPD	$1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ a $1.0 \times 10^{-6} \text{ M}$, LOD- $5.0 \times 10^{-10} \text{ M}$.	DNAzimas- peroxidase	Li et al. (2013)
Genossensor PANI-HRP	CV e UV-Vis	LOD 1.0 fmol	Heptite B	Hao et al.(2014)

✓ Polipirrol

Dentre os diversos polímeros condutores, o PPy é bastante utilizado na área de biotecnologia. O PPy é muito atraente porque é mais facilmente depositado em soluções aquosas de pH neutro. Devido à sua elevada condutividade elétrica, longa estabilidade

ambiental e facilidade de síntese química, o PPy tem sido bastante utilizado para construir os sensores químicos para imobilizar biomoléculas, apresentando bastante eficiência como eletro-catalisadores (Tokonami et al.,2012; Zhang et al.,2009; Booth et al., 2011; Elahi et al., 2011).

O PPy é utilizado em diversos tipos de biossensores, como por exemplo, baseados em enzimas imobilizadas, os anticorpos ou DNA fita simples (Yildiz et al.,2007; Arora et al.,2007; Banu et al.,2008; Elkaoutit et al.,2011). Para melhorar as suas funções, o PPy pode ser facilmente modificado por grupos redox covalentemente ligados e proteínas ou moléculas de vários pesos moleculares (Chen; Lei, 2010; Ramanaviciene et al.,2011; Pertines et al.,2011; Li et al.,2012).

Alguns metais em forma de nanopartículas favorecem a interface de detecção facilitando a transferência de elétrons, podendo, desta forma, melhorar significativamente a sensibilidade do sistema. Entre as nanopartículas metálicas, o Ouro (Au) e a platina (Pt) receberam atenção considerável. Elas apresentam boa catálise e resistência à desativação devido à ação altamente sinérgica entre o ouro e platina (Aslan et al.,2006; Kang et al.,2008; Xiao et al.,2009). Em comparação com as películas convencionais, nanomateriais de polímeros condutores têm características marcantes: derivados de propriedades eletrônicas, elevada área superficial e pequenas dimensões (Jang et al.,2005; Yoon et al.,2007; Yoon et al.,2008).

Um nanohíbrido de nanopartículas de ouro, PPy e folhas de óxido de grafeno reduzido (Au-PPy-RGO) foi desenvolvido por deposição eletroquímica de redução de óxido de grafeno com polipirrol e nanopartículas de ouro. A acetilcolinesterase (AChE) foi adicionalmente encapsulada numa matriz de sílica e imobilizada sobre o nanocompósito Au-PPy-RGO por co-deposição com (NH₄). Sob condições ideais, o biossensor conduziu à detecção rápida e sensível de paraoxon-acetato de 1.0 nM a 5 µM, com um limite de detecção de 0.5 nM (Yang et al.,2014).

Um sensor de amônia baseado em PPy foi realizado no início das práticas dos sensores π conjugado (Soures et al.,2012). Outros autores desenvolveram sistemas biossensores baseados em PPy como polímero condutor (Li et al.,2008; Ma et al.,2009; Lahiff et al.,2010; Hagen et al.,2011; Hahm et al.,2011; Zhang et al.,2012; Raicopol et al.,2013; Safarnavadeh et al.,2013;Yang et al.,2014; Batra et al.,2014).

2.4.4 Nanobastões de ouro (*nanorods*)

Nos últimos dez anos, a utilização de nanopartículas de ouro teve um progresso significativo, particularmente em biologia e nanomedicina, aplicações terapêuticas e de imagem. Devido à sua estabilidade superior e a recuperação completa em processos bioquímicos redox, as nanopartículas de ouro têm sido aplicadas como catalisadores em diversas aplicações biomédicas (Zang et al., 2013). Além disso, abre a possibilidade para a miniaturização dos dispositivos de detecção para a nanoescala, oferecendo excelentes perspectivas para detecção química e biológica. As nanopartículas de metais nobres são amplamente reconhecidas como ideais na fabricação de sensores eletroquímicos (Fig 24) (Chen; Chatterjee, 2013).

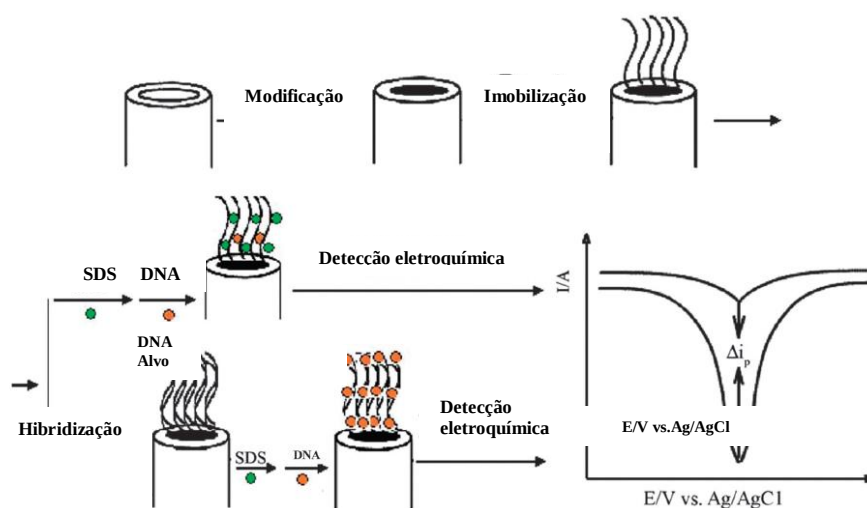


Figura 23- Representação esquemática da detecção eletroquímica de hibridização de DNA baseada em nanopartículas de platina combinada com MWNTs (Chen; Chatterjee, 2013).

As nanopartículas e *Nanorods* têm encontrado exploração significativa na área biomédica devido a: (1) sua estabilidade química comparativa, o que os torna menos perigosos; (2) síntese simples e direta e processo de fabricação; e (3) uma verdadeira biocompatibilidade e não-interferência com outros biomateriais marcados (por exemplo, anticorpos e outros biomarcadores (Ho et al., 2010)).

A superfície de AuNRs pode ser facilmente modificada com ligantes que contêm grupos funcionais com afinidade para superfícies de ouro, como tióis e aminas. A conjugação de

biomoléculas aos grupos funcionais específicos para ancorar os ligantes, tais como proteínas, oligonucleotídeos e anticorpos, proporcionam ainda maior funcionalidade aos AuNRs (Ge et al., 2014). Os meios de funcionalização proporcionam elevada densidade de biomoléculas sobre a superfície do sensor, melhor bioatividade, especificidade e acessibilidade a molécula alvo (Huang et al., 2010).

Sharma et al. (2008) utilizaram nanopartículas de ouro em eletrodos modificados com MWNTs para detectar a proteína rica em histidina de *Plasmodium falciparum* no soro de seres humanos com malária, com limite de detecção de 8 ng mL^{-1} . O desenvolvimento de um sistema sensível à glicose, com base na redução enzimática do FAD por glucose utilizando ouro e nanopartículas de prata, foi descrito por Scodeller et al. (2008).

Mahmoud; Luong (2008) desenvolveu um ensaio baseado em um eletrodo de ouro/nanopartículas de ouro SWNT, derivadas com tiol conjugados ao ferroceno – pepstatina e foi capaz de detectar níveis picomolares de HIV-1 protease e seus inibidores, utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica.

Um imunossensor com base na diamina de etileno enxertado e uma monocamada de nanopartículas de ouro foi desenvolvido por Yang et al. (2009) para a detecção de *Salmonella spp.* As amostras analisadas foram de carne de porco comercial processadas em laboratório e demonstraram um limite de detecção de 100 UFC mL^{-1} . Outro imunossensor foi elaborado por Munge et al. (2011) para detectar o cancro biomarcador interleucina - 8 usando a glutatona derivado de nanopartículas.

Outros três sistemas igualmente importantes merecem ser citados. Jensen et al. (2011) detectaram um biomarcador de câncer interleucina-6 diretamente no soro com um limite de detecção de 20 pg mL^{-1} . Yin et al. (2011) modificaram superfícies de poli (ácido acrílico - estireno) com nanoesferas de ouro, que serviram como conjugado de fosfatase alcalina na detecção do fator de necrose tumoral. Nanopartículas de ouro, óxido férrico e nanotubos de carbono foram combinados para permitir a detecção de tumores através de alfa-fetoproteína como biomarcador (Meng et al., 2011).

Após a exposição de diversos métodos biossensores quimicamente modificados, o presente trabalho teve o objetivo de desenvolver dois sistemas de diagnósticos *label-free*. O método para detecção de papilomavírus bovino (BPV) foi desenvolvido em eletrodos Membrana óxido de alumínio anódico (AAO) modificados por Polianilina (PANI) enquanto o método de detecção para o vírus da Dengue (DENV) foi fabricado a partir de eletrodos impressos de carbono, quimicamente modificados por nanorods de ouro e Polipirrol.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados por Polianilina e Polipirrol.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Construir sistema genossensor a partir de oligonucleotídeos específicos de papilomavírus bovino (sondas sintéticas e amostras biológicas) em eletrodo AAO-PANI;
- ✓ Desenvolver Imunossensor em eletrodos impressos de carbono modificados por filme Polipirrol/Polipirrol-2-Ácido carboxílico (PPy-PPa) e nanobastões de ouro (AuNRs);
- ✓ Realizar testes eletroquímicos, através das técnicas de voltametria cíclica (VC) e pulso diferencial (VPD) para avaliação das respostas dos sensores;
- ✓ Analisar superfícies modificadas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) e espectroscopia (UV-Vis);
- ✓ Otimizar parâmetros experimentais dos biossensores para detecção do papilomavírus bovino e proteína não estrutural NS1;
- ✓ Avaliar parâmetros de repetibilidade, reprodutibilidade e estabilidade das respostas eletroquímicas dos sensores.

4. REFERÊNCIAS

- AHAMMAD, A. J. S; LEE, J; RAHMAN, M.D.A. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **Sensors**, v. 9, n. 4, p. 2289–2319, 2009.
- AHUJA, T; M. I. R, I. A; KUMAR, D. et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791–805, 2007.
- ALCON, S; TALARMIN, A; DEBRUYNE, M. et al. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Specific to Dengue Virus Type 1 Nonstructural Protein NS1 Reveals Circulation of the Antigen in the Blood during the Acute Phase of Disease in Patients Experiencing Primary or Secondary Infections Enzyme-Linked Immunosorb. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n. 2, p 376–381, 2002. Doi:10.1128/JCM.40.2.376.
- ALFIERI, A; ALFIERI, A. F; TAKIUCHI, E. et al. *Reoviridae*. In: FLORES E. F. (Ed.), **Virologia Veterinária**. EDUFMS, Santa Maria, 2007. p. 773-807.
- ALKIRE, C; DIETER, M; KOLB, J. L. et al. **Chemically Modified Electrodes**, Germany, WILEY-VCH, 2009. Advances in Electrochemical Science and Engineering, v.7. ISBN: 978-3-527-61690-9.
- ANTONSSON, A; GO, B. Healthy Skin of Many Animal Species Harbors Papillomaviruses Which Are Closely Related to Their Human Counterparts. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p. 12537–12542, 2002.
- ARORA, K; PRABHAKAR, N; CHAND, S. et al. Ultrasensitive DNA hybridization biosensor based on polyaniline. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 5, p. 613–620, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855071>>. Acesso em: 24 jan. 2014.
- ASLAN, K; MALYN, S. N; GEDDES, C. D. Multicolor Microwave-Triggered Metal-Enhanced Chemiluminescence. **Journal American Chemical Society**, v.128, n. 41, p. 13372–13373, 2006. DOI: 10.1021/ja065571.
- ASSENBERG, R; MASTRANGELO, E; WALTER, T. S. et al. Crystal structure of a novel conformational state of the flavivirus NS3 protein: implications for polyprotein processing and viral replication. **Journal Virology**, v.83, p. 12895-12906, 2009.
- BAGARELLI, L; OLIANI, A. H. Tipagem e estado físico de papiloma vírus humano in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 59-64, 2004. Doi: 10.1590/S0100-72032004000100009.
- BANU, A; RADOVICI, O; MARCU, M. Electrochemical synthesis and characterization of a polypyrrole/lipase composite film. **Romanian Biotechnological Letters**, v.13, n.1, p.3551–3556, 2008.
- BARD, A. J; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: fundamentals and applications**. 2.ed, New York, John Wiley& Sons, 2001.

- BARTOSIK, M; HRSTKA R; PALECEK, E. et al. Magnetic bead-based hybridization assay for electrochemical detection of microRNA. **Analytica Chimica Acta**, v.813, p.35-40, 2014. Doi: 10.1016/j.aca.2014.01.023.
- BATRA, B; KUMARI, S; PUNDIR, C. S. Construction of glutamate biosensor based on covalent immobilization of glutamate oxidase on polypyrrol and nanoparticles/polyaniline modified gold electrode. **Enzyme Microbial Technology**. v.57, p.69-77, 2014. Doi: 10.1016/j.enzmtec.2014.02.001.
- BERNARD, H; BURK, R. D; CHEN, Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n.1, p. 70–79, 2010.
- BLACKSELL, S. D; MAMMEN, M. P; THONGPASEUTH, S. et al. Evaluation of the Panbio Dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute Dengue infections in Laos. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, n. 1, p. 43–49, 2008.
- BLACKSELL, S. D; JARMAN, R. G; BAILEY, M. S. et al. Evaluation of six commercial point-of-care tests for diagnosis of acute Dengue infections: the need for combining NS1 antigen and IgM/IgG antibody detection to achieve acceptable levels of accuracy. **Clinical and Vaccine Immunology**: CVI, v. 18, n. 12, p. 2095–2101, 2011.
- BLOK, J; MCWILLIAM, S. M; BUTLER, H. C. et al. Comparison of a Dengue-2 virus and its candidate vaccine derivative: sequence relationships with the flaviviruses and other viruses. **Virology**, v. 187, n. 2, p. 573–590, 1992.
- BO, Y; YANG, H; YING, H. U. et al. A novel electrochemical DNA biosensor based on graphene and polyaniline nanowires. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 6, p. 2676–2681, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468610016671>>. Acesso em: 24 jan. 2014.
- BOGAERT, L; MARTENS, A; VAN POUCKE, M. et al. High prevalence of bovine papillomaviral DNA in the normal skin of equine sarcoid-affected and healthy horses. **Veterinary Microbiology**, v.129, n.1-2, p. 58-68, 2008.
- BOOTH, M.A; S. HARBISON; J. TRAVAS-SEJDIC. Development of an electrochemical polypyrrole based DNA sensor and subsequent studies on the effects of probe and target length on performance. **Biosensors and Bioelectronics**, v.28. n.1, p. 362- 367, 2011.
- BORGMANN, S; SCHULTE, A; NEUGEBAUER, S. et al. Amperometric Biosensors. **Advances in Electrochemical Science and Engineering**. Weinheim: Richard C. Alkire, Dieter M. Kolb, and Jacek Lipkowski WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011. ISBN: 978-3-527-32885-7.
- BORZACCHIELLO, G; AMBROSIO, V; ROPERTO. et al. Bovine papillomavirus type 4 in oesophageal papillomas of cattle from the South of Italy. **Journal of Comparative Pathology**, v.128, p. 203-206, 2003.
- BORZACCHIELLO, G; ROPERTO, F; Review: *Bovine papillomaviruses* , papillomas and cancer in cattle. **Veterinary Research**, v.39, n.5, p.39-45, 2008.

- BRANDT, S; HARALAMBUS, R; SCHOSTER, A. et al. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. **Journal of General Virology**, v.89, p. 1390-1395, 2008.
- BRANDT, W. E; CHIEWSLIP, D; HARRIS, D. L; RUSSELL, P. K. Partial purification and characterization of a Dengue virus soluble complement-fixing antigen. **Journal of Immunology**, v. 105, n. 6, p. 1565–1568, 1970.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dengue: diagnóstico e manejo clínico - criança**. Brasília, DF, 2011.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Análise da situação das doenças transmissíveis no Brasil no período de 2000 a 2010**. Brasília, DF, 2011.
- BRAVO, I. G; SANJOSÉ, S; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends Microbiology**, v. 18, n.10, p.432- 438, 2010.
- BRITO-MADURRO, A. G; FERREIRA, L. F; VIEIRA, S.N. Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v.42, n.9, p.3238-3243, 2007.
- BRUSCIOTTI, F; DUBY, P. Cyclic voltammetry study of arsenic in acidic solutions. **Eletrochimica Acta**, v.52, n.24, p.6644-6649, 2007.
- BUCKO, M. et al. Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems. **Chemical Papers**, v. 66, n.11, p. 983-998, 2012.
- CALVO, E. J; DANILOWICZ, C. Amperometric enzyme electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.8, n.6, p.563-574, 1997. ISSN 0103-5053.
- CAMPÀS, M; CARPENTIER, R; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 26, n.4, p. 370-378, 2008.
- CAMPO, M. S; Review bovine papillomavirus and cancer. **Veterinary Journal**, v. 154, n.3, p. 175-188, 1997.
- CAMPO, M. S; Bovine papillomavirus: old system, new lessons? In: Campo, M. S. (Ed.). **Papillomavirus research: from natural history to vaccine and beyond**. Wymondham: Caister Academic Press. Cap.23, p. 373-383, 2006.
- CAMPOS-FERREIRA, D. S; NASCIMENTO, G. A; SOUZA, E. V. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v.4, n.804, p.258-263, 2013. Doi: 10.1016/j.aca.2013.10.038.
- CARR, E. A; THEON, A. P; MADEWELL, B. R. et al. Bovine papillomavirus DNA in neoplastic and nonneoplastic tissues obtained from horses with and without sarcoids in the western United States. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.741-744, 2001.
- CASTLE, P. E; SADORRA, M; LAU, T. et al. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for carcinogenic human papillomavirus (HPV) detection and simultaneous HPV genotype 16 (HPV16) and HPV18 genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.3344-3347, 2009.

- CELSUS, A. C; **De Medicina**. Tradução de W. G. Spencer (v. II, livro V; Prefácio). Londres. William Heinemann; Cambridge, Harvard Academic Press, p.161-163, 1961.
- CHAGAS, B. S; BATISTA, M. V. D. A; CROVELLA, S. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. **Infection, Genetics and Evolution**, v.16, p.13–18, 2013. Doi:10.1016/ j.meegid.2013.02.001.
- CHAMBERS, T. J; HAHN, C. S; GALLER, R. et al. Flavivirus genome organization, expression and replication. **Annual Review of Microbiology**, v.44, p. 649 - 688, 1990.
- CHANG, H; YUAN, Y; SHI, N. Electrochemical DNA biosensor based on conducting polyaniline nanotube array. **Analytical Chemistry**, v.79, p.5111–5115, 2007. Doi:10.1021 /ac070639m.
- CHAUBEY, A; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441–56, 2002.
- CHEN, W; LEI, Y; LI, C.M. Regenerable Leptin Immunosensor Based on Protein G Immobilized Au-Pyrrole Propylic Acid-Polypyrrole Nanocomposite. **Electroanalysis**, v. 22, n. 10, p. 1078–1083, 2010.
- CHEN, X. et al. A sensitive and selective label-free DNAzyme-based sensor for lead ions by using a conjugated polymer. **Analytical Methods**, v. 4, n. 6, p. 1619-1622, 2012.
- CHEN, A; CHATTERJEE, S. Nanomaterials based electrochemical sensors for biomedical applications. **Chemical Society Reviews**, v.42, p.5425–38, 2013. Doi:10.1039/c3cs35518g.
- CLARK JR, L. C; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academic Sciences**, v.102, p. 29-45, 1962.
- CLAUS, M. P; VIVIAN, D; LUNARDI, M. et al. Phylogenetic analysis of bovine papillomavirus associated with skin warts in cattle herds from the state of Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, p. 314-318, 2007.
- CLAUS, M. P; LUNARDI, M; ALFIERI, A. F. et al. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. **Veterinary Microbiology**, v. 132 n.3-4, p. 396–401, 2008.
- CLAUS, M. P; LUNARDI, M; ALFIERI, A. A. et al. Multiple bovine papillomavirus infections associated with cutaneous papillomatosis in Brazilian cattle herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p. 93-98, 2009.
- COOPER, J. M; CASS, A. E. G; **Biosensors**. Oxford University Press, - v.251 2.ed, 2004 ISBN:9781601195357
- CORTEGGIO, A; ALTAMURA, G; ROPERTO, F. et al. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n.1, p. 1-9, 2013.
- CUBIE, H. A; MOORE, C; WALLER, M. et al. The development of a quality assurance programme for HPV testing within the English NHS Cervical Screening LBC/HPV pilot study. **Journal of Clinical Virology**, v.33, n.4, p.287-292, 2004.

- D' ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica Chimica Acta**. v.412, n.19-20, p. 1749-1761, 2011. Doi: 10.1016/j.cca.2011.06.025.
- D' SOUZA, S. F. Review: Microbial biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, n.6, p. 337-353, 2001.
- DALTAMIR, J. M., DE PAOLI, M.A., ALVES, O. L., Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**. V.23 n.2, p.204-215, 1999.
- DANIELS, J. S; POURMAND, N. Label-Free Impedance biosensors: opportunities and Challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239–1257, 2007.
- DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A; MERKOCI, A; Nanochannels preparation and application in biosensing. **ACS Nano**, v.6, n.9, p. 7556–7583, 2012.
- DE OLIVEIRA-POERSCH, C; PAVONI, D. P; QUEIROZ, M. H. et al. Dengue virus infections: comparison of methods for diagnosing the acute disease. **Journal of Clinical Virology**, v.32, n.4, p. 272–277, 2005.
- DE VILLIERS, E. M; FAUQUET, C; BROKER, T. R. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, n.324, p. 17–27, 2004. Doi:10.1016/j.virol.2004.03.033.
- DENG, J; TOH, C. S. Impedimetric DNA biosensor based on a nanoporous alumina membrane for the detection of the specific oligonucleotide sequence of Dengue virus. **Sensors (Basel)**, v.13, n.6, p.7774–7785, 2013. Doi:10.3390/s130607774
- DENHARDT, D.T. A Membrane Filter Technique for the Detection of Complementary DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 23, n. 5, p. 641-646, 1966.
- DHAND, C; DATTA, M. M; MALHOTRA, B. D. Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p.2811–2821, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2010.10.017.
- DINIZ, N; MELO, T. C; SANTOS, J. F; MORI, E. et al. Simultaneous presence of bovine papillomavirus in blood and in short-term lymphocyte cultures from dairy cattle in Pernambuco, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v.8, n.4, p.1474-1480, 2009.
- DOORBAR, J; STERLING, J.C. The biology of human papillomaviruses. In: STERLING, J.C. & Tying, S.K. (Ed.). **Human papillomaviruses-clinical and scientific advances**. Londres: Arnold, 2001. p.10-23.
- DU, M; YANG, T; JIAO, K. Rapid DNA electrochemical biosensing platform for label-free potentiometric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v.81, n. 3, p. 1022–1027, 2010. Doi:10.1016/j.talanta.2010.01.053.
- DU, M; YANG, T; LI, X; JIAO, K. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v. 88, p. 439 –444, 2012.
- ELAHI, M.Y. et al. DNA immobilization on a polypyrrole nanofiber modified electrode and its interaction with salicylic acid/aspirin. **Analytical Biochemistry**, v.411, n. 2, p. 176-184, 2011.

- ELKAOUTIT, M; NARANJO-RODRIGUEZ, I; DOMINGUEZ, M. Overcoming the adverse effects of crosslinking in biosensors via addition of PEG: Improved sensing of hydrogen peroxide using immobilized peroxidase. **Microchimica Acta**, v.175, n. 3– 4, p. 241–250, 2011.
- FAN, H. C; GU, W; WANG, J. et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. **Nature**, v. 487, p. 320–324, 2012.
- FAROKHZAD, O. C; CHENG, J; TEPLY, B. A. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.16, p. 6315-6320, 2006.
- FATIBELLO-FILHO, O; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v.15, p. 28 –39, 1992.
- FELIX, A. C; ROMANO, C. M; CENTRONE, C. D. C. et al. Low sensitivity of NS1 protein tests evidenced during a Dengue type 2 virus outbreak in Santos, Brazil, in 2010. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, v. 19, n. 12, p. 1972– 1976, 2012.
- FERIOTTO, G; CORRADINI, R; S. FORZA, S. et al. Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance. **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 1415-1427, 2001.
- FERREIRA, H. A; GRAHAM, D. L; FELICIANO, N. Detection of Cystic Fibrosis Related DNA Targets Using AC Field Focusing of Magnetic Labels and Spin-Valve Sensors. **IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS**, v. 41, n.10, p.4140–4142, 2005.
- FINLAY, M; YUAN, Z. Q; BURDEN, F. The detection of Bovine Papillomavirus type 1 DNA in flies. **Virus Research**, v.10, p. 04 -15, 2009.
- FINNEN, R. L; ERICKSON, K. D; CHEN, X. S. et al. Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. **Journal of Virology**, v.77, n. 8, p. 4818–4826, 2003.
- FLORIN, L; SAPP, C; STREECK, R. E. et al. Assembly and translocation of papillomavirus capsid proteins. **Journal of Virology**, v.76, p.10009 –10014, 2002.
- FREITAS, A. C; CARVALHO, C; BRUNNER, O. et al. Viral DNA sequences in peripheral blood and vertical transmission of the vírus: a discussion about BPV-1. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 34, p. 76-78, 2003.
- FREITAS, A. C; SILVA, M. A. R; CARVALHO, C. C. R. et al. Papillomavirus DNA detection in non-epithelial tissues: a discussion about bovine papillomavirus, in Mendez-Villas, A. (Eds.), **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, v.1, n. 697-704, 2007.
- FREITAS, A. C; SILVA, M. A. R; JESUS, A. L. S. Recent insights into Bovine Papillomavirus. **African Journal of Microbiology Research**, v.5, p. 6004–6012, 2011. Doi:10.5897/AJMRX11.020
- GALLI, A; DE SOUZA, D; GARBELLINI, G. S. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
- GARAJ, S; HUBBARD, W; REINA, A. et al. Graphene as a Subnanometre Trans-Electrode Membrane. **Nature**, v. 467, p. 190–194, 2010.

- GARFIELD, E. All sorts of warts – separating facts from fiction. **Current Contents**, v.9, p. 3-11, 1988.
- GE, X; ZHANG, W.Y; LIN,Y. et al. Magnetic Fe₃O₄@TiO₂ nanoparticles-based test strip immunosensing device for rapid detection of phosphorylated butyrylcholinesterase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 486–491, 2013.
- GE, X; ASIRI, A. M; DU, D. et al. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors, **Trends in Analytical Chemistry**,v. 58, p.31-39, 2014. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.008>.
- GENC, R; MURPHY,D; FRAGOSO,A. et al. Signal-Enhancing Thermosensitive Liposomes for Highly Sensitive Immunosensor Development. **Analytical Chemistry**, v. 83, p.563-570, 2011.
- GIBBONS, R. V; VAUGHN, D. W. Dengue: an escalating problem. **British Medical Journal**, v. 324, p. 1563–1566, 2002.
- GUBLER, D. J; SUHARYONO, W; LUBIS, I. et al. Epidemic Dengue 3 in central Java, associated with low viremia in man. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 5, p. 1094–1099, 1981.
- GUO, X.C., LIU,J., ZHANG, H.L., **Analytica Chimica Acta** v.668 n.2, p.208–214, 2010.
- GUO, L; ZHOU, X; KIM, D. Facile fabrication of distance-tunable au-nanorod chips for single-nanoparticle plasmonic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, p. 2246 -2251, 2011.
- GUTKIND, J. S; PAPADIMITRAKOPOULOS, F; RUSLING, J.F. Carbon Nanotube Amplification Strategies for Highly Sensitive Immunodetection of Cancer Biomarkers, **Journal American Chemical Society**, n.128, p. 11199-11205, 2006.
- GUZMAN, M. G; HALSTEAD, S. B; ARTSOB, H; et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 8, n. 12, Suppl, p.7–16, dec.2010.
- HAGEN, J. A; KIM,S. N; BAYRAKTAROGLU, B. et al. Biofunctionalized zinc oxide field effect transistors for selective sensing of riboflavin with current modulation. **Sensors (Basel)**. v.1, n. 7, p. 6645-55, 2011. Doi: 10.3390/s110706645.
- HAHM, J. I. Review: Functional polymers in protein detection platforms: optical, electrochemical, electrical, mass-sensitive, and magnetic biosensors. **Sensors (Basel)**. v.11, n.3, p.3327-3355, 2011. Doi: 10.3390/s110303327.
- HALSTEAD, S. B. Dengue. **Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1644–52,2007.
- HAMA, C; MATSUMOTO, T; FRANCESCHINI, P. H. Papilomatose bovina: Avaliação clínica de diferentes produtos utilizados no controle e tratamento. **Ciência Veterinária**, v. 2, n. 2, p. 14-15, 1988.
- HAO, Y; ZHOU, B; WANG, F. Construction of highly ordered polyaniline nanowires and their applications in DNA sensing. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 52, p. 422–426, 2014. Doi:10.1016/j.bios.2013.09.023.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HATAMA, S; ISHIHARA, R; UEDA, Y. et al. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. **Archives of Virology**. v. 156, n.7, p. 1281–1285, 2011.

HE, J. B; JIN, G. P; CHEN, Q. Z. et al. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 337–43, 2007.

HE, Y. Q; ZHANG, S. Q; ZHANG, X. B. Ultrasensitive nucleic acid biosensor based on enzyme-gold nanoparticle dual label and lateral flow strip biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p. 2018–2024, 2011.

HO, J. A; CHANG, H.C; SHIH, N.Y. et al. Diagnostic detection of human lung cancer-associated antigen using a gold nanoparticle-based electrochemical immunosensor. **Analytical Chemistry**, v.82, n.14, p.5944-50, 2010 Doi:10.1021/ac1001959.

HU, Y; ZHAO, Z; WAN, Q. Facile preparation of carbon nanotube-conducting polymer network for sensitive electrochemical immunoassay of Hepatitis B surface antigen in serum. **Bioelectrochemistry** (Amsterdam, Netherlands), v. 81, n. 2, p. 59–64, 2011.

HU, F; CHEN, S; WANG, C. et al. Multi-wall carbon nanotube-polyaniline biosensor based on lectin-carbohydrate affinity for ultrasensitive detection of Con A. **Biosensors and Bioelectronics**. v.34, p.202–207, 2012. Doi:10.1016/j.bios.2012.02.003.

HU, Y; YANG, T; LI, Q. et al. Conjugated self-doped polyaniline-DNA hybrid as trigger for highly sensitive reagentless and electrochemical self-signal amplifying DNA hybridization sensing. **Analyst**. v. 138 n.4, p. 1067–1074, 2013.

HUANG, H; LIU, X; HU, T. et al. Ultra-sensitive detection of cysteine by gold nanorod assembly. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, p. 2078-2083, 2010.

HUANG, Y; QIN, X; LI, Z. et al. Fabrication of a chitosan/glucose oxidase-poly(anilineboronic acid)-Au (nano) /Au-plated Au electrode for biosensor and biofuel cell. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 31, p. 357–362, 2012. doi:10.1016/j.bios.2011.10.045.

IOST, R. M; CRESPILO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**. v.31, p. 1–10, 2012. doi:10.1016/j.bios.2011.10.040.

JANG, J; BAE, J; CHOI, M; et al. Fabrication and characterization of polyaniline coated carbon nanofiber for supercapacitor. **Carbon**. v.43, p.2730–2736, 2005.

JENSEN, G. C; KRAUSE, C. E; SOTZING, G. A. et al. Inkjet-printed gold nanoparticle electrochemical arrays on plastic. Application to immunodetection of a cancer biomarker protein. **Chemical Physics**. V.13 n.11, p. 4888-4894, 2011 doi: 10.1039/c0cp01755h.

JUSTINO, C. I. L; ROCHA-SANTOS, T. A; DUARTE, A. C. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1172–1183, 2010.

- KANG, Y; KIM, S. K; LEE, C. **Materials Science and Engineering**. V.24, p.39, 2004.
- KANG, Q; YANG, L. X; CAI, Q.Y. An electro-catalytic biosensor fabricated with Pt–Au nanoparticle-decorated titania nanotube array. **Bioelectrochemistry**. v.74, p. 62–65, 2008.
- KERMAN, K; MORITA, Y; TAKAMURA, Y. Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode. **Electrochemistry Communications**.v.5, p.887–891, 2003.
- KINNEY, R. M; HUANG, C. Y. H. Development of new vaccines against Dengue fever and Japanese encephalitis. **Intervirology**, v.144, p. 176–197, 2001.
- KUMERIA, T; KURKURI, M.D; DIENER, K.R et al. Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 35, p.167–73, 2012. Doi:10.1016/j.bios.2012.02.038.
- LABUDA, J; BRETT, A. M. O; EVTUGYN, G; et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v.82, p.1161–1187, 2010. Doi:10.1351/PAC-REP-09-08-16.
- LAHIFF, E; LYNAM, C; GILMARTIN, N. et al. The increasing importance of carbon nanotubes and nanostructured conducting polymers in biosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.398 n.4, p.1575-1589, 2010. Doi:10.1007/s00216-010-4054-4.
- LEI, Y; W. Chen, A. Mulchandani. Microbial biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v.568 n.1-2, p.200-210, 2006.
- LEE, J; KIM, M; HONG, C. K. et al. Measurement of the dispersion stability of pristine and surface-modified multiwalled carbon nanotubes in various nonpolar and polar solvents. **Measurement Science and Technology**, v. 18, n. 12, p. 3707–3712, 2007.
- LINDSEY, C.L; ALMEIDA, M.E; VICARI, C.F. et al. Bovine papillomavirus DNA in milk, blood, urine, semen, and spermatozoa of bovine papillomavirus-infected animals. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p. 310-318, 2009.
- LI, N; ZHAO, H.W; YUAN, R. et al. Na amperometric immunosensor with a DNA polyion complex membrane/gold nanoparticles-backbone for antibody immobilisation. **Electrochimica Acta** v.54, p.235–241, 2008.
- LI, S; LI, J; WANG, K. et al. A Nanochannel Array-Based Electrochemical Device for Quantitative Label-free DNA Analysis. **ACS nano**. v.4, n.11, p. 6417–6424, 2010.
- LI, Y.Z; ZHANG, Q.H; ZHAO, X. et al. Oriented Arrays of Polyaniline Nanorods Grown on Graphite Nanosheets for an Electrochemical Supercapacitor. **Journal of Materials Chemistry**. v.22. n.5, p.1884–1892, 2012.
- LI, F; YANG, L; CHEN, M. et al. A novel and versatile sensing platform based on HRP-mimicking DNazyme-catalyzed template-guided deposition of polyaniline. **Biosensors and Bioelectronics**. v.41, p.903–906, 2013. Doi:10.1016/j.bios.2012.09.048.

- LIU, X; QU, X; DONG, J. et al. Electrochemical detection of DNA hybridization using a change in flexibility. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26, p.3679–3682, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2011.01.034.
- LIU, S; XING, X; YU, J. et al. A novel label-free electrochemical aptasensor based on graphene-polyaniline composite film for dopamine determination. **Biosensors and Bioelectronics**. v.36, p.186–191, 2012. Doi:10.1016/j.bios.2012.04.011.
- LIU, M.Q; LUO, C.H; PENG, H. Electrochemical DNA sensor based on methylene blue functionalized polythiophene as a hybridization indicator. **Talanta**, v.88, p. 216-221, 2012.
- LOWINSOHN, D. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1318–1325, 2006.
- LUNARDI, M; CLAUS, M.P; ALFIERI, A.A. et al. Phylogenetic position of an uncharacterized Brazilian strain of bovine papillomavirus in the genus Xipapillomavirus based on sequencing of the L1 open reading frame. **Genetics and Molecular Biology**. v.33, n.4, p. 745-749, 2010.
- LUNARDI, M; ALFIERI, A.A; OTONEL, R.A.A. et al. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. **Veterinary Microbiology**. v.162, n.1, p. 207–213, 2013.
- MA, L; YUAN, R; CHAI, Y. et al. Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalently immobilizing thionine as a mediator. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v.32, n.4, p.537-44, 2009 Doi: 10.1007/s00449-008-0275-8.
- MACHADO, J.M; OLIVEIRA, T.A & ZÓBOLI, A.P. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da Dengue. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 73–75, 2013.
- MACIEL, I. J; SIQUEIRA JÚNIOR, J. B; & MARTELLI, C. M. T. epidemiologia e desafios no controle do Dengue. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 2008.
- MAEDA, Y; SHIBAHARA, T; WADA, Y. et al. An outbreak of teat papillomatosis in cattle caused by bovine papilloma virus (BPV) type 6 and unclassified BPVs. **Veterinary Microbiology**. v.121, p.242-248, 2007.
- MAHMOUD, K.A; LUONG, J.H. Impedance method for detecting HIV-1 protease and screening for its inhibitors using ferrocene-peptide conjugate/Au nanoparticle/single-walled carbon nanotube modified electrode. **Analytical Chemistry**. v.80, n.18, p.7056-62. 2008. Doi: 10.1021/ac801174r.
- MARRAZZA, G; TOMBELLI, S; MASCINI, M. et al. Detection of human a polipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR. **Clinica Chimica Acta** v.307, p.241–248, 2001.
- MEDEIROS, E.S, OLIVEIRA, J.E, FILHO, N.C, PATERNO, L.G, MATTOSO, L.H.C. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.7, p. 62 – 77, 2012.
- MELLO, L. D; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 237–256, 2002.

- MELO, A. F. **Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências), Rio de Janeiro. UFRJ.
- MENG, L; GAN, N; LI, T. et al. A three-dimensional, magnetic and electroactive nanoprobe for amperometric determination of tumor biomarkers. **International Journal of Molecular Sciences**.v.12,n.1, p.362-75, 2011. Doi: 10.3390/ijms12010362.
- MENGUAL-CHULIÁ, B; GARCÍA-PÉREZ, R; GOTTSCHLING, M. et al. Novel animal papillomavirus sequences and accurate phylogenetic placement. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v.65, n.3, p.883–91,2012.
- MOLIJN, A; KLETER, B; QUINT, W. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**. v.32 n. 1, p.43-51, 2005.
- MONOŠÍK, R; STREĎANSKÝ, M; ŠTURDÍK, E; Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca** v.5, p.109–120, 2012. Doi:10.2478/v10188-012-0017-z.
- MOUSTY, C; Sensors and biosensors based on clay-modified Electrodes–new trends. **Applied Clay Science**. v.27, p.159–177,2004.
- MUNGE, B.S; COFFEY, A.L; DOUCETTE, J.M. et al. Nanostructured immunosensor for attomolar detection of cancer biomarker interleukin-8 using massively labeled superparamagnetic particles. **Angewandte Chemie International Edition**. n.3 4, p.7915-8, 2011. Doi: 10.1002/anie.201102941.
- MURO, L.F.F; BOTTURA, C.R.P; PICCININ, A. Papilomatose bovina. Revista Científica eletrônica de medicina veterinária. **FAMED**.VI. n. 10, 2008.
- MURPHY, L; Current Opinion in Chemical Biology. **Biosensors and Bioelectronics** v.10, p.177–184, 2006.
- MURRELL, S; WU, S.C; BUTLER, M. Review of Dengue virus and the development of a vaccine. **Biotechnology Advances**. V.29, p.239- 247, 2011.
- NAIK,R.R; STONE, M.O. **Sensors**, v.11 n.7, p. 6645–6655, 2011.
- NARANG, J; CHAUHAN, N; JAIN, P. et al. Silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline film for amperometric glutathione biosensor. **International Journal of Biological Macromolecules** v.50, p.672–8, 2012. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.01.023.
- NASCIMENTO, H.P.O; OLIVEIRA, M.D.L; DE MELO, C.P; Silva, et al. An impedimetric biosensor for detection of Dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces: B Biointerfaces** v.86, p.414–9, 2011. Doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.028.
- NASCIMENTO, G.A; SOUZA, E.V.M; CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**. v.38, p.61–66, 2012.
- NASIR, L; CAMPO, M.S. Bovine papillomaviruses: their role in the a etiology of cutaneous tumors of bovids and equids. **Veterinary Dermatology**. v.19, p.243–254, 2008.

- NGUYEN, B.T.T; PEH, A.E.K; CHEE, C.Y.L. et al. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina Dengue virus biosensor. **Bioelectrochemistry** v.88, p.15–21, 2012. Doi:10.1016/j.bioelechem.2012.04.006.
- NIRSCHL, M; REUTER, F; VÖRÖS. J. Review of Transducer Principles for Label-Free Biomolecular Interaction Analysis. **Biosensors**, v. 1, n. 4, p. 70–92, 2011.
- NOGUEIRA, R. M. R; ARAÚJO, J. M. G; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Revista panamericana de salud pública/Pan American journal of public health*, v. 22, n. 5, p. 358–363, 2007.
- NOORBAKHS, A; SALIMI, A. Development of DNA electrochemical biosensor based on immobilization of ssDNA on the surface of nickel oxide nanoparticles modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**. v.30 n.1 p. 188-196, 2011. Doi: 10.1016/j.bios.2011.09.010.
- OGAWA, T; TOMITA, Y; OKADA, M. et al. Broad-spectrum detection of papillomaviruses in bovine teat papillomas and healthy teat skin. **Journal of General Virology**. v.85, p. 2191-2197, 2004.
- OLIVEIRA, J.E; CONSOLIN-FILHO, N; PATERNO, L.G. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.7, n.2 Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores, p.62-77, 2012.
- OLIVEIRA, J.E; CONSOLIN-FILHO, N; PATERNO, L.G. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.8.n.1 Parte 3: Biosensores 1, p.1–11, 2013.
- PAN, S.Y; XU, J; SHU, Y.Q. et al. Double recognition of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface plasmon resonance biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26 n.2, p.850-853, 2010. Doi: 10.1016/j.bios.2010.08.007.
- PANGTY, K; SINGH, S; GOSWAMI, R. et al. Detection of BPV-1 and -2 and quantification of BPV-1 by real-time PCR in cutaneous warts in cattle and buffaloes. **Transboundary and Emerging Diseases**. v.57, p.185–196, 2010.
- PARK, S. J; SEO, J; H. A, S. H et al. Prevalence and determinants of high-risk human papillomavirus infection in male genital warts. **Korean Journal of Urology**. v.55, n.3, p.207-212, 2014. Doi: 10.4111/kju.2014.55.3.207.
- PAYAN, C; DUCANCELLE, A; ABOUBAKER, M.H. Human Papillomavirus Quantification in Urine and Cervical Samples by Using the Mx4000 and LightCycler General Real-Time PCR Systems. **Journal of Clinical Microbiology**. v.45 n.3 p. 897-901, 2007.
- PENG, H; ZHANG, L; SOELLER, C. et al. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. **Biomaterials**. v. 30, p. 2132, 2009.
- PERTINES, R; PONNAPATI, R. FELIPE, M.J. et al. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26 n.5 p. 2766–2771, 2011.
- PERERA, R; KUHN, R.J. Structural Proteomics of Dengue Virus. **Current Opinion in Microbiology**. v.11, n.4 p. 369–377, 2009.

- PEREIRA, A.C; SANTOS,A.S; KUBOTA,L.T; Tendências em modificação de eletrodos amperomátricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v.25, n.6, p.1012-1021, 2002.
- PEREIRA, A.C; AGUIAR, M.R; KISNER, A. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola's blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube, **Sensor and Actuators B: Chemical**. v.124, p.269-276, 2007.
- POINERN, G.E.J; ALI, N; FAWCETT, D. Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development, **Materials**. v.4, n.3, p. 487-526, 2011. Doi:10.3390/ma4030487.
- POWER, A. C; MORRIN, A. Electroanalytical Sensor Technology (Chapter 7), **Electrochemistry**, 2013. ISBN: 978-953-51-1018-7.
- PRABHAKAR, N; ARORA, K; SINGH, H. et al. **Journal of Physical Chemistry B** v.112, p.4808–4816, 2008.
- PRABHAKAR, N; MATHARU, Z; MALHOTRA, B.D. Polyaniline Langmuir-Blodgett film based aptasensor for ochratoxin A detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26, p.4006–4011, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2011.03.014.
- QI, P; Y. WAN; D. ZHANG.Impedimetric biosensor based on cell-mediated bioimprinted films for bacterial detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v.39, n.1, p. 282-288, 2013.
- RAI, G.K; SAXENA, M; SINGH, V. et al. Identification of bovine papilloma virus 10 in teat warts of cattle by DNase-SISPA. **Veterinary Microbiology**. v.147, p.416–419, 2011.
- RAI, V; HAPUARACHCHI, H.C; NG, L.C. et al. Ultrasensitive cDNA detection of Dengue virus RNA using electrochemical nanoporous membrane-based biosensor. **PLoS One**, p.423-446,2012. Doi:10.1371/journal.pone.0042346
- RAHMAN, M.M; AHAMMAD, A.J.S; JIN J.H. et al. A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides. **Sensors**. v.10, p.4855–4886,2010.
- RAICOPOL, M; PRUNĂ, A; DAMIAN, C. et al. Functionalized single-walled carbon nanotubes/polypyrrole composites for amperometric glucose biosensors. **Nanoscale Research Letters**. ,v.8, n.1, 2013. Doi: 10.1186/1556-276X-8-316.
- RAMA, C.H; ROTELI-MARTINS, C.M; DERCHAIN, S.F.M. et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. **Revista de Saúde Pública**, v. 42, p.123-30, 2006.
- RAMANAVICIENE, A; KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A; OZTEKIN Y. et al. Visualization of Red-Ox Proteins on the Gold Surface Using Enzymatic Polypyrrole Formation, **Microchimica Acta**, v.175,p.79-86, 2011.
- REN, R; LENG, C; ZHANG, S; A chronocoulometric DNA sensor based on screen-printed electrode doped with ionic liquid and polyaniline nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, p.2089–2094,2010. Doi:10.1016/j.bios.2010.02.006.
- RICCARDI, C.S; COSTA, P. I; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico Quim. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316–320,2002.

- RICE, C; LENCHES, E; SHIN, S. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726–733, 1985.
- RIVAS, G. A; RUBIANES, M. D; RODRÍGUEZ, M. C; et al. Carbon nanotubes for electrochemical biosensing. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 291–307, 2007.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A; VAN DER SCHAAR, H. M; DA SILVA VOORHAM, J. M. et al. Immature Dengue virus: a veiled pathogen? **PLoS Pathogens** 6, 2010.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S; MARCO, M.P; ALDA, M. J. L. et al. Biosensors for environmental applications: Future development trends. **Pure and Applied Chemistry**. v.76, p.723– 752, 2004.
- ROSA, M. I; MEDEIROS, L.R; ROSA, D. D. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Caderno de Saúde Pública**, v.25, n.5, p.953-964, 2009.
- SÁ E SILVA, M; WEISS, M; BRUM, M.C,S. et al. Molecular identification of bovine papillomaviruses associated with cutaneous warts in southern Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.22, p. 603-606, 2010.
- SAM, S.S; OMAR, S. F. S; TEOH, B.T. et al. Review of Dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 5, p. 2194-2198, 2013.
- SASSOLAS, A; LECA-BOUVIER, B. D; BLUM, L. J; DNA biosensors and microarrays. **Chemical Reviews**. v.108, p.109–39, 2008. Doi:10.1021/cr0684467.
- SCHMITT, M; FIEDLER, V; MÜLLER, M. Prevalence of BPV genotypes in a German cowshed determined by a novel multiplex BPV genotyping assay. **Journal of Virological Methods**, v.170, p.67-72, 2010.
- SCHUCH, L.F.D. Papilomatose bovina In: Riet-Correa, F; Schild, A.L; Méndez, M.D.C. Doenças de Ruminantes e Equinos. Pelotas: **Ed. Universitária/UFPel**, p.115-118, 1998.
- SCHUHMANN, W; ZIMMERMANN, H; HABERMÜLLER, K. et al. Electron-transfer pathways between redox enzymes and electrode surfaces: reagentless biosensors based on thiol-monolayer-bound and polypyrrole-entrapped enzymes. **Faraday discussions**, n. 116, p. 245–55, 2000.
- SCODELLER, P; FLEXER, V; SZAMOCKI, R. et al. Wired-enzyme core-shell Au nanoparticle biosensor. **J Am Chem Soc**. v.130 n.38, p.12690-7, 2008. Doi: 10.1021/ja802318f.
- SHARMA, M.K; RAO, V.K; AGARWAL, G.S. et al. Highly sensitive amperometric immunosensor for detection of Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2 in serum of humans with malaria: comparison with a commercial kit. **Journal of Clinical Microbiology**. v.46, n.11, p.3759-3765, 2008. Doi:10.1128/JCM.01022-08.
- SHRIVASTAVA, A; DASH, P.K; TRIPATHI, N.K. et al. Evaluation of a commercial Dengue NS1 enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis of Dengue infection. **Indian J Med Microbiol** v.29, p.51-55, 2011.

- SILVA, L.A.F; VERÍSSIMO, A.C.C; FILHO, P.R.L.V. et al. **Revista da FZVA**, v.11, p. 153-165, 2004.
- SILVA, M.A.R; BATISTA, M. V. A, PONTES, N. E. et al. Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. **J.Virol. Methods**. v.192, n.1-2, 55–58, 2013.
- SIMMONS, C. P; FARRAR, J. J; NGUYEN, VAN V. C; WILLS, B. Dengue. **The New England journal of medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423–1432, 2012.
- SINGH, V; SOMVANSI, R; TIWARI, A.K. Papillomatosis in Indian cattle: occurrence and etiology. **Indian J. Vet. Pathol**; v.33, p. 52-57, 2009.
- SINGH, K; et al; Polypyrrole/multiwalled carbon nanotubes-based biosensor for cholesterol estimation. **Polymers for Advanced Technologies**, v.23, n.7,p.1084-1091, 2012.
- SINGH, R; VERMA, R; SUMANA, G; SRIVASTAVA, A.K. et al. Nanobiocomposite platform based on polyaniline-iron oxide-carbon nanotubes for bacterial detection. **Bioelectrochemistry** v.86, p.30–7, 2012. Doi:10.1016/j.bioelechem.2012.01.005
- SINGER, A; WANUNU, M; MORRISON, W. Nanopore Based Sequence Specific Detection of Duplex DNA for Genomic Profiling. **Nano Letters**. v.10, p.738–742, 2010.
- SIQUEIRA Jr, J.R; et al. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, n.6, p.1254–1263,2010.
- SILVESTRE, O; BORZACCHIELLO, G; NAVA, D. et al. Bovine Papillomavirus Type 1 DNA and E5 oncoprotein expression in water buffalo fibropapillomas. **Veterinary Pathology**; v.46, n.636, 2009.
- SKOOG, D. A; HOLLER, F. J; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5. ed. Porto Alegre: **Bookman**, v.836, 2002.
- SMITH, G. W; WRIGHT, P. J. Synthesis of Proteins and Glycoproteins in Dengue Type 2 Virus-infected Vero and Aedes albopictus Cells. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 3, p. 559–571,1985.
- SOTIROPOULOU, S; GAVALAS, V; VAMVAKAKI, V. et al. Novel carbon materials in biosensor systems, **Biosensors and Bioelectronics**. v. 18, p. 211-215, 2003.
- SOURES, J.C; BRISOLARI, A; RODRIQUES; V.D. et al. **Reactive and Functional Polymers**. v.72 n.2, p. 148–152, 2012.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology** v.98, p. 503–517, 1975.
- SOUZA, M.F.B; Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Química Nova**, v.20 n.2,1997.
- SOUZA, D; MACHADO, S. A. S; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v.26, p.81–89, 2003.

- SOUZA, E; NASCIMENTO, G; SANTANA, N. et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. **Sensors** v.11, p.5616-5629, 2011.
- SPAIN, E; KOJIMA, R; KANER, R. B. et al. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26 n.5, p. 2613–2818, 2011.
- STEJKAL, J; GILBERT, R. G. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer(IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v.74, n.5,p. 857- 867, 2002. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050857>.
- STOCCO DOS SANTOS, R.C; LINDSEY, C.J; FERRAZ, O. et al. Bovine papillomavirus transmission and chromosomal aberrations: an experimental model. **Journal of General Virology**. v.79, p. 2127-2135,1998.
- SYED, A. A; DINESAN, M. K. Polyaniline-a Novel Polymeric Material, Review. **Talanta**, v.38, p.815-837,1991.
- TAKMAKOV, P; VLASSIOUK, I; SMIRNOV, S. Hydrothermally shrunk alumina nanopores and their application to DNA sensing. **Analyst** v.131, p.1248–1253, 2006. Doi:10.1039/b608084g.
- TANIWAKI, S.A; MAGRO, A.J; GORINO, A.C. et al. Phylogenetic and structural studies of a novel equine papillomavirus identified from aural plaques. **Veterinary Microbiology** v.162, p.85-93, 2013. Doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.025.
- THÉVENOT, D. R; TOTH, K; DURST, R. A. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry), Analytical Chemistry Division, Commission V.5 **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121–131, 2001.
- TIAN, D; DUAN, C; WANG, W. et al. Ultrasensitive electrochemiluminescence immunosensor based on luminol functionalized gold nanoparticle labeling. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25 n.10, p.2290-2295, 2010. Doi: 10.1016/j.bios.2010.03.014.
- TOKONAMI, S; et al; Vertical Immobilization of Viable Bacilliform Bacteria into Polypyrrole Films. **Analytical Sciences**; v.28 n.4 p. 319-319, 2012.
- TOZATO, C. C; LUNARDI, M; ALFIERI, A.F. et al. Teat papillomatosis associated with bovine papillomavirus types 6, 7, 9, and 10 in dairy cattle from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44 n.3, p. 905-909,2013.
- TSOU, P.H; SREENIVASAPPA, H; HONG, S. et al. Rapid antibiotic efficacy screening with aluminum oxide nanoporous membrane filter-chip and optical detection system. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 26, p. 289–94, 2010. Doi:10.1016/j.bios.2010.06.034.
- TURAN, T; KALANTARI, M; CUSCHIERI, K. et al. High-throughput detection of human papillomavirus-18 L1 gene methylation, a candidate biomarker for the progression of cervical neoplasia. **Virology**. v.361, p.185–191, 2007.

- VAN DYK, E; BOSMAN, A-M; VAN WILPE, E. et al. Detection and characterisation of papillomavirus in skin lesions of giraffe and sable antelope in South Africa. **Journal of the South African Veterinary Association**. v.82, n.2, p. 80-85, 2011.
- VENKATESAN, B.M; BASHIR, R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. **Nature Nanotechnology**. v.6, p.615–624, 2011. doi:10.1038/nnano.2011.129.
- VIDAL, J.C, et al. Amperometric cholesterol biosensors based on the electropolymerization of pyrrole and the electrocatalytic effect of Prussian-blue layers helped with self-assembled monolayers. **Talanta**. v.64, p.655–664, 2004.
- VO-DINH T, CULLUM B. Review: Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. v. 366 n.6-7, p.540-551, 2000.
- WANEKAYA, A. K; BANGAR, M. A; YUN, M. et al. Field-Effect Transistors Based on Single Nanowires of Conducting Polymers. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 13, p. 5218-5221, 2007.
- WANG, J; Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v.13, n.12, p. 983-988, 2001.
- WANG, J; KAWDE, A. Pencil-Based Renewable Biosensor for Label-Free Electrochemical Detection of DNA Hybridization. **Analytica Chimica Acta** v.431, n.2, p.219-224, 2001.
- WANG, Y; XU, H; ZHANG, J; LI, G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043–2081, 2008.
- WANG, L; LIU, Q; HU, Z. et al. A novel electrochemical biosensor based on dynamic polymerase-extending hybridization for E. coli O157:H7 DNA detection. **Talanta** v.78, p.647–652, 2009. Doi:10.1016/j.talanta.2008.12.001
- WANG, Y; LI, Z; WANG, J. et al. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**. v.29, p.205–212, 2011. Doi:10.1016/j.tibtech.2011.01.008.
- WANG, X; YANG, T; LI, X; JIAO, K; Three-step electrodeposition synthesis of self-doped polyaniline nanofiber-supported flower-like Au microspheres for high-performance biosensing of DNA hybridization recognition. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26, p.2953–2959, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2010.11.045.
- WANG, H.N; DHAWAN, A; DU, Y. et al. Molecular sentinel-on-chip for SERS-based biosensing. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v.15, n.16, p.6008-6015, 2013. Doi: 10.1039/c3cp00076a.
- WANUNU, M; MORRISON, W; RABIN, Y. et al. Electrostatic Focusing of Unlabelled DNA into Nanoscale Pores Using a Salt Gradient. **Nature Nanotechnology**.v.5, p.160–165, 2010.
- WEI, R; GATTERDAM, V; WIENEKE, R. et al. Stochastic Sensing of Proteins with Receptor-Modified Solid-State Nanopores. **Nature Nanotechnology**. v.7, p.257– 263, 2012.
- WHO, W. H. O; Global Strategy for Dengue Prevention and Control. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, p. 2012–2020, 2012.

- WOSIACKI, S.R; CARLOS, A; ALFIERI, A.F; ALFIERI, A.A; Papilomavírus bovino tipo 2 na etiologia da hematúria enzoótica bovina. **Semina: Ciências Agrárias**. v.3, n.1, p. 121–130, 2002.
- WU, L; YAN, F; JU, H. An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. **Journal of immunological methods**, v. 322, n. 1-2, p. 12–9, 2007.
- XIAO,F; ZHAO,F.Q; ZHANG,Y.F.et al. **The Journal of Physical Chemistry**. v.113.p.849–855, 2009.
- XU, S.J; LIU,Y; WANG,T. H; LI,J. H. Positive Potential Operation of a Cathodic Electrogenerated Chemiluminescence Immunosensor Based on Luminol and Graphene for Cancer Biomarker Detection, **Analytical Chemistry**. v.83 p. 3817–3823, 2011.
- YAGUIU, A; CARVALHO, C; FREITAS, A.C. et al. Papillomatosis in cattle: In situ detection of bovine papillomavirus DNA sequences in reproductive tissues. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**; v.23, p. 525-529, 2006.
- YAMADA, K; NAWA, M; TAKASAKI, T. et al. laboratory diagnosis of Dengue virus infections by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and igm-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Japanese Journal of Infectious Diseases** v.52, p. 150-5, 1999a.
- YANG, G.J; HUANG, J.L; MENG, W.J. et al. A reusable capacitive immunosensor for detection of Salmonella spp. based on grafted ethylene diamine and self-assembled gold nanoparticle monolayers. **Analytica Chimica Acta**. v.647, n.2 p.159-66, 2009. Doi: 10.1016/j.aca.2009.06.008.
- YANG, L; REN, X; TANG, F; ZHANG, L; A practical glucose biosensor based on Fe₃O₄ nanoparticles and chitosan/nafton composite film. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, p. 889 -895, 2009.
- YANG, T; LI, Q; LI, X.et al. Freely switchable impedimetric detection of target gene sequence based on synergistic effect of ERGNO/PANI nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**. v.42, p.415–8, 2013. Doi:10.1016/j.bios.2012.11.007.
- YANG, Y; ASIRI, A.M; DU, D; LIN, Y. Acetylcholinesterase biosensor based on a gold nanoparticle-polypyrrole-reduced graphene oxide nanocomposite modified electrode for the amperometric detection of organophosphorus pesticides. **Analyst**, 2014
- YILDIZ, H.B; SAHMETLIOGLU, E; BOYUKBAYRAM, A.E. et al. Immobilization of Tyrosinase and Alcohol Oxidase in Conducting Copolymers of Thiophene Functionalized Poly(Vinyl Alcohol) with Pyrrole, **International Journal of Biological Macromolecules**. v.41, p. 332–337, 2007.
- YIN, Z; LIU, Y; JIANG, L.P; ZHU, J.J. Electrochemical immunosensor of tumor necrosis factor α based on alkaline phosphatase functionalized nanospheres. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26 n.5, p.1890-4, 2011. Doi: 10.1016/j.bios.2010.03.025.

- YOON, H; CHANG, M; JANG, J. Formation of 1D Poly (3,4-ethylenedioxythiophene) Nanomaterials in Reverse Microemulsions and Their Application to Chemical Sensors' **Advanced Functional Materials**. v.17 p.431–436, 2007.
- YOON, H; KIM, J.H; LEE, N.et al. A Novel Sensor Platform Based on Aptamer-Conjugated Polypyrrole Nanotubes for Label-Free Electrochemical Protein Detection. **ChemBioChem**. v.9, p.634–641, 2008.
- YOUNG, P. R; HILDITCH, P. A; BLECHLY, C; HALLORAN, W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the Dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1053–7, 2000.
- YU J, ZHANG Y, LIU S. Enzymatic reactivity of glucose oxidase confined in nanochannels. **Biosensors and Bioelectronics**. v.15, n.55 p.307-312, 2014. Doi:10.1016/j.bios.2013.12.042.
- ZACCO, E; ADRIAN, J; GALVE, R. et al. **Biosensors and Bioelectronics**. v.22, p.2184-2191, 2007.
- ZAINAH, S; WAHAB, A. H. A; MARIAM, M; et al. Performance of a commercial rapid Dengue NS1 antigen immunochromatography test with reference to Dengue NS1 antigen-capture ELISA. **Journal of virological methods**, v. 155, n. 2, p. 157–60,2009a.
- ZHANG, A.J; CHEN, J; NIU, D. et al. **Synthetic Metals**. v.159 n.15–16, p. 1542–1545, 2009.
- ZHANG, C.Q; LI, G.C; PENG, H.R; **Materials Letters**. v.63, p.592–594, 2009 a.
- ZHANG, X. Z; JIAO, K; LIU, S. F. et al. **Analytical Chemistry** v.81, p.6006–6012, 2009 b.
- ZHANG, Z. H; LI, G. J; YAN, F. F. et al. Zhang, Z.H; Fang,S.M. **Chinese Journal of Chemistry**. v.30 n.2, p.259–266, 2012.
- ZHANG W. Y; GE, X; TANG,Y. et al. Nanoparticle-based immunochromatographic test strip with fluorescent detector for quantification of phosphorylated acetylcholinesterase: an exposure biomarker of organophosphorus agents, **Analyst** v.138 p.5431-5436, 2013.
- ZHANG, H; SONG, D; GAO, S. et al. Enhanced wavelength modulation SPR biosensor based on gold nanorods for immunoglobulin detection. **Talanta** v.115, p.857–862, 2013. Doi:10.1016/j.talanta.2013.06.059.
- ZHAO, D; GUO, X; GAO, Y. et al. An electrochemical capacitor electrode based on porous carbon spheres hybridized with polyaniline and nanoscale ruthenium oxide. **ACS Appl. Mater. Interfaces** v.4, p.5583–9, 2012. Doi:10.1021/am301484s.
- ZHOU, Y; YU, B; GUISEPPI-ELIE, A. et al. potentiometric monitoring DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**. v.24, p.3275–80, 2009. Doi:10.1016/j.bios.2009.04.023.
- ZHU, X; YURI, I; GAN, X. et al. Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1600–1604, 2007.
- ZHU, W; DONG, J; UCHIDA, K; WATANABE, K.-I. et al. Bovine papillomavirus type 10 with a deletion associated with a lingual papilloma in a cow. **Veterinary journal**. p. 10–12, 2013.

CAPÍTULO II

Artigo Científico I

Periódico: Química Nova

Biossensores de DNA baseados em Polianilina (PANI)

Paula V.V. Souza^{a*}, Mízia M.S.Silva^b, Gustavo A. Nascimento^a, Luiz B. Carvalho Jr^{a,c}

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

^b Laboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife/PE, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas (PPGCB), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife/PE, Brazil.

Corresponding authors at: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil. Tel/fax: +55 (81) 2126-8485. e-mail address: Paulavir@yahoo.com.br (P.V.V.Souza).

Uma visão geral sobre avanços recentes em biossensores de DNA fabricados a partir de eletrodos modificados por polianilina (PANI) foi apresentada. Polímeros condutores (PCs) são utilizados para fornecer melhorias na sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade da resposta do eletrodo e para detectar uma variedade de analitos. O desenvolvimento de sensores eletroquímicos de DNA baseados em PCs têm sido aplicados em diversas áreas de diagnóstico clínico e são denominados “biossensores de terceira geração”. Em sistemas biotecnológicos, a PANI tem sido uma das mais utilizadas atualmente, principalmente na forma condutora, base sal esmeraldina, pois promove interação com diversos biorreceptores como: enzimas, ácidos nucleicos, bactérias, anticorpos e aptâmeros. Neste trabalho de revisão foram expostas citações baseadas na literatura que abrange os últimos sete anos (2007 a 2014). Diante do exposto, podemos concluir que eletrodos modificados por PANI se apresentam como tecnologia promissora para o desenvolvimento de novos genossensores utilizados em diagnósticos clínicos.

Keywords: Polímeros condutores; Genossensores eletroquímicos; Polianilina.

INTRODUÇÃO

Biossensores têm demonstrado ser um dos mais atrativos métodos analíticos no ramo da detecção química, bioquímica, genética e imunológica. Além disso, tem destaque no monitoramento de parâmetros em diferentes áreas como: diagnósticos clínicos, indústria de alimentos, monitoramento ambiental, detecção de drogas e ciência forense (Zhu et al., 2007; He et al., 2007; Monosik et al., 2012).

Pesquisas recentes demonstram que a aplicação de sensores baseados em polímeros e nanomateriais, têm sido bastante utilizados na área de diagnóstico clínico, tornando-se produtos comerciais portáteis e cada vez mais miniaturizados. Biossensores eletroquímicos, óticos, mecânicos e físicos vem sendo desenvolvidos a partir de novas tecnologias baseados em nanotubos de carbono, partículas magnéticas, nanopartículas de ouro e polímeros. Destacam-se também na utilização em biomarcadores de câncer, análises de DNA, doenças autoimunes, marcadores cardíacos, infecções virais e bacterianas (D’orazio, 2011; Iost; Crespilho et al., 2012).

O reconhecimento eletroquímico ocorre de duas formas: oxidação direta (catalisada de bases de DNA) e por resposta eletroquímica gerada por enzima ou outro marcador redox, através de uma reação específica com o DNA alvo (Marraza et al., 2001; Murphy, 2006; Wang et al., 2008). O princípio básico dos genossensores se dá pela ligação de oligonucleotídeos (ODNs), sequências curtas de DNA que são utilizadas como sonda de DNA (ssDNA- *single strand* DNA) e uma sequência de DNA alvo complementar, completando a hibridização (dsDNA- *double strand* DNA) gerando um DNA estável (Vo-dinh; Cullum, 2000; Liu et al., 2011; Fan et al., 2012). A formação da fita ds-DNA pode ser feita da forma direta “*label-free*” ou indireta “*label-based*”, utilizando um marcador ou através da modificação química das fitas de DNA (Labuda et al., 2010). A detecção eletroquímica mensura alterações eletroquímicas que se dá geralmente pelas alterações estruturais do DNA, que advém da oxidação da guanina (Wang et al., 2009; Wang et al., 2013; Bartosik et al., 2014). A aplicação de tal tecnologia serve como diagnóstico de patógenos, monitoramento de expressão de genes e diagnóstico de desordens genéticas entre outros (Wang et al., 2011; Liu et al., 2012; Narang et al., 2012; Singh et al., 2012; Yang et al., 2013).

Alguns fatores podem melhorar a eficiência dos biossensores de DNA como por exemplo: modificação da superfície, elevada densidade de sondas na superfície do transdutor, estabilidade da camada de DNA imobilizada e acessibilidade das moléculas de interação e minimização de interações não específicas (Cooper; Cass, 2004; Souza et al., 2011; Nascimento et al., 2012; Campos-Ferreira et al., 2013). Polímeros condutores (PCs) são caracterizados por uma sequência de ligações duplas conjugadas na cadeia polimérica, alternando o estado de isolantes a condutores e vice-versa através de um processo de oxidação-redução, também conhecido como dopagem e desdopagem (Dhand et al., 2011). Tais reações têm como consequência à formação de cargas deslocalizadas, positivas ou negativas, as quais são balanceadas pela incorporação de contra-íons (ânions ou cátions) denominados de dopantes (Medeiros et al., 2012).

Os PCs contêm elétrons policonjugados que conferem propriedades características como: condutividade elétrica, baixa energia de transmissão ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica, semelhantes a materiais inorgânicos. Com modificações químicas apropriadas, eles podem exibir um intervalo de condutividades desde semicondutor até condutor, chegando a condutividades comparáveis a do cobre (10^6 S.cm^{-1}). Dentre as famílias mais estudadas estão o poliacetileno, polianilina, polipirrol e politiofeno (Daltamir et al., 1999; Peng et al., 2009).

Dentre os polímeros derivados da anilina, a PANI é sem dúvida, o polímero condutor que têm recebido maior atenção, devido principalmente à estabilidade química de sua forma condutora, facilidade de polimerização e dopagem de baixo custo. As PANIs representam uma classe de polímeros cuja composição química na forma base, não dopada, consiste de unidades repetitivas alternadas pelas formas reduzida (n- diamina benzóide) e oxidada (m-diamina quinoide). As PANIs podem existir em vários estados de oxidação: completamente reduzida/ Leucoesmeraldina (LE), parcialmente oxidada/Esmeraldina (EB) e completamente Oxidada/ Pernigranilina (PG). A forma esmeraldina da PANI, muitas vezes referida como base esmeraldina (EB), neutra ou dopada, apresenta nitrogênios imina protonados por um ácido. Essa é a forma considerada mais útil de PANI devido a sua elevada estabilidade em temperatura ambiente e, além disso, a sua forma dopada (sal esmeraldina; ES) é o estado onde se encontra eletricamente condutora (Fig 1) (Stejkal; Gilbert, 2002;Dhand et al.,2011).

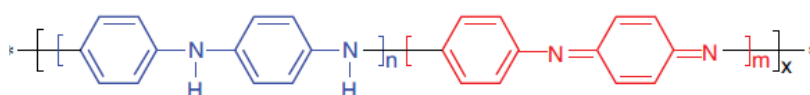


Figura 1- Estrutura química da polianilina (Adaptado de Mulchandani; Myung, 2011)

Diversos trabalhos demonstram a formação do complexo PANI-DNA para fabricação de biossensores em diferentes tipos de superfícies como: Eletrodos de grafite (Wang; Kawde, 2001), (Kang et al., 2004) ouro (Kerman et al., 2003) polipirrol (Wang et al., 2011; Monisik et al., 2012; Huang et al.,2012).O princípio do reconhecimento molecular de biossensores de DNA utilizando polímeros condutores é realizado pela hibridização das moléculas de oligonucleotídeos presentes na superfície do sensor mediada pelo polímero condutor (Arora et al., 2007; Liu et al., 2012). Tal processo pode causar mudanças conformacionais na estrutura do polímero que refletem em mudanças em suas propriedades eletroativas (Oliveira et al., 2013). Segundo Dhand et al. (2011) a PANI apresenta diversas características vantajosas na utilização em plataformas para biossensores,como: Ordenamento de moléculas, controle de espessura, aumento de condutividade, facilidade de imobilização, atração eletrostática, estabilidade ambiental, especificidades químicas e aumento de área superficial.

Metodologia

O levantamento bibliográfico foi realizado em sua totalidade, não utilizando critérios de exclusão nos últimos sete anos (2007-2014), nos bancos de dados, Pubmed, Scielo e Medline.

Eletrodos utilizados em genossensores

No processo de fabricação de um genossensor um aspecto fundamental é a escolha do material para preparação do eletrodo, cuja superfície sofrerá a modificação. Tal substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais estão o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, pasta de carbono, Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono entre outros (Galli et al., 2006).

O recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos- PANI tem o objetivo de aumentar a eficiência no desenvolvimento dos sensores (Pei et al.,2001). Nanomaterias de carbono, metálicos, nanopartículas de sílica (PN), *quantum dots* (QDs), *protein cages*, e outras nanopartículas (NPs) funcionalizadas, têm sido empregadas para a concepção desse tipo de tecnologia (Genc et al.,2011; Ge et al.,2013). Os nanomateriais podem ser utilizados como transportadores para carregar marcadores de sinal ou diretamente como repórteres de sinal para detectar biomarcadores de alta sensibilidade, acelerando a transferência de elétrons, quando utilizados sobre as superfícies dos eletrodos (Siqueira Jr. et al., 2010; Zhang et al.,2011; Ge et al., 2014).

Nanotubos de carbono (CNT) possuem vantagens em termos de elevada área superficial, resistência mecânica, excelente condutividade elétrica e boa estabilidade química (Sotiropoulou et al., 2003; Pan et al.,2010). Nanopartículas de ouro foram ligados através de cisteamina. Outros autores têm utilizado nanobastões de ouro (*nanorods*), que pode ser depositados em superfície plana ou superfície perpendicular, com um diâmetro de cerca de 20 nm e um comprimento de até 2 μm (Richard et al.,2009; Santos et al., 2010; Guo et al.,2011).

Técnicas de imobilização de oligonucleotídeos

Os métodos de imobilização de moléculas biológicas é um fator importante dentre as etapas de desenvolvimento de sensores. Essa escolha traz consequências diretas na reprodutibilidade e sensibilidade do sistema. As principais estratégias de imobilização são: adsorção, ligação covalente, encapsulamento, ligação cruzada ou afinidade (Ahuja et al., 2007).

De fato, o tipo de imobilização afeta a atividade e estabilidade das biomoléculas. Fatores como a precisão das medidas e a repetibilidade são fortemente influenciados pela estabilidade da biomolécula imobilizada (Sassolas et al., 2012). A escolha da técnica de imobilização mais adequada depende da natureza da biomolécula, do transdutor e do método de detecção que será empregado (Qi et al., 2013). A necessidade do desenvolvimento de sensores cada vez mais sensíveis e com menor limite de detecção direcionou a investigação de novas estratégias de imobilização. O encapsulamento foi o método utilizado em alguns dos sensores desenvolvidos recentemente. Nele o elemento biológico se encontra envolto por uma membrana que limita sua contaminação e deterioração.

O encapsulamento pode proteger o componente biológico de mudanças na temperatura, pH, força iônica e composição química. Além disso, a membrana pode ser permeável a algumas substâncias (moléculas pequenas, gases e elétrons) que se deseja detectar (Bucko et al., 2012). Uma das técnicas utilizadas atualmente consiste na imobilização através de nanoestruturas de polímeros conjugados obtido por diversas rotas químicas e físicas e que permitem o controle da morfologia e propriedades do sistema híbrido polímero/elemento biológico a nível molecular (Fig 3) (Du et al., 2012; Hu et al., 2013; Yang et al., 2013).

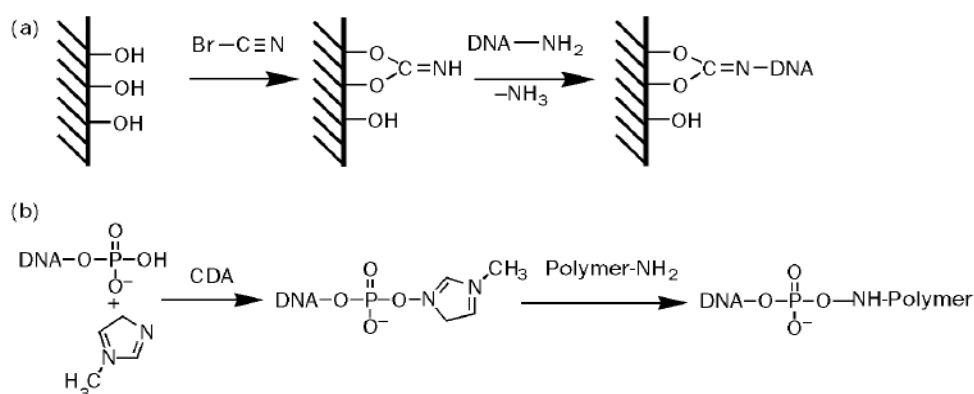


Figura 2- Esquemas de imobilização e reação em eletrodos revestidos por polímeros de grupos amino reativos respectivamente (Adaptado de Cooper; Cass,2004).

Eletrodos de DNA-PANI

A polimerização dos eletrodos a partir da PANI pode ser feita de diferentes formas. As técnicas incluem polimerização química, eletroquímica e síntese de derivados da polianilina. Porém, para aplicações biotecnológicas a síntese química tem sido a mais indicada. O emprego da PANI pode oferecer vantagens substanciais para a eletroanalítica. Recentemente diversos trabalhos relataram estudos de interação entre PANI e grafeno, nanopartículas de ouro, platina, nanotubos de carbono entre outros nanomateriais para aumentar a eficiência do sistema genossensor (Arora et al.,2007; Prabhakar et al.,2008; Zhang et al., 2009 a,b; Zhou et al., 2009; Du et al., 2010; Ren et al., 2010; Sheng et al., 2010; Bo et al., 2011; Dhand et al., 2011; Nascimento et al., 2011; Spain et al., 2011; Narang et al., 2012; Singh et al., 2012; Du et al., 2012; Chen et al.,2012; Zhao et al.,2012; Hu et al., 2013;Yang et al., 2013; Hao et al.,2014).

Genossensores para detecção de microrganismos como bactérias *E.coli*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Neisseria gonorrhoeae* foram demonstrados. Um genossensor de DNA ultrasensível baseado em PANI com eletrodo de platina foi desenvolvido por Arora et al. (2007). Uma ligação biotina-estreptavidina foi realizada para imobilização da sonda-alvo de *E.coli*. Os resultados expostos variaram de 0.00025–0.125 fmol e detecção limite 0.125 fmol. Prabhakar et al. (2008) apresentaram a detecção do agente patogênico *Mycobacterium tuberculosis* em eletrodo de ouro e PANI um limite de detecção eletrodo DNA-PANI/Au (2.5×10^{-18} M). Outro genossensor de nanotubos de carbono e PANI (PANI-CNT), sintetizada eletroquimicamente em placa de vidro foi utilizada para a detecção de

Neisseria gonorrhoeae. Resultados revelaram que o bioeletrodo pode detectar a concentração de DNA complementar em 1×10^{-6} e 1×10^{-17} e limite de detecção 1.2×10^{-17} . Além disso, o bioeletrodo (aDNA-Glu-PANI-CNT/ITO) exibiu especificidade para espécies de *N. gonorrhoeae* (Singh et al., 2010).

A utilização do grafeno possui propriedades únicas como: alta condutividade, condutibilidade térmica, flexibilidade e boa biocompatibilidade representando um grande potencial para aplicabilidade em biossensores eletroquímicos (Pumera, 2009; Pumera et al., 2010; Allen et al., 2010; Brownson; Banks, 2010).

Sensores para detecção de DNA baseados em grafeno e grafite, em conjunto com a PANI foram bastante utilizados recentemente. Um genossensor ultra-sensível utilizando eletrodo de grafite e nanotubos de PANI foi desenvolvido para detecção de mutações genéticas. O biossensor demonstrou boa capacidade de diferenciar o oligonucleotídeo alvo, sendo bastante específico mesmo em concentração de 37.59 fM (Chang et al., 2007). Bo et al. (2011) desenvolveu um genossensor baseado em eletrodo de carbono vítreo e modificados por grafeno oxidado e nanofios de PANI. A resposta da corrente do sensor aumentou linearmente com concentração de alvo a partir de 2.12×10^{-6} e 2.12×10^{-12} mol L⁻¹ e coeficiente relativo de 0,9938. O limite de detecção encontrado foi 3.25×10^{-13} mol L⁻¹.

Genossensores baseados na redução eletroquímica de óxido de grafeno e PANI foram descritos. Um deles foi preparado a partir de eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado por PANI. A sonda de DNA foi ligada à superfície do eletrodo através do empilhamento π - π entre as nucleobases e estrutura do nanocompósito conjugado. O biossensor apresentado teve uma detecção limite de 2.5×10^{-16} mol/L, devido ao efeito sinérgico do nanocompósito. Outro sistema, foi baseado na detecção do gene sintético *fosfinotricina-acetiltransferase* (PAT) demonstrando a capacidade da ligação ERGNO / PANI (Yang et al., 2013).

Outros sistemas para detecção uma sequência específica do gene do vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S), foram descritos por Du et al. (2012), Hu et al. (2013) e Wang et al. (2011). No primeiro trabalho o eletrodo de carbono vítreo foi preparado a partir de síntese eletroquímica por óxido de grafeno reduzida (ERGNO) e nanofibras de polianilina (PANI). Quando comparados, os eletrodos de grafeno e antes e após a adição da PANI no eletrodo, foi verificado diferenças nos potenciais de redução de -1.3V para -1V e limite de detecção de 3.2×10^{-14} mol L⁻¹. Wang et al. (2011) demonstrou um método utilizando microesferas de ouro e nanofibras de PANI (nanoSPAN). Um fragmento de gene 35S do vírus do mosaico de couve-flor, o qual está relacionado com um dos genes de triagem para as plantas transgênicas

foi detectada de forma eficiente. O intervalo linear foi de $1.0 \times 10^{-13}\text{M}$ e $1.0 \times 10^{-6}\text{M}$ e limite de detecção foi de $1.9 \times 10^{-14}\text{M}$.

Em outro sistema a dopagem por PANI (SPAN) foi adotada como plataforma de um biossensor DNA *Label-free*. O híbrido reticulado ligou-se ao eletrodo de ouro por uma monocamada p-aminotiofenol (PATP), previamente, com base na ligação fosforamidato entre PATP-ssDNA. O gene 35S do vírus do mosaico de couve-flor foi detectado satisfatoriamente. Em condições ótimas, a gama dinâmica para o ensaio de DNA variou de $1.0 \times 10^{-14}\text{mol L}^{-1}$ a $1.0 \times 10^{-8}\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de $2.3 \times 10^{-15}\text{mol L}^{-1}$ Hu et al. (2013).

Os autores Du et al. (2010), Ren et al. (2010) e Wang et al.(2011), apresentaram genossensores baseados em PANI, combinados com nanopartículas de ouro. Um eletrodo à base de nanofibras de PANI sulfonada (SPAN) e nanopartículas de ouro/cisteamina CA-G_{NP} em camadas alternadas foi preparado. O DNA alvo foi detectado até $2.13 \times 10^{-13}\text{mol /L}$ e a viabilidade para a detecção de DNA não complementar também foi demonstrado por Du et al. (2010). Outro sensor cronocoulométrico de DNA, foi desenvolvido em um eletrodo *screen-printed* dopado por nanotubos de PANI (PANINTs) e sondas marcadas por nanopartículas de ouro utilizadas como indicadores redox (Wang et al.,2011). O limite de detecção foi de $8.0 \times 10^{-17}\text{M}$ (Ren et al.,2010).Outro eletrodo de ouro foi modificado por nanopartículas de ouro e PANI (AuNpPANI). Tal sistema foi desenvolvido para detecção de sorotipos 1, 2 e 3 da Dengue, demonstrado por Nascimento et al. (2011).

Uygun (2009) preparou um sistema eletroquímico simples *label-free* para reconhecimento de DNA do sensor electroquímico por polimerização de 4-hidroxi-feniltiofeno-3-carboxilato. Sequências de DNA ricas em “C”, com o potencial para detecção de genoma humano e o DNA dos telômeros humanos, foi especialmente desenvolvido (Schlachter et al., 2012; Guo et al.,2010).

Recentemente, (Hao et al., 2014) demonstrou um genossensor para detecção do vírus da hepatite B. A sonda de DNA foi marcada com enzima HRP, formando um conjugado (HRP-PANI). O sistema apresentou um baixo limite de detecção, 1.0 fM.

Genossensores baseados em Aptâmeros-PANI

Aptâmeros são pequenas moléculas de oligonucleotídeos capazes de reconhecer e ligar-se ao alvo com afinidade e especificidade elevada (Farokhzad et al., 006). Biossensores baseados nestas moléculas utilizam uma sequência de oligonucleotídeos (DNA ou RNA) de

cadeia simples sintetizada artificialmente que são capazes de reconhecer diversas moléculas com afinidade e especificidade elevadas (Feriotto et al.,2001; Tombelli et al.,2007; Labuda et al.,2010).

Um sistema para detecção de Ocratoxina A (OTA) toxina produzida por *Aspergillus Ochraceus* e *Penicillium Verrucosum* foi desenvolvido por Prabhakar et al. (2011). O limite de detecção foi de 0.1ng/ml e constante de afinidade da ligação encontrada foi de $1.21 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$

¹ Outro aptasensor *Label-free* baseado em nanocompósitos de grafeno e PANI (GR-PANI) foi demonstrado para detecção de dopamina (DA) em amostras de soro humano. A nanoestrutura altamente condutora biocompatível foi caracterizada e avaliada. O aptasensor apresentou resposta linear de 0.007-90 nmol/L e limite de detecção de 0.00198 nmol / L (S /N = 3) (Liu et al., 2012).

Uma nova plataforma versátil para detecção de aptâmeros foi baseado em modelo PANI-DNA-HRP. A plataforma exibiu boa resposta linear na concentração de $1,0 \times 10^{-9}$ M a $1,0 \times 10^{-6}$ M, com o limite de detecção de $5,0 \times 10^{-10}$ M. A estratégia baseada em *DNAzyme* apresentou alto desempenho, que pode ser adaptado para quantificar uma grande variedade de analitos (Li et al.,2013). A tabela a seguir demonstra os principais genossensores baseados em PANI relatados na literatura nos últimos sete anos (2007 a 2014), assim como, metodologia empregada, resultados e sistema diagnóstico utilizado.

Tabela 1- Principais referências de genossensores baseados em polianilina (PANI).

Eletrodos	Métodos	Resultados	Deteção	Referência
Genossensor- BDC- avidina-PANI	VPD e EIS	0.00025–0.125 fmol LOD 0.125 fmol	<i>E.coli</i>	Arora et al. (2007)
Genossensor-AAO- Grafite-PANI	VC e VPD	De 1.0 fmol a 37.59 fmol	mutações genéticas	Chang et al. (2007)
Genossensor PNA-PANI/Au DNA-PANI/Au	VC, VOQ, EIS e FT-IR	PNA-PANI/Au ($0.125 \times 10^{-18} \text{M}$) DNA-PANI/Au ($2.5 \times 10^{-18} \text{M}$)	<i>M.tuberculosis</i>	Prabhakar et al. (2008)
Genossensor DNA- PNA-PANI	SPR	<5nM	PNA-HRP	Su et al. (2008)
Genossensor- Fe ₂ O ₃ /SPAN	VC e EIS	1.0×10^{-13} to 1.0×10^{-7} mol/L, LOD- 2.1×10^{-14} mol/L	fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPCase)	Zhang et al. (2009)
Genossensor- ssDNA tiolado/PANI	VC	LOD 0.1 nM	Mutações genéticas	Zhou et al. (2009)
Genossensor- SPAN- CA-G _{NP}	EIS e Cronoamperometria	LOD 2.13×10^{-13} mol / L	Sequências de DNA incompatíveis	Du et al. (2010)
Genossensor- PANINT-	VC e Cronocoulometria	$2.0 \times 10^{-16} \text{M}$ a $1.0 \times 10^{-14} \text{M}$	Sequências de DNA incompatíveis	Ren et al. (2010)

IL/chitosan/AuNP SPE		e LOD 8.0×10^{-17} M		
Genossensor- AuPANI/Biotina- estreptavidina-HRP	VC,EIS,PCR	LOD 0.5pM	<i>T. pallidum</i>	Sheng et al.(2010)
Genossensor - aDNA- Glu-PANI-CNT/ITO	VC, VPD e FT-IR	1×10^{-6} e 1×10^{-17} LOD 1.2×10^{-17}	<i>N. gonorrhoeae</i>	Singh et al. (2010)
Genossensor-Grafeno- PANIw-DNA	VC e EIS	2.12×10^{-6} e 2.12×10^{-12} mol L ⁻¹ LOD 3.25×10^{-13} mol L ⁻¹	Sequências de DNA incompatíveis	Bo et al. (2011)
Genossensor- AuNP/PANI	EIS e VC	ΔR_{ct} (%) - ST1 (87.5%), ST2 (71.03%) e ST3 (64%)	dengue (sorotipos 1, 2 e 3)	Nascimento et al. (2011)
Genossensor- HHF/Au/nanoSPAN/G CE	VC e EIS	1.0×10^{-13} M to 1.0×10^{-6} M e LOD 1.9×10^{-14}	vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S)	Wang et al. (2011)
Aptassensor- DNA/PANI-SA/ITO	VC, EIS e FT-IR	1.21×10^7 M ⁻¹ LOD - 0.1ng/ml	<i>Aspergillus Ochraceus</i> / <i>Penicillium Verrucosum</i>	Prabhakar et al. (2011)
Genossensor PANI- NF-AuNP	VC e EIS	150×10^{-12} to 1×10^{-6} mol L ⁻¹	<i>S. aureus</i>	Spain et al. (2011)
Aptassensor- GR-PANI	VC,VOQ e EIS	0.007-90 nmol/L LOD- 0.00198 nmol / L	Dopamina em soro humano	Liu et al. (2012)
Genossensor-GCE- ERGNO-PANI	VC, VPD, VPD e EIS	1.0×10^{-13} a 1.0×10^{-7} mol L ⁻¹ LOD- 3.2×10^{-14} mol L ⁻¹ .	vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S)	Du et al. (2012)
Aptasensor-CNTs- PANI	VC e EIS	LOD 80nM (SWCNT) 71 nM (PANI)	Trombina	Duzgun et al. (2013)
Genossensor-Au- SPAN PATP	VC e EIS	1.0×10^{-14} mol L ⁻¹ a 1.0 $\times 10^{-8}$ mol L ⁻¹ LOD- 2.3 $\times 10^{-15}$ mol L ⁻¹	vírus do mosaico de couve-flor (CaMV35S)	Hu et al. (2013)
Aptassensor-ERGNO- PANI-GCE	EIS	1.0×10^{-15} a 1.0×10^{-8} mol /L LOD 2.5×10^{-16} mol / L	<i>fosfinotricina- acetiltransferase (PAT)</i>	Yang et al. (2013)
Aptâmeros PANI- DNA-HRP	CV e VPD	1.0×10^{-9} M a 1.0×10 (⁻⁶) M, LOD- 5.0×10 (⁻¹⁰) M.	DNAzimas-peroxidase	Li et al. (2013)
Genossensor PANI- HRP	CV e UV-Vis	LOD 1.0 fmol	Vírus da Hepatite B	Hao et al.(2014)

Conclusões e perspectivas

Sensores eletroquímicos baseados na modificação de suas superfícies por PCs e principalmente a PANI são atrativos, pois combinam a alta sensibilidade dos métodos eletroquímicos tradicionais com as novas possibilidades de aumento de condutividade, seletividade e estabilidade. Muitas das atuais limitações dos sensores eletroquímicos podem, potencialmente, ser superadas pela modificação/planejamento das superfícies em escala molecular, visando satisfazer as necessidades específicas de cada tipo de sensor eletroquímico, em função de sua aplicação.

Diante do trabalho exposto, podemos concluir que as tecnologias de modificações nas superfícies dos eletrodos por PANI podem ser bastante promissoras em diversas áreas de

aplicação. Além disso, materiais advindos da nanotecnologia apresentam grandes perspectivas para o desenvolvimento de novos genossensores. Tais possibilidades apresentam-se como recentes tecnologias em sensores utilizados nos diagnósticos clínicos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao apoio concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Lista de abreviaturas e siglas

Au- Ouro
AuNp- Eletrodo de ouro
AuNR- Nanobastões de ouro (*Nanorods*)
BDC-avidina- Complexo biotina-estreptavidina
dNTPs -Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dsDNA- *double strand* DNA (fita dupla)
EIS- Espectroscopia de impedância
Fmol- Femtomol
FT-IR- Espectroscopia infra Vermelho
GCE- Eletrodo de carbono vítreo
GLUT- Glutaraldeído
GNPs- Nanopartículas de ouro
GR/ ERGNO- Grafeno
HHFAu- Microesferas de ouro
ITO- Indium tin-oxide
LOD- Limite de detecção
MB- azul de metileno
MEV/SEM- Microscopia eletrônica de varredura
MWNT/ CNT- Nanotubos de carbono
nanoSPAN- nanofibras de polianilina
PANI- Polianilina
PATP- monocamada p-aminotiofenol
PCs-Polímeros condutores
PNA- Ácido nucleico peptídico
PPy- Polipirrol
RNA- Ácido Ribonucléico
RT-PCR- Reação polimerase em cadeia
S₁- Corrente capacitiva
S₂- Corrente faradáica
SA – ácido esteárico
SCE- eletrodo saturado de calomelano
ssDNA- *single strand* DNA (fita simples)
UV-Vis- Espectroscopia ultravioleta-visível
VC/CV- Voltametria cíclica
VOQ/SWV- Voltametria de onda quadrada
VPD/DPV- Voltametria de pulso diferencial

Referências

- AHUJA, T; M. I. R, I. A; KUMAR, D. et al. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. **Biomaterials**, v. 28, n. 5, p. 791–805, 2007.
- ALLEN, M.J., TUNG, V.C., KANER, R.B., **Chemical Reviews**. v.110, p.132–145, 2010.
- ARORA, K; PRABHAKAR, N; CHAND, S. et al. Ultrasensitive DNA hybridization biosensor based on polyaniline. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 5, p. 613–620, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17855071>>. Acesso em: 24 jan. 2014.
- BARTOSIK, M; HRSTKA R; PALECEK, E. et al. Magnetic bead-based hybridization assay for electrochemical detection of microRNA. **Analytica Chimica Acta**, v.813, p.35-40, 2014. Doi: 10.1016/j.aca.2014.01.023.
- BO, Y; YANG, H; YING, H. U. et al. A novel electrochemical DNA biosensor based on graphene and polyaniline nanowires. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 6, p. 2676–2681, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468610016671>>. Acesso em: 24 jan. 2014.
- BROWNSON, D.A.C., BANKS, C.E., **Analyst**, v.135, p.2768–2778,2010.
- BUCKO, M. et al. Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro- to nanoscale systems. **Chemical Papers**, v. 66, n.11, p. 983-998, 2012.
- CAMPOS-FERREIRA, D. S; NASCIMENTO, G. A; SOUZA, E. V. et al. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. **Analytica Chimica Acta**, v.4, n.804, p.258-263, 2013. Doi: 10.1016/j.aca.2013.10.038.
- CHANG, H; YUAN, Y; SHI, N. Electrochemical DNA biosensor based on conducting polyaniline nanotube array. **Analytical Chemistry**, v.79, p.5111–5115, 2007. Doi:10.1021 /ac070639m.
- CHEN, X. et al. A sensitive and selective label-free DNAzyme-based sensor for lead ions by using a conjugated polymer. **Analytical Methods**, v. 4, n. 6, p. 1619-1622, 2012.
- COOPER, J. M; CASS, A. E. G; **Biosensors**. Oxford University Press, - v.251 2.ed, 2004 ISBN:9781601195357.
- D' ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica Chimica Acta**. v.412, n.19-20, p. 1749-1761, 2011. Doi: 10.1016/j.cca.2011.06.025.
- DALTAMIR, J. M., DE PAOLI, M.A., ALVES, O. L., Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**. V.23 n.2, p.204-215, 1999.
- DHAND, C; DATTA, M. M; MALHOTRA, B. D. Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p.2811–2821, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2010.10.017.
- DU, M; YANG, T; JIAO, K. Rapid DNA electrochemical biosensing platform for label-free potentiometric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v.81, n. 3, p. 1022–1027, 2010. Doi:10.1016/j.talanta.2010.01.053.

- DU, M; YANG, T; LI, X; JIAO, K. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. **Talanta**, v. 88, p. 439–444, 2012.
- FAN, H. C; GU, W; WANG, J. et al. Non-invasive prenatal measurement of the fetal genome. **Nature**, v. 487, p. 320–324, 2012.
- FAROKHZAD, O. C; CHENG, J; TEPLY, B. A. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n.16, p. 6315-6320, 2006.
- FERIOTTO, G; CORRADINI, R; S. FORZA, S. et al. Peptide nucleic acids and biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X mutation by surface plasmon resonance. **Laboratory Investigation**, v. 81, p. 1415-1427, 2001.
- GALLI, A; DE SOUZA, D; GARBELLINI, G. S. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.
- GE, X; ZHANG, W.Y; LIN, Y. et al. Magnetic Fe₃O₄@TiO₂ nanoparticles-based test strip immunosensing device for rapid detection of phosphorylated butyrylcholinesterase. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 486–491, 2013.
- GE, X; ASIRI, A. M; DU, D. et al. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 58, p.31-39, 2014. Doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.03.008>.
- GENC, R; MURPHY, D; FRAGOSO, A. et al. Signal-Enhancing Thermosensitive Liposomes for Highly Sensitive Immunosensor Development. **Analytical Chemistry**, v. 83, p.563-570, 2011.
- GUO, X.C., LIU, J., ZHANG, H.L., **Analytica Chimica Acta** v.668 n.2, p.208–214, 2010.
- GUO, L; ZHOU, X; KIM, D. Facile fabrication of distance-tunable au-nanorod chips for single-nanoparticle plasmonic biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, p. 2246 -2251, 2011.
- HAO, Y; ZHOU, B; WANG, F. Construction of highly ordered polyaniline nanowires and their applications in DNA sensing. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 52, p. 422–426, 2014. Doi:10.1016/j.bios.2013.09.023.
- HE, J. B; JIN, G. P; CHEN, Q. Z. et al. A quercetin-modified biosensor for amperometric determination of uric acid in the presence of ascorbic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 585, n. 2, p. 337–43, 2007.
- HU, Y; YANG, T; LI, Q. et al. Conjugated self-doped polyaniline-DNA hybrid as trigger for highly sensitive reagentless and electrochemical self-signal amplifying DNA hybridization sensing. **Analyst**. v. 138 n.4, p. 1067–1074, 2013.
- HUANG, Y; QIN, X; LI, Z. et al. Fabrication of a chitosan/glucose oxidase-poly(anilineboronic acid)-Au (nano) /Au-plated Au electrode for biosensor and biofuel cell. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 31, p. 357–362, 2012. doi:10.1016/j.bios.2011.10.045.
- IOST, R. M; CRESPILO, F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**. v.31, p. 1–10, 2012. doi:10.1016/j.bios.2011.10.040.

- KANG, Y; KIM, S. K; LEE, C. **Materials Science and Engineering**. V.24, p.39, 2004.
- KERMAN, K; MORITA, Y; TAKAMURA, Y. Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode. **Electrochemistry Communications**.v.5, p.887–891, 2003.
- LABUDA, J; BRETT, A. M. O; EVTUGYN, G; et al. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v.82, p.1161–1187, 2010. Doi:10.1351/PAC-REP-09-08-16.
- LI, S; LI, J; WANG, K. et al. A Nanochannel Array-Based Electrochemical Device for Quantitative Label-free DNA Analysis. **ACS nano**. v.4, n.11, p. 6417–6424, 2010.
- LI, F; YANG, L; CHEN, M. et al. A novel and versatile sensing platform based on HRP-mimicking DNazyme-catalyzed template-guided deposition of polyaniline. **Biosensors and Bioelectronics**. v.41, p.903–906, 2013. Doi:10.1016/j.bios.2012.09.048.
- LIU, X; QU, X; DONG, J. et al. Electrochemical detection of DNA hybridization using a change in flexibility. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26, p.3679–3682, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2011.01.034.
- LIU, S; XING, X; YU, J. et al. A novel label-free electrochemical aptasensor based on graphene-polyaniline composite film for dopamine determination. **Biosensors and Bioelectronics**. v.36, p.186–191, 2012. Doi:10.1016/j.bios.2012.04.011.
- MARRAZZA, G; TOMBELLI, S; MASCINI, M. et al. Detection of human a polipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR. **Clinica Chimica Acta** v.307, p.241–248, 2001.
- MEDEIROS, E.S, OLIVEIRA, J.E, FILHO, N.C, PATERNO, L.G, MATTOSO, L.H.C. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.7, p. 62 – 77, 2012.
- MONOŠÍK, R; STREĎANSKÝ, M; ŠTURDÍK, E; Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca** v.5, p.109–120, 2012. Doi:10.2478/v10188-012-0017-z.
- MULCHANDANI, A., MYUNG, N.V; Conducting polymer nanowires-based label-free biosensors. **Current Opinion in Biotechnology**. v.22, p.502–508, 2011.
- MURPHY, L; **Current Opinion in Chemical Biology**. v.10, p.177–184, 2006.
- NARANG, J; CHAUHAN, N; JAIN, P. et al. Silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline film for amperometric glutathione biosensor. **International Journal of Biological Macromolecules** v.50, p.672–8, 2012. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.01.023.
- NASCIMENTO, H.P.O; OLIVEIRA, M.D.L; DE MELO, C.P; Silva, et al. An impedimetric biosensor for detection of Dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces: B Biointerfaces** v.86, p.414–9, 2011. Doi:10.1016/j.colsurfb.2011.04.028.
- NASCIMENTO, G.A; SOUZA, E.V.M; CAMPOS-FERREIRA, D. S. et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**. v.38, p.61–66, 2012.

- OLIVEIRA, J.E; CONSOLIN-FILHO, N; PATERNO, L.G. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.8.n.1 Parte 3: Biossensores 1, p.1–11, 2013.
- PAN, S.Y; XU, J; SHU, Y.Q. et al. Double recognition of oligonucleotide and protein in the detection of DNA methylation with surface plasmon resonance biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26 n.2, p.850-853, 2010. Doi: 10.1016/j.bios.2010.08.007.
- PENG, H; ZHANG, L; SOELLER, C. et al. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. **Biomaterials**. v. 30, p. 2132, 2009.
- PRABHAKAR, N; ARORA, K; SINGH, H. et al. **Journal of Physical Chemistry B** v.112, p.4808–4816, 2008.
- PRABHAKAR, N; MATHARU, Z; MALHOTRA, B.D. Polyaniline Langmuir-Blodgett film based aptasensor for ochratoxin A detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26, p.4006–4011,2011. Doi:10.1016/j.bios.2011.03.014.
- PUMERA, M; **Chemical Record**. v.9, p.211–223, 2009.
- PUMERA, M., AMBROSI, A., BONANNI, A., CHNG, E.L.K., POH, H.L; **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**. v.29, p.954–965, 2010.
- QI, P; Y. WAN; D. ZHANG.Impedimetric biosensor based on cell-mediated bioimprinted films for bacterial detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v.39, n.1, p. 282-288, 2013.
- REN, R; LENG, C; ZHANG, S; A chronocoulometric DNA sensor based on screen-printed electrode doped with ionic liquid and polyaniline nanotubes. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, p.2089–2094,2010. Doi:10.1016/j.bios.2010.02.006.
- SANTOS, A.C., LUZ, R.A.S., FERREIRA, L.G.F., JUNIOR, J.R.S., SILVA, W.C., CRESPILO, F.N., **Química Nova**. v.33, p.539–546,2010.
- SASSOLAS, A; LECA-BOUVIER, B.D; BLUM, L.J; DNA biosensors and microarrays. **Chemical Reviews**. v.108, p.109–39,2008. Doi:10.1021/cr0684467.
- SCHLACHTER, C., LISDAT, F., FROHME, M., ERDMANN,V.A., KONTHUR, Z., LEHRACH,H., GLOKLER,J. **Biosensors and Bioelectronics**. V.31, n.1, p.571–574, 2012.
- SHENG, Q., WANG, J., ZHENG, J., XU, Z., ZHANG, H; Ultrasensitive electrical biosensing of syphilis DNA using target-guided formation of polyaniline based on enzyme-catalyzed polymerization. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25 n.9, p. 2071–2077, 2010.
- SINGH, R; VERMA, R; SUMANA, G; SRIVASTAVA, A.K. et al. Nanobiocomposite platform based on polyaniline-iron oxide-carbon nanotubes for bacterial detection. **Bioelectrochemistry** v.86, p.30–7, 2010. doi:10.1016/j.bioelechem.2012.01.005
- SIQUEIRA JR, J.R; et al. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**. v.25, n.6, p.1254–1263,2010.
- SOTIROPOULOU, S; GAVALAS, V; VAMVAKAKI, V. et al. Novel carbon materials in biosensor systems, **Biosensors and Bioelectronics**. v. 18, p. 211-215, 2003.

- SOUZA, E; NASCIMENTO, G; SANTANA, N. et al. Label-Free Electrochemical Detection of the Specific Oligonucleotide Sequence of Dengue Virus Type 1 on Pencil Graphite Electrodes. **Sensors** v.11, p.5616-5629, 2011.
- SPAIN, E; KOJIMA, R; KANER, R. B. et al. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26 n.5, p. 2613–2818, 2011.
- STEJKAL, J; GILBERT, R. G. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer(IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**. v.74, n.5,p. 857- 867, 2002. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050857>.
- TOMBELLI,S; MINUNNI, M; MASCINI, M., **Biomolecular. Engineering**. v.24, n.191, 2007.
- UYGUN, A. **Talanta** v.79 , p.194–198, 2009.
- VO-DINH T, CULLUM B. Review: Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**. v. 366 n.6-7, p.540-551, 2000.
- WANG, J; KAWDE, A. Pencil-Based Renewable Biosensor for Label-Free Electrochemical Detection of DNA Hybridization. **Analytica Chimica Acta** v.431, n.2, p.219-224, 2001.
- WANG, Y; XU, H; ZHANG, J; LI, G. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors**, v. 8, n. 4, p. 2043–2081,2008.
- WANG, L; LIU, Q; HU, Z. et al. A novel electrochemical biosensor based on dynamic polymerase-extending hybridization for E. coli O157:H7 DNA detection. **Talanta** v.78, p.647–652, 2009. Doi:10.1016/j.talanta.2008.12.001
- WANG, X; YANG, T; LI, X; JIAO, K; Three-step electrodeposition synthesis of self-doped polyaniline nanofiber-supported flower-like Au microspheres for high-performance biosensing of DNA hybridization recognition. **Biosensors and Bioelectronics**. v.26, p.2953–2959, 2011. Doi:10.1016/j.bios.2010.11.045.
- WANG, H.N; DHAWAN, A; DU, Y. et al. Molecular sentinel-on-chip for SERS-based biosensing. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v.15, n.16, p.6008-6015,2013. Doi: 10.1039/c3cp00076a.
- YANG, T; LI, Q; LI, X.et al. Freely switchable impedimetric detection of target gene sequence based on synergistic effect of ERGNO/PANI nanocomposites. **Biosensors and Bioelectronics**. v.42, p.415–8,2013. Doi:10.1016/j.bios.2012.11.007.
- ZHANG, A.J; CHEN, J; NIU, D. et al. **Synthetic Metals**. v.159 n.15–16, p. 1542–1545, 2009.
- ZHANG, C.Q; LI, G.C; PENG, H.R; **Materials Letters**. v.63, p.592–594, 2009 a.
- ZHANG, X. Z; JIAO, K; LIU, S. F. et al. **Analytical Chemistry** v.81, p.6006–6012, 2009 b.
- ZHAO, D; GUO, X; GAO, Y. et al. An electrochemical capacitor electrode based on porous carbon spheres hybridized with polyaniline and nanoscale ruthenium oxide. **ACS Appl. Mater. Interfaces** v.4, p.5583–9, 2012. Doi:10.1021/am301484s.

- ZHOU, Y; YU, B; GUISEPPI-ELIE, A. et al. potentiometric monitoring DNA hybridization. **Biosensors and Bioelectronics**. v.24, p.3275–80, 2009. Doi:10.1016/j.bios.2009.04.023.
- ZHU, X; YURI, I; GAN, X. et al. Electrochemical study of the effect of nano-zinc oxide on microperoxidase and its application to more sensitive hydrogen peroxide biosensor preparation. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1600–1604, 2007.
- ZHU, W; DONG, J; UCHIDA, K; WATANABE, K.-I. et al. Bovine papillomavirus type 10 with a deletion associated with a lingual papilloma in a cow. **Veterinary journal**. p. 10–12, 2013.

CAPÍTULO III

Artigo Científico II

Periódico: Biosensors and Bioelectronics

Label-free electrochemical genosensor for bovine papillomavirus detection using anodic aluminum oxide/polyaniline composites as transducer

Paula V.V. Souza^{a*}, Mízia M.S.Silva^d, Carlos H. M. Castelletti^{a,b}, Danyelly Brunaska^{a,c}, José L. Lima-Filho^{a,c}, Gustavo A. Nascimento^{a*}, Luiz B. Carvalho Jr^{a,c}

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

b Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA), Av. General San Martin,1371,Bongi,50761-000,Recife/PE,Brazil.

c Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas (PPGCB), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife/PE,Brazil.

d Laboratório de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego,s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife/PE, Brazil

Corresponding authors at: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil. Tel/fax: +55 (81) 2126-8485. e-mail address: galvesn23@gmail.com (G.A.Nascimento), Paulavir@yahoo.com.br (P.V.V.Souza).

Abstract

A novel label-free electrochemical genosensor for bovine papillomavirus (BPV) detection on anodic aluminum oxide/polyaniline composites (AAO-PANI) was reported. A specific BPV probe sequence was used as bioreceptor. This BPV probe was immobilized on a working electrode composed of AAO doped with PANI and glutaraldehyde. Electronic scanning microscopy (SEM) and Differential pulse voltammetry (DPV) were applied to characterize the assembly process of the modified electrode. The AAO-PANI-BPV_probe produced a significant increase in current peak (1.72 μ A) compared to AAO-BPV_probe (0.21 μ A), which demonstrated the role of PANI as a conducting polymer and signal amplifier in the genosensor system. BPV target as well as biological samples from bovine blood were verified by detection system. After hybridization of the BPV target in the AAO-PANI-GLUT-BPV_probe electrode there was a decrease in the electrochemical signal. This decrease corresponds to a detection of bovine papillomavirus infections. The detection limit of genosensor system was 51 nM. The genosensor exhibited a rapid, sensitive and selective response in the detection of bovine papillomatosis. Furthermore, the new biosensor presented a promising platform for the fabrication of electrochemical devices.

Keywords: Electrochemical genosensor, Bovine papillomavirus, anodic aluminum oxide, Polyaniline.

1. Introduction

Bovine papillomaviruses (BPV's) belong to the Papillomavirus genre in the *Papillomaviridae* family (Bernard et al., 2010; Chagas et al., 2013). It is a *circular*, double-stranded DNA virus with approximately 8000bp and a 55 nm diameter. The viral genome contains 10 open sequences of (ORF-open reading frames) and a regulatory region. The genes are divided between Early (E1, E2, E4, E5, E6, E7) and Late (L1, L2) (Campo and Roden, 2010; Freitas et al., 2011; Silva et al., 2013). Thirteen genotypes of BPV (BPV-1 to BPV-13) have been classified into three different genres: *Deltapapillomavirus* (BPV-1, BPV-2 and BPV-13), *Epsilonpapillomavirus* (BPV-5 and BPV-8) and *Xipapillomavirus* (BPV-3, -4, -6, -9, -10, -11 and -12), and a non assigned PV genre (BPV-7) (Tomita et al., 2007; Claus et al., 2008; Hatama et al., 2011; Zhu et al., 2011; Mengual-Chuliá et al., 2012; Lunardi et al., 2013). The FAP59/64, MY09/11, GP5 (+)/6(+), subAup/Adw and subBup/Bdw primers allow for the detection of new types of BPV (Hatama et al., 2011). The virus displays tropism for epithelial cells, causing infections on animal's skin and mucous membrane. The neoplastic differentiation of such cells is the main risk factor for cancer development (Campo, 2006; Freitas et al., 2011; Corteggio et al., 2013; Silva et al., 2013).

The biosensors are diagnostic tools for the premature detection of BPV, preventing economic losses in bovine livestock of up to several millions per year (Campo and Roden, 2010; Siddiquee et al., 2010; Brandt et al., 2011). Electrochemical DNA genosensor technologies are based on hybridization of a single-stranded DNA (probe) and complementary sequence (target). They form a double strand on the transducer's surface (dsDNA- *double strand*), also known as hybrid or stable DNA (Liu et al., 2011). This specific sequence allows for a highly selective and sensitive viral detection (Wang et al., 2010; Monošik et al., 2012; Souza et al., 2011; Labuda et al., 2010).

The greatest advantages of using anodic aluminum oxide Membrane (AAO) in a variety of nanotechnology applications are its capacity to exhibit high sensitivity and conductivity when compared to other materials (Pionern et al., 2011; Venkatesan and Bashir, 2011; Rai et al., 2012; Deng and Toh 2013). The immobilization of bio-specific components, such as oligonucleotides, enzymes and aptamers, is more effective since it allows for the retention of large quantities of bioactive composite in thin film (PANI) and improves the operational stability of biosensors (Wang et al., 2008; Li et al., 2010; Venkatesan and Bashir,

2011; Escosura–Muñiz and Merkoçi, 2012; Kong et al.,2012; Jalal and Yu, 2012; He et al.,2012; Ates,2013; Hao et al .,2014).

Conductive polymers (PC's-polyacetylene, polyaniline, polypyrrole and polythiophene) have electrochemical properties of great interest in the field of biosensors. Conjugated π electrons (conductors), when doped, may achieve up to 10^6 S cm^{-1} (Daltamir et al., 1999; Heeger, 2001; Peng et al., 2009; Oliveira et al., 2008). The following are advantages of polyaniline: 1) direct and easy deposition on the sensor electrode, 2) thickness control, 3) redox conductivity and polyelectrolyte characteristics, 4) high surface area, 5) chemical specificities, 6) long term environmental stability and 7) tunable properties (Dhand et al., 2011). However, formation of PANI–DNA complex has recently been demonstrated for several authors (Arora et al.,2007; Zhang et al.,2009; Sheng et al.,2010; Wang et al.,2011; Bo et al.,2011; Spain et al.,2011; Du et al.,2012; Chen et al.,2012; Pawar et al.,2012; Zan and Yu,2012; Ates, 2013; Hu et al.,2013).

The present study aimed at the development of a label-free genosensor system based on anodic aluminum oxide membranes modified by polymeric film of PANI for rapid BPV detection.

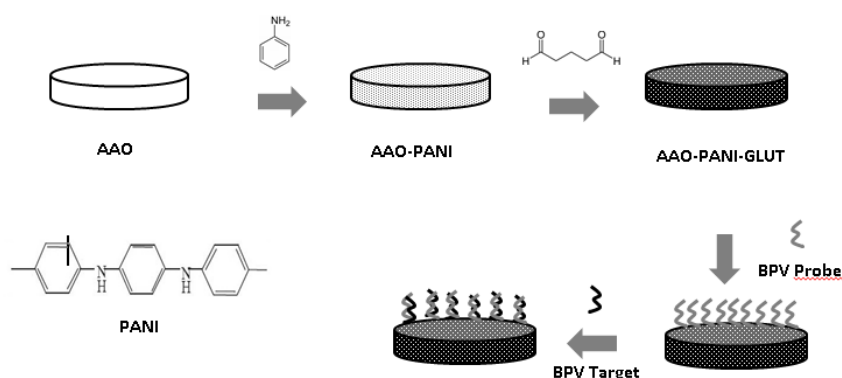


Fig. 1. Schematic representation of the genosensor.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All reagents used were of a high purity. UltraPure™DNase/RNase-Free distilled water was purchased from Invitrogen (USA). Potassium permanganate was purchased from Merck (USA). Nitric Acid and Glutaraldehyde were obtained from Nuclear (Brazil). Citric

Acid was purchased from Vetec (Brazil), while aniline from Sigma-Aldrich (USA). The ssDNA oligonucleotides were synthesized by Integrated DNA Technologies (USA). Anodic aluminum oxide (AAO) membranes (Anodisc™) (diameter 25 mm and pore 0.1 µm) were purchased from Whatman Inc., (Clifton NJ).

2.2. Instrumentations

A conventional three-electrode system was used for this study. AAO membranes (Anodisc™) were employed as a working electrode (working surface of 78.5 mm²), silver/silver chloride (Ag/AgCl) was used as a reference electrode and carbon was used as auxiliary electrode. The polymerization and doping of polyaniline on membranes was carried out in a Water Bath (Marconi- MA 1784). National Center for Biotechnology Information (NCBI) software was used to design probes. Later, the BPV genomes were defined through CLC Workbench v 3.6.1 software to verify remaining viral regions. The electrochemical analysis was performed with a potentiostat (Autolab PGSTAT) controlled by GPES (4.0.007) software. The hybridization experiments were carried out in a Hybridization Oven/Shaker (Amersham Pharmacia Biotech). Statistic analyses were made using the Statistic 8 software. The Scanning Electron Microscopy (SEM) analyses of the composite membranes were performed in a JEOL microscope, model JSM-5600LV.

2.3. Bovine papillomavirus oligonucleotides and Papilloma samples

The oligonucleotides used were aligned by bioinformatics, from 10 types of DNA/BPV. Afterwards, the oligonucleotides lyophilised were diluted with ultrapure water and stored as a stock solution in a freezer (-6° C). Later, the oligonucleotides were diluted from the stock solution in sodium acetate buffer (0.5 M, pH 5). The following three oligonucleotides sequences were used in this study (Nascimento et al.2012):

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

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

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

Papilloma infected Blood samples (n=15) were taken from cattle with cutaneous papillomatosis in the Itambé experimental station of Instituto Agrônômico de Pernambuco

(IPA) in Itambé, Pernambuco, Brazil. In the present work, the viral DNA which was used according to Nascimento et al. (2012).

2.4. Preparation of AAO-PANI-GLUT and BPV probe immobilization

The polymerization and doping of the PANI onto the AAO surface was adapted from Nadruz et al. (1996), Coelho et al. (2001) and Oliveira (2008). Briefly, the AAO membrane was treated with 0.1 M KMnO_4 solution at 50 °C overnight. Afterwards, the treated membrane was washed with distilled water and immersed into 0.5 M aniline solution (5 M HNO_3). Polymerization occurred at 2 h and then AAO-PANI was thoroughly washed with distilled water and subsequently with 0.1 M citric acid. After, AAO-PANI composite was treated with 2.5% v/v glutaraldehyde (GLUT) prepared in acetate buffer (0.5 M, pH 5) for fixed time and then washed with distilled water. For oligonucleotides immobilization, the BPV probe (10 μM) immersed in solution was incubated overnight on AAO-PANI-GLUT membrane at room temperature (26° C) for 16 h and then washed with ultrapure water to remove unbound probes.

2.5. DNA hybridization and electrochemical measurement

The DNA hybridization was performed by adding target BPV to five concentrations, at 1 μM , at 0.5 μM , at 0.25 μM , at 0.125 μM and at 0.0625 μM , then membranes were added and left for 20 min at 55 °C in hybridization oven/shaker (Amersham pharmacia –Biotech). After each procedure, the membranes (AAO) were washed with ultrapure water to remove excess and weakly adsorbed molecules. The biosensors were used to determine the hybridization of DNA samples (collected from infected animals). All concentrations were tested in triplicate. The membrane was attached to the polymerized patented acrylic support and read in acetate buffer at 0.5 M pH 5. The electrochemical performances of the modified electrodes were evaluated by differential pulse voltammetry (DPV) at a potential of -1.5 and +1.5 V, performed with a scan rate of 100 mV s^{-1} .

3. Results and Discussion

3.1. AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe Characterization

Supplementary material

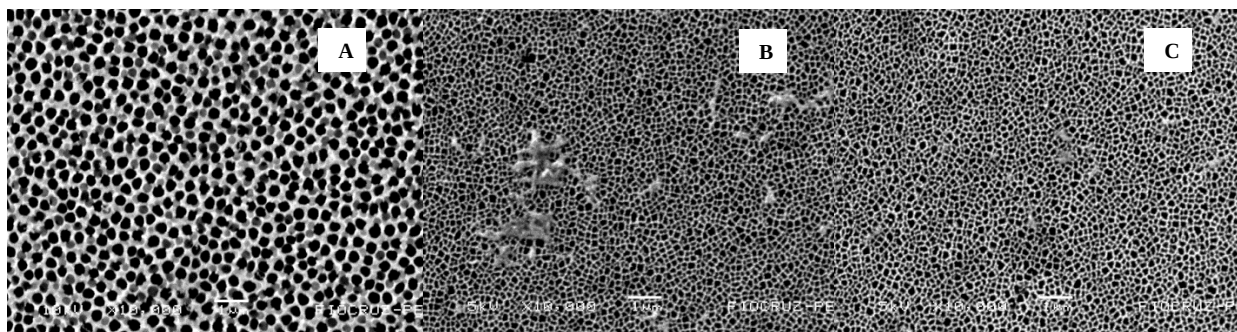


Fig. S1. SEM pictures of (A) AAO membrane (B) AAO-PANI-GLUT (C) AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe electrode at 10 KX.

The microscopy studies on the bare AAO membrane, AAO-PANI-GLUT and AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe electrodes have been performed using a SEM (JSM-5600LV) and the results are shown in Figure S1 in the supplementary material. A thin coating of gold is applied on the samples prior to SEM studies for better resolution of microstructures.

The SEM image under analysis demonstrates a sorted porous alumina film consisting of a closed, hexagonal array of compressed pores – Whatman (inorganic anopore membranes), sized 0,1 μm with pores 25 mm in diameter (fig. S1-A). The micropores on the surface of the membrane are free and considerably homogeneous. Doping the AAO with PANI-GLUT is very efficient in modifying the surface area and the shape of the pores. Thus, the AAO membrane is capable of immobilizing DNA probes through adsorption or cross-linking (fig. S1-B). The third figure illustrates the AAO membrane, shown from above, after a coating with PANI and GLUT, where conformational changes of the pores due to the NH_2 groups linked to the membrane were observed (Fig. S1-C) (Oliveira et al., 2008).

In the current study a anodic aluminum membrane (AAO) was used as a working electrode (WE) (Kumeria et al., 2012; Nguyen et al., 2012). First, electrochemical analyses of the clean electrode were made in order to evaluate the behavior of the AAO membrane in acetate buffer pH 5 (0.5 M). The electrochemical oxidation distinctive of the AAO membrane was achieved at a 0.05 V potential, which generated a current signal of 26 μA (Fig.2) (Rai et al., 2012). All trials presented the same response profile under the same experimental conditions, thus confirming the reproducibility of the biosensor system.

Aiming at amplification of electrochemical signals, the AAO membrane was chemically polymerized with PANI, seeing as how this polymer has conducting properties

inherent to its chemical structure. An important criterion in the choice of potentially conductive polymers is how easily the system can be oxidized or reduced, as is the case of PANI (Du et al., 2012; Arenas et al., 2012). When PANI is doped with an acid, a polaron is formed through successive formation of biopositive species. This polaron structure is responsible for electrical conduction through a hopping mechanism in its crystalline region (Dhand et al., 2011; Basavaraja et al., 2012).

Under this condition, PANI presents itself in a partially oxidized state, also known as esmeraldine salt, in which it achieves a higher degree of conductivity. Therefore, the AAO-PANI modified working electrode showed a distinctive electrochemical signal at 0.7 V (Arora et al., 2007), with a current signal of 4 μA , which, in turn, justifies the formation of polymeric film over the AAO membrane. Moreover, it was possible to observe a current in the distinctive AAO membrane potential (Fig. 2).

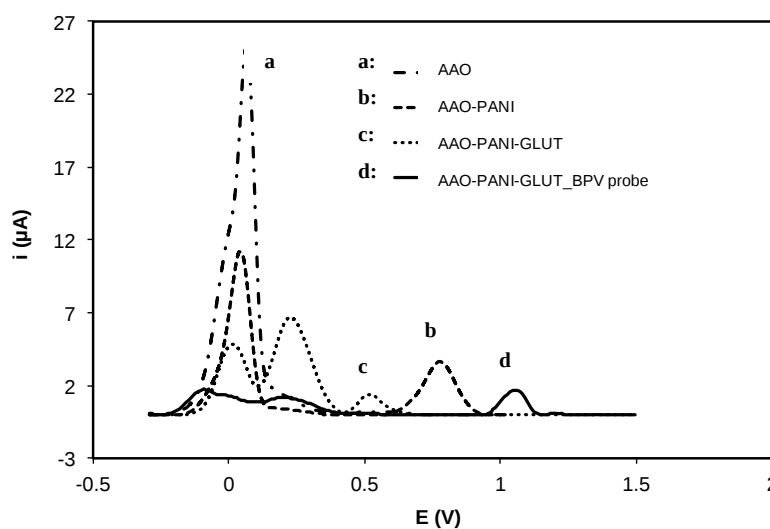


Fig. 2. Electrochemical characterization by successive differential pulse voltammetry of AAO electrode at different stages of the experiment: AAO; AAO-PANI; AAO-PANI-GLUT; AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe (10 μM). Conditions: potential range -1.0 V to 1.5 V performed with a scan rate of 100 mVs^{-1} and amplitude modulation of 50 mV.

Knowing that one of the most important steps in the development of a biosensor is a successful immobilization of the bioreceptor, the present study used cross-linking. Hence, the glutaraldehyde was used as a crosslinker agent, as it is a dialdehyde, forming a stable bond

between the carboxylic grouping and the polyaniline-amino (Singh et al., 2010; Prabhakar et al., 2011). In Fig. 2 the functionalized working electrode (AAO-PANI-GLUT) showed three current signals at 0.05 V (5 μ A), 0.25 V (7 μ A) e 0.5 V (2 μ A) potentials. According to literature, electrodes modified with GLUT also showed a current generation at a potential of 0.5 V, which justifies the bond between the GLUT and the PANI over the AAO membrane (Prabhakar et al., 2011). Moreover, a decrease in the current signal at a 0.05 V potential compared to the modified working electrode AAO-PANI was also observed as well as other studies (Scandurra et al., 2011; Patill et al., 2012).

Once the working electrode was functionalized, the BPV probe was immobilized on the transducer (AAO-PANI-GLUT) from a cross-linking between the GLUT functional group and the ssDNA's phosphate radical (Singh et al., 2010). In Fig. 2 the AAO-PANI-GLUT functionalized working electrode, immobilized with a BPV probe showed a signal at a 1.05 V potential (1.72 μ A) (Hotta et al., 2010). The presence of guanines allows for the observation of electrochemical signals of oxidation on the DNA sequence (ssDNA probe) immobilized on the electrode. The guanine's redox signal has been observed in a potential ranging from 0.93 V to 1.0 V (Souza et al., 2011). Guanine has been used in several other studies because it is electro active and thus generates oxidation signal. A common pathway for guanine oxidation involves the conversion of guanine to 8-oxo-guanine. Some advantages can be found in the use of probes with guanines, such as direct detection of guanine oxidation without a redox mediator (Wang, 2008). Fig. 2 also illustrates that the distinctive redox signal of the AAO membrane on the AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe electrode decreases when compared to the working electrode prior to the immobilization of the BPV probe. Moreover, the redox signals corresponding to GLUT in the AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe electrode also decreased when compared to the AAO-PANI-GLUT electrode. Hence, these observations are proof of the immobilization of the BPV probe on the surface of the modified electrode.

3.2. Polyaniline Conductivity

Comparison of the AAO membrane's electrochemical signal before and after the modification was also a valued parameter in the description of the detection system. Fig. 3 illustrates how the BPV probe immobilized on the doped membrane (AAO-PANI) showed a current signal of 1.72 μ A, while the immobilized BPV probe on a non-doped membrane showed a current signal of 0.21 μ A. Under both conditions, the immobilization of the BPV

probe was noticed due to the presence of electrochemical oxidation of the guanine in its distinctive potential. The increase of the redox signal in AAO-PANI-GLUT-BPV_Probe was eight times higher when compared to the redox signal in AAO-GLUT-Probe/BPV. On that account, it was possible to infer that doping PANI on the AAO membrane improves the performance of the detection system. Furthermore, the biosensor does not require redox indicators, as it is a label-free detection system. Several studies have shown the efficiency on PANI in the immobilization of ssDNA (Bo et al.,2011; Dhand et al.,2011;Liu et al.,2012; Du et al.,2012; Hu et al.,2013; Yang et al.,2013). However, one other parameter in question is the electrochemical behavior in response to the interaction between PANI and nucleic acids. According to Wu et al.,2011, electrons modified by PANI have a strong electrochemical effect in the redox signal of the ssDNA and dsDNA and can be used to identify hybridization. PANI chains biocatalytically synthesized onto dsDNA are redox active at neutral pH (Dhand et al., 2011; Matsuguchi and Asahi, 2011; Jafari et al., 2012).

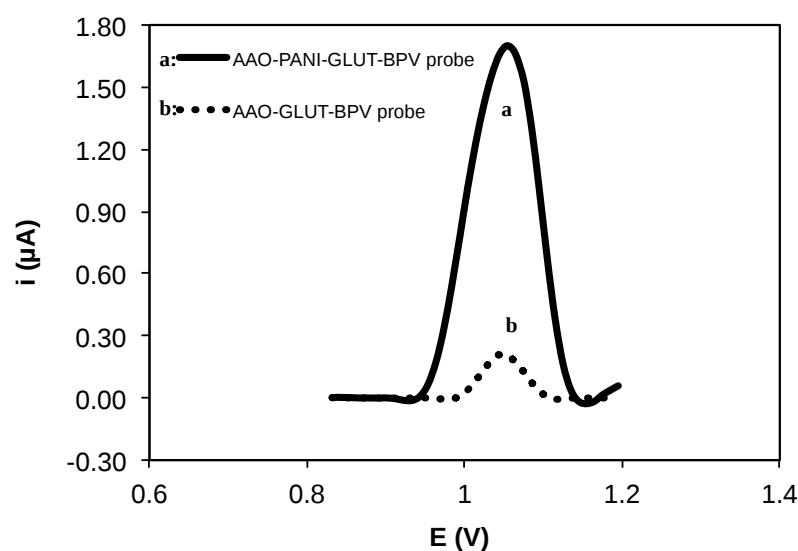


Fig. 3. Differential pulse voltammograms obtained by comparing AAO polymerized electrode and unpolymerized polyaniline: AAO-PANI-GLUT-BPV_probe (10μM); AAO-GLUT-BPV_Probe (10 μM). Conditions: potential range 0.8 V to 1.2 V performed with a scan rate of 100 mV s⁻¹ and amplitude modulation 50 mV.

3.3. Hybridization detection

The biosensor recognition array was applied in experiments on the hybridization reaction between the BPV probe and the target fragment. In this study, the this process was performed with differential potential voltammetry on the guanine electrochemical oxidation.

In figure 4, the voltammograms showed the profile for the different concentrations of the target BPV after hybridization with a BPV probe on modified AAO-PANI-GLUT electrode. The highest signal 141.41 nA was observed at a concentration of 1 μM of target BPV. While concentrations of 0.0625 μM , 0.125 μM , 0.25 μM , 0.5 μM show redox signal of 8 nA, 24.63 nA, 58.6 nA and 108 nA, respectively. From these data we observed that all the current signals decreased after hybridization when compared to BPV probe immobilized on the AAO-PANI-GLUT transducer before hybridization. The decrease occurred due to the matching of the guanines, which connect to corresponding bases, blocking their link to free sites. This pairing decreases or prevents guanine oxidation, promoting a decrease in the current signal. Consequently, this fact indicated that hybridization occurred between probe and target on the working electrode (Liu et al., 2011; Iost and Crespilho, 2012; Monošik et al., 2012).

The linear regression obtained from the electrochemical signal regarding the different concentrations of the BPV target is shown in Fig. 4. The calibration curve ($y = 0.2278x - 0.0037$) is linear between 0.0625 μM and 0.5 μM ($R^2 = 0.99292$, $p = 0.003545$, $n = 4$). The detection limit of 51 nM could be estimated by equation $3\sigma/a$, where σ is the standard deviation of the intercept and a is the slope of the linear regression.

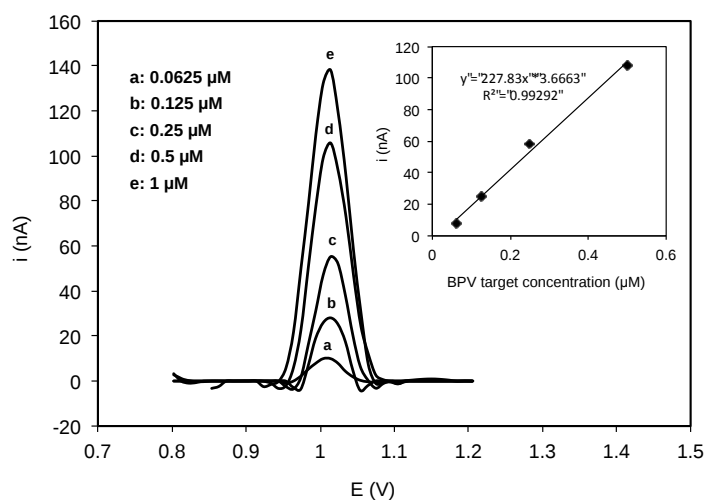


Fig. 4. Differential pulse voltammograms for the guanine oxidation signal on AAO-PANI-GLUT-BPV_probe (10 μM) electrode hybridized with different BPV target concentrations: (a) 0.0625 μM ; (b) 0.125 μM ; (c) 0.25 μM ; (d) 0.50 μM and (e) 1 μM . Conditions: potential range 0.8 V to 1.2 V performed with a scan rate of 100 mVs^{-1} and amplitude modulation 50 mV. Inset represents the linear regression at a concentration range of 0.0625 – 0.5 nM.

3.4. Hybridization detection target DNA/BPV sample and non-complementary

The performance of the electrochemical genosensor was evaluated based on the immobilization of the BPV probe on the AAO-PANI-GLUT electrode and subsequently hybridized with target sequence of non complementary BPV and viral DNA extracted from bovine papillomatosis samples, verifying the guanine's oxidation signal. The differential pulse voltammogram (DPV) with profiles of current peaks found along the electrochemical experiments in order to evaluate specificity and selectivity is shown in fig. 5.

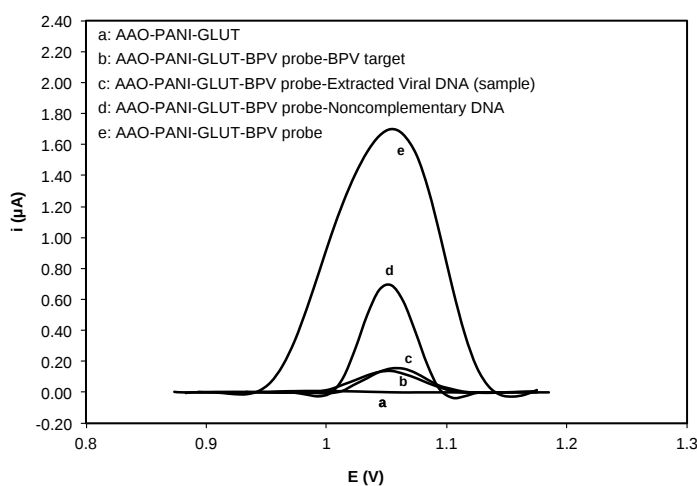


Fig. 5. Differential pulse voltammograms for the guanine electrochemical oxidation of (a) bare electrode AAO-PANI-GLUT; (b) 10 μM BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT after hybridization with 1 μM BPV target; (c) 10 μM BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT after hybridization with 46.90 $\mu\text{g/mL}$ sample of extracted viral DNA from blood bovine; (d) 10 μM BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT after hybridization with 1 μM non-complementary sequence; (e) 10 μM BPV probe immobilized on AAO-PANI-GLUT. Conditions: potential range 0.8 V to 1.2 V performed with a scan rate of 100 mVs^{-1} and amplitude modulation 50 mV.

The highest current signal was shown by the BPV probe immobilized on the electrode (1.70 μA) (Fig.5-e), when compared to other curves. This is due to the guanines in the oligonucleotides, which are free on the electrodes surface. After hybridization of BPV target (Fig.5-b) and BPV biological samples (Fig.5-c), a decrease in the electrochemical signals as well as in the value of significantly similar currents (0.14 μA and 0.15 μA , respectively) were verified, which demonstrates high selectivity of the proposed system (Liu et al., 2012; Yang et al., 2013).

Non-complementary target probes were tested so as to verify the specificity of the system and the current signals found were of 0.70 μA (Fig.5-d), which is explained by non-specific bonds between the sequences (Pournaghi - Azar et al., 2010). Nascimento et al., 2012, demonstrated a similar pattern in the detection of clinical samples of bovine papillomavirus, using screen-printed electrodes modified with polymer poly-L-lysine. The bare AAO-PANI-GLUT electrode (Fig.5-a) did not present an electrochemical signal, which indicated the absence of guanine on the working electrode. Given the above, the genosensor in question has proven to be a quick, highly selective and sensitive system for the detection of bovine papillomatosis infections (BPV).

4. Conclusions

The present study demonstrates that the label-free genosensor built from Anodic aluminum oxide membrane doped by polyaniline (AAO-PANI) is highly sensitive and selective for bovine papilomavirus (BPV). The use of polymer (PANI) in genosensors amplified the electrochemical signal by eight times. As such, this methodology has proven quite efficient in the construction of other systems of viral detection, especially in verifying biological samples.

Acknowledgements

The scientific research was developed at Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE/PE/Brazil) and samples were provided by Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA). Microscopy was performed by Núcleo de plataformas tecnológicas (NPT) - CPqAM/FIOCRUZ e Laboratório de microscopia eletrônica – LIKA / UFPE. This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Arenas, M.C.G., Sanchez, M.E., Nicho, J. Elizalde-Torres., Castano,V.M., 2012.**Appl. Phys. A** 106 (4), 901–908.
- Arora, K., Prabhakar, N., Chand, S., Malhotra, B. D., 2007. Ultrasensitive DNA hybridization biosensor based on polyaniline. **Biosens. Bioelectron.** 23(5), 613–620.
- Ates, M., 2013. A review study of (bio)sensor systems based on conducting polymers. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.** 33, 1853–9.
- Basavaraja,C., Kim,W.J., Kim,D.G., Huh,D.S., 2012. **Polym. Compos.** 33 (3), 388–396.
- Bernard, H.U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., zur Hausen, H., de Villiers, E.M., 2010. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.**Virology.** 401, 70–79.
- Bo, Y., Yang, H., Hu, Y., Yao, T., Huang, S., 2011. A novel electrochemical DNA biosensor based on graphene and polyaniline nanowires. **Electrochimi. Acta.** 56 (6), 2676–2681.
- Borzacchiello, G., Roperto, F., 2008. Review article Bovine papillomaviruses, papillomas and cancer in cattle. **Vet.Res.**1, 1–19.
- Brandt, S., Tober, R., Corteggio, A., Burger, S., Sabitzer, S., Walter, I., Borzacchiello, G. 2011. BPV-1 infection is not confined to the dermis but also involves the epidermis of equine sarcoids. **Vet. Microbiol.** 150 (1-2), 35–40.
- Campo, M.S., 2006. **Bovine papillomavirus: old system, new lessons?** In: Campo, M.S. (Ed.), Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond. Caister Academic Press, Wymondham, 373–388.
- Campo, M. S., Roden, R. B. S., 2010. Papillomavirus prophylactic vaccines: established successes, new approaches. **J.Virol** 84 (3), 1214–1220.
- Chagas, B.S., Batista, M.V.D.A., Crovella, S., Gurgel, A.P.A.D., Silva Neto, J.D.C., Serra, I.G.S.S., Amaral, C.M.M., Balbino, V.Q., Muniz, M.T.C., Freitas, A.C., 2013. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. Infect. **Genet. Evol.** 16, 13–8.
- Chen,C.H. J., Larue,C., Nelson,R.D., Kulinsky,L., Madou,M.J., 2012. **J. Appl. Polym. Sci** 125 (4), 3134–3141.
- Claus, M. P., Lunardi, M., Alfieri, A. F., Ferracin, L. M., Fungaro, M. H. P., Alfieri, A. A., 2008. Identification of unreported putative new bovine papillomavirus types in Brazilian cattle herds. **Vet. Microbiol.** 132 (3-4), 396–401.
- Coêlho, R.A.L., Santos, G.M.P., Azevedo, P.H.S., Jaques, G.A., Azevedo, W.M., Carvalho Jr, L.B., 2001. **J. Biomed. Mater. Res,** 56 -257.

- Corteggio, A., Altamura, G., Roperto, F., Borzacchiello, G., 2013. Bovine papillomavirus E5 and E7 oncoproteins in naturally occurring tumors: are two better than one? **Infect. Agents Cancer** 8 (1), 1-9.
- Daltamir, J. M., De Paoli, M.A., Alves, O. L., 1999. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Quim. Nova**. 23(2), 204-215.
- De la Escosura-Muñiz, A., Merkoçi, A. 2012. Nanochannels preparation and application in biosensing. **ACS Nano**. 6 (9), 7556-7583.
- Deng, J., Toh, C.-S., 2013. Impedimetric DNA biosensor based on a nanoporous alumina membrane for the detection of the specific oligonucleotide sequence of Dengue virus. **Sensors (Basel)**. 13, 7774–85.
- Dhand, C., Das, M., Datta, M., Malhotra, B. D., 2011. Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosens. Bioelectron**. 26(6), 2811–2821.
- Du, M., Yang, T., Li, X., Jiao, K., 2012. Fabrication of DNA/graphene/polyaniline nanocomplex for label-free voltammetric detection of DNA hybridization. **Talanta**. 88, 439–444.
- Freitas, A. C., Silva, M. A. R., Jesus, A. L. S., Mariz, F. C., Cordeiro, M. N., Albuquerque, B. M. F., Batista, M. V. A., 2011. Recent insights into Bovine Papillomavirus. **Afr. J. Microbiol. Res.** 5 (33), 6004-12.
- Hatama, S., Ishihara, R., Ueda, Y., Kanno, T., Uchida, I., 2011. Detection of a novel bovine papillomavirus type 11 (BPV-11) using xipapillomavirus consensus polymerase chain reaction primers. **Arch. virol.** 156 (7), 1281–85.
- Hao, Y., Zhou, B., Wang, F., Li, J., Deng, L., Liu, Y.-N., 2014. Construction of highly ordered polyaniline nanowires and their applications in DNA sensing. **Biosens. Bioelectron**. 52, 422–6.
- He, J., Zhang, T.Y., Chen, G. J., 2012. **Col. Inter. Sci.** 373, 94–101.
- Heeger, A. J., 2001. Semiconducting and Metallic Polymers: the fourth generation of polymeric materials. **J. Phys. Chem. B**. 105, 8475-91.
- Hotta, K., Yamaguchi, A., Teramae, N., 2010. Properties of a metal clad waveguide sensor based on a nanoporous-metal-oxide/metal multilayer film. **Anal. Chem.** 82(14), 6066–6073.
- Hu, Y., Yang, T., Li, Q., Guan, Q., Jiao, K., 2013. Conjugated self-doped polyaniline-DNA hybrid as trigger for highly sensitive reagentless and electrochemical self-signal amplifying DNA hybridization sensing. **Analyst**. 138(4), 1067–1074.
- Iost, R.M., Crespilho, F.N., 2012. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: applications in biosensing and bioelectronics. **Biosens. Bioelectron**. 31, 1–10.
- Jafari, M.J., Azim-Araghi, M.E., Berhemat, S., 2012. **J. Mater. Sci.** 47 (4), 1992–1999.
- Jalal, A.H., Yu, J., Nnanna, A.G.A., 2012. **Appl. Opt.** 51 (17), 3768–3775.

- Kumeria, T., Kurkuri, M. D., Diener, K. R., Parkinson, L., Losic, D., 2012. Label-free reflectometric interference microchip biosensor based on nanoporous alumina for detection of circulating tumour cells. *Biosens. Bioelectron.* 35(1), 167–173.
- Kong, Y., Li, X.Y., Ni, J.H., Yao, C., Chen, Z.D., 2012. *Electrochem. Commun.* 14 (1), 17–20.
- Labuda, J., Oliveira Brett, A.M., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., 2010. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure. Appl. Chem.* 82, 1161–1187.
- Li, S., Li, J., Wang, K., Wang, C., Xu, J., Chen, H., States, U., 2010. A Nanochannel Array-Based. *ACS Nano.* 4(11), 6417–6424.
- Liu, X., Qu, X., Dong, J., Ai, S., Han, R., 2011. Electrochemical detection of DNA hybridization using a change in flexibility. *Biosens. Bioelectron.* 26(8), 3679–3682.
- Lunardi, M., Alfieri, A. A., Otonel, R. A. A., de Alcântara, B. K., Rodrigues, W. B., de Miranda, A. B., Alfieri, A. F., 2013. Genetic characterization of a novel bovine papillomavirus member of the Deltapapillomavirus genus. *Vet. Microbiol.* 162(1), 207–213.
- Matsuguchi, M., Asahi, T., 2011. *Sens. Actuators. B. Chem.* 160 (1), 999–1004.
- Mengual-Chuliá, B., García-Pérez, R., Gottschling, M., Nindl, I., Bravo, I. G., 2012. Novel animal papillomavirus sequences and accurate phylogenetic placement. *Mol. Phylogenet. Evol.* 65(3), 883–91.
- Monošík, R., Stred'anský, M., Šturdík, Ernest., 2012. Biosensors — classification, characterization and new trends. *Acta Chim. Slov.* 5 (1), 109–120.
- Nadruz Jr, W., Marques, E.T.A., Azevedo, W.M., Lima-Filho, J.L., Carvalho Jr, L.B., 1996. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29, 347–350.
- Nascimento, G.A., Souza, E.V.M., Campos-Ferreira, D. S., Arruda, M.S., Castelletti, C.H.M., Wanderley, M.S.O., Ekert, M.H.F., Bruneska D., Lima-Filho, J. L., 2012. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* 38, 61–66
- Nguyen, B.T.T., Peh, A.E.K., Chee, C.Y.C., Fink, K., Chow, V.T.K., Ng, M.M.L., Toh, C., 2012. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina Dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry.* 88, 15–21.
- Oliveira, G.B., Lima-Filho, J.L., Chaves, M.E.C., Azevedo, W.M., Carvalho Jr, L.B., 2008 *Reactive Polymers.* 68, 27–32
- Patil, S.L., Chougule, M.A., Sen, S., Patil, V.B., 2012. *Measurement.* 45 (3), 243–249.
- Pawar, S.G., Chougule, M.A., Sen, S., Patil, V.B., 2012 *J. Appl. Polym. Sci.* 125 (2), 1418–1424.
- Peng, H., Zhang, L., Soeller, C., Travas-sejdic, J., 2009. Conducting polymers for electrochemical DNA sensing. *Biomaterials.* 30, 2132–2148.

- Poinern, G. E. J., Ali, N., Fawcett, D., 2011. Progress in Nano-Engineered Anodic Aluminum Oxide Membrane Development. **Materials**. 4, 487–526.
- Pournaghi-Azar, M.H., Ahour, F., Hejazi, M.S., 2010. Direct detection and discrimination of double-stranded oligonucleotide corresponding to hepatitis C virus genotype 3a using an electrochemical DNA biosensor based on peptide nucleic acid and double-stranded DNA hybridization. **Anal Bioanal Chem**. 397(8), 3581–3587.
- Prabhakar, N., Arora, K., Singh, H., Malhotra, B.D., 2008. **Journal of Physical Chemistry B** 112, 4808–4816.
- Rai, V., Hapuarachchi, H.C., Ng, L.C., Soh, S.H., Leo, Y.S., 2012. Ultrasensitive cDNA Detection of Dengue Virus RNA Using Electrochemical Nanoporous Membrane-Based Biosensor. **PLoS ONE** 7(8), 423–446.
- Scandurra, G., Arena, A., Ciofi, C., Gambadoro, A., Berreca, F., Saitta, G., Neri, G., 2011. **Sens. Actuators B Chem**. 157 (2), 473–481.
- Sheng, Q., Wang, J., Zheng, J., Xu, Z., Zhang, H., 2010. Ultrasensitive electrical biosensing of syphilis DNA using target-guided formation of polyaniline based on enzyme-catalyzed polymerization. **Biosens. Bioelectron**. 25(9), 2071–2077.
- Singh, R., Dhand, C., Sumana, G., Verma, R., Sood, S., Gupta, R. K., Malhotra, B. D., 2010. Polyaniline/carbon nanotubes platform for sexually transmitted disease detection. **J.Mol.Recognit**. 23(5), 472–479.
- Siddiquee, S., Yusof, N.A., Salleh, A.B., Abu Bakar, F., Heng, L.Y., 2010. **Bioelectrochemistry**. 79 (1), 31–36.
- Silva, M.A.R., Batista, M. V. A., Pontes, N. E., Santos, E. U. D., Coutinho, L. C. A., Castro, R. S., Freitas, A. C., 2013. Comparison of two PCR strategies for the detection of bovine papillomavirus. **J.Virol. Methods**. 192(1-2), 55–8.
- Silva, M. A., Altamura, G., Corteggio, A., Roperto, F., Bocaneti, F., Velescu, E., Borzacchiello, G., 2013. Expression of connexin 26 and bovine papillomavirus E5 in cutaneous fibropapillomas of cattle. **Vet. J**. 195(3), 337–343.
- Souza, E., Nascimento, G., Santana, N., Ferreira, D., Lima, M., Natividade, E., Martins, D., Lima, J., 2011. **Sensors**. 11 (6), 5616–5629.
- Spain, E., Kojima, R., Kaner, R. B., Wallace, G. G., O’Grady, J., Lacey, K., Forster, R. J., 2011. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres. **Biosens. Bioelectron**. 26(5), 2613–2818.
- Tomita, Y., Ogawa, T., Jin, Z., Shirasawa, H., 2007. Genus specific features of bovine papillomavirus E6, E7, E5 and E8 proteins. **Virus Research**. 124 (1-2), 231–6.
- Venkatesan, B.M., Bashir, R., 2011. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. *Nat. Nanotechnol*. 6, 615–624.
- Wang, J., Zhang, S., Zhang, Y., 2010. **Anal. Biochem**. 396 (2), 304–309.

- Wang, Q., Zhang, B., Lin, X., Weng, W., 2011. Sensors and Actuators B: **Chemical** 156 (2), 599–605.
- Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., Li, G., 2008. **Sensors** 8 (4), 2043–2081.
- Wu, G., Yang, N., Zhang, T., Wang, Z., Lu, X., Kang, J., 2011. Sensors and Actuators B: **Chemical**. 160 (1), 598–603.
- Yang, T., Li, Q., Li, X., Wang, X., Du, M., Jiao, K., 2013. Freely switchable impedimetric detection of target gene sequence based on synergistic effect of ERGNO/PANI nanocomposites. **Biosens. Bioelectron.** 42, 415–418.
- Zan, H.W., Li, C.H., Yu, C.K., Meng, H.F., 2012. **Appl. Phys. Lett.** 101 (2), 23-30.
- Zhang, C.Q., Li, G.C., Peng, H.R., 2009 a. *Mater. Lett.* 63, 592–594.
- Zhang, X.Z., Jiao, K., Liu, S.F., Hu, Y.W., 2009 b. **Anal. Chem.** 81, 6006–6012.
- Zhu, W., Dong, J., Uchida, K., Watanabe, K.-I., Nakayama, H., Goto, Y., Haga, T., 2013. Bovine papillomavirus type 10 with a deletion associated with a lingual papilloma in a cow. **Vet. J.** 10–12.

CAPÍTULO IV

Artigo Científico III

Periódico: Analyst

Label-Free Immunosensor Using Gold Nanorod Bioconjugates for of Dengue Virus (NS1)

Paula Virgínia de Vasconcelos Souza^{*a}, Josivandro do Nascimento Silva^b, Ana Carolina Matos da Silva Dias^c, Igor Teixeira Cavalcanti^c, Mízia Maria Saboia da Silva^c, Luiz Bezerra de Carvalho-Júnior^a

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil Tel: 55 81 9844-7891; E-mail: paulavir@yahoo.com.br

^b Programa de Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental. Universidade estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Brasil

^c Laboratório de Engenharia Biomédica. Universidade Federal de Pernambuco– UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil;

Autor correspondente: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil. Tel/fax: +55 (81) 2126-8485. e-mail: Paulavir@yahoo.com.br (P.V.V.Souza).

Abstract

A label-free electrochemical immunosensor using gold nanorod (AuNR) bioconjugates was successfully developed for NS1 protein detection of the dengue virus. AuNRs were used to enhance the sensitivity of the immunosensor and they provided an excellent antibody immobilization matrix due to the increase in specific surface area. AuNRs were functionalized with cysteamine, which left free amino terminal groups that subsequently attached to anti-NS1 antibodies, forming the anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate. The characterization of the bioconjugate was performed by UV-vis, transmission electronic microscopy (TEM) and cyclic voltammetry (CV). The bioconjugate was attached to the screen-printed electrode surface via polypyrrole and polypyrrole-2-carboxylic acid (PPy-PPa) film. A calibration curve using CV was obtained at concentrations ranging from 0.04 to 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NS1, with a correlation coefficient of 0.996 and a detection limit of 0.0079 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This bioconjugate-based immunosensor has great potential and its reliability will enable it to be used in the development of sensing devices for clinical applications associated with dengue diagnostics.

1. Introduction

Dengue virus (DENV) is one of the most neglected tropical diseases and of highest international public health importance, despite there being 50 million cases worldwide every year (Linares et al., 2013). The development of rapid and specific diagnostic methods for

early detection of dengue virus is deemed highly desirable for disease control during epidemic situations and on-site monitoring of patients (Peeling et al., 2010). Currently, a highly conserved viral glycoprotein — non-structural protein 1 (NS1) — of the dengue virus has been used as a potential target analyte for early detection. NS1 is an essential protein for the viability of DENV and it is produced by the virus in both membrane-associated and secretory forms. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) directed against the NS1 antigen have shown high concentrations of it in the sera of DENV-infected patients during the early clinical phase of the disease (Datta and Wattal, 2010). Currently, the most used techniques for dengue serological diagnosis are based on the anti-DENV IgM and IgG detection, by using MAC-ELISA and IgG-ELISA (Dutra et al., 2009). These assays are widely available for utilization in dengue-endemic countries; however, one of their limitations is the variations in the detection rate during the acute phase of the disease, since IgM antibodies only appear in the blood at least five days after infection and thereafter persist for 2 to 3 months (Alcon et al., 2002; Lima et al., 2010). Commercial immunoassay kits for serological diagnosis of dengue infections usually require long assay times (in the order of a few hours) and time-consuming sample processing (including extensive washing and incubation steps), which hampers the use of these immunoassays as rapid diagnostic tests (Teles et al., 2011).

In recent years, the integration of nanomaterials has had a great impact on biosensing. Nanomaterials are widely used in physics, chemistry, biology, medicine, materials science, and interdisciplinary fields, due to their electronic, optical, magnetic, thermal, and catalytic properties (Song et al., 2010; Schmid, 2011). The use of nanomaterials in sensing devices has led to the production of rapid and sensitive multianalytical assays which are useful in laboratory and field analysis (Singh et al., 2009). Among the various types of nanomaterials, such as semiconductors, metal oxides, silica nanoparticles, and quantum dots, gold nanorods (AuNRs) stand out due to their properties, which include the ability to decrease protein-metal particle distance, strong surface plasmon absorption, good biocompatibility, easy functionalization with proteins, and lower cytotoxicity (Chen and Chatterjee, 2013; Zhang et al., 2013). AuNRs can be prepared using different methods such as photochemical reduction of gold salts, electrochemical synthesis, template method, lithographic fabrication, and the seed-mediated wet chemical synthesis used in this work (Huang et al., 2009; Ge et al., 2014).

The surface of AuNRs can be easily modified with ligands containing functional groups such as thiols and amines, which have a strong affinity to gold surfaces. Currently, the conjugation of biomolecules to AuNRs can be achieved through four different methodologies:

direct ligand exchange, use of a bifunctional linker, surface coating, and electrostatic adsorption (Huang et al., 2009). By using specific functional groups to anchor the ligands, biomolecules such as oligonucleotides, proteins, and antibodies can be used to provide even greater functionality to AuNRs (Giljohann et al., 2010). Through the functionalization of AuNRs, it is possible to obtain a high density of biomolecules on the sensor surface with good bioactivity, specificity, and accessibility for the target molecule (Hu et al., 2008). Thus, AuNRs can be employed in the development of sensing devices in order to assist with the diagnosis of several diseases, including dengue fever.

In the present work, an innovative label-free electrochemical immunosensor, utilizing gold nanorod bioconjugates, is demonstrated for NS1 protein detection of dengue virus.

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Electrodag PF-407 C carbon ink was acquired from Acheson Henkel Corporation (USA). Dengue virus NS1 glycoprotein (>90% purity) and mouse monoclonal antibodies to dengue virus NS1 glycoprotein (anti-NS1) were purchased from Abcam (UK). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), pyrrole (Py, 97% purity), pyrrole-2-carboxylic acid (Pa), cysteamine hydrochloride (Cys), N-hydroxysuccinimide (NHS), and N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). All the reagents were analytical grade and used without further purification.

Ultrapure water (18.2 MΩ cm) was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore Inc., USA).

2.2. Apparatus and measurements

AuNR colloids were characterized by UV–Vis Spectroscopy (Ocean Optics USB4000-UV-VIS spectrophotometer). The morphology of AuNR was analyzed by Transmission Electronic Microscopy (TEM, FEI Morgagni 268D operating at 100 kV). The samples were diluted in an aqueous medium and dropped into a carbon grid. The TEM images were analyzed with Image-Pro Plus 6 software in order to measure particle size and distribution.

All the electrochemical experiments were performed in an Ivium Compact Stat potentiostat/galvanostat from Ivium Technologies (Netherlands) which was interfaced with a microcomputer and controlled by Ivium Soft software. A three-electrode system consisting of a homemade carbon screen-printed electrode (SPE) as the working electrode was used,

together with an Ag/AgCl electrode as the reference electrode and a helical platinum wire as the counter electrode.

The modification on the SPE surface was characterized by cyclic voltammetry (CV) in 5 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ prepared in 0.1 mol L⁻¹ KCl solution, at a scanning rate of 0.05 V s⁻¹ and voltage ranging from -0.6 to 1.0 V.

2.3 Preparation of the SPE

The SPEs were obtained from a mixture containing carbon ink and 10% graphite. They were manufactured by squeezing the mixture over the adhesive plastic mould fixed to the rectangular support of the polyethylene terephthalate. The electrodes were then cured at 60°C for 20 min and finally the adhesive plastic mould was removed. The circular area of the working electrode (approximately 4 mm diameter) was delimited using an adhesive tape from 3M Co. (USA) for galvanoplasty.

Before modifying the SPE, mechanical cleaning was done by sanding the working electrode surface with thin grain sandpaper. The SPE surface was then pre-treated by registering 30 cyclic voltammograms at a scanning rate of 0.1 V s⁻¹ and voltage ranging from -2.0 to 2.0 V in 0.1 mol L⁻¹ of KCl solution as the supporting electrolyte (Alonso-Lomillo et al., 2009).

2.4 Synthesis of gold nanorods

Gold nanorods were synthesized by the seed-mediated growth technique, with slight modifications (Nikoobakht and El-Sayed, 2003). The preparation was performed in two steps: seed colloid and gold nanorod growth. The seed colloid was prepared by mixing 5 mL of CTAB solution (0.2 mol L⁻¹) and 5 mL of HAuCl₄ 3H₂O (0.5 mmol L⁻¹). Under vigorous stirring, 600 µL of NaBH₄ (0.01 mol L⁻¹) was added to the previous solution and kept for 5 min. The solution turned brownish yellow after the addition of NaBH₄ solution. To prepare rod-shaped gold nanoparticles, 5 mL of CTAB (0.2 mol L⁻¹) and 200 µL of AgNO₃ (4 mmol L⁻¹) were mixed. Then, 5 mL of HAuCl₄ 3H₂O solution (1 mmol L⁻¹) and 100 µL of ascorbic acid (0.0788 mol L⁻¹) were added to the resulting solution. After the addition of the reducing agent, the solution turned transparent, because the Au³⁺ ions were reduced to Au⁺. The growth of gold nanorods started after the addition of 20 µL of colloid.

2.5 Preparation of the Anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate

Synthesized AuNRs were functionalized with NH₂ groups for anti-NS1 covalent immobilization. The AuNRs were mixed with cysteamine aqueous solution (30 mmol L⁻¹) for

3 h under constant sonication. Cysteamine-functionalized gold nanorods (Cys-AuNR) were then separated and purified by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min. The Cys-AuNRs were re-suspended in 1 mL of H₂O. After this, anti-NS1 and Cys-AuNR solutions were mixed at a 1:3 (v/v) ratio. –COOH groups present in anti-NS1 were activated beforehand with 150 mmol L⁻¹ EDC and 300 mmol L⁻¹ NHS. The carboxyl groups were activated to bind to the –NH₂ groups of cysteamine, which led to the formation of an amide bond (Sharma et al., 2010). Anti-NS1-bound Cys-AuNRs were collected by centrifugation, followed by re-dispersion in H₂O.

2.6 Fabrication of the electrochemical immunosensor

Before the immobilization of anti-NS1 antibodies, a polymeric film of Py-Pa was electrochemically deposited by applying a constant voltage of 0.8 V for 300 s in KCl solution (0.1 mol L⁻¹) containing Py and Pa monomers. The precursor solution for polymerization, which contained 150 mmol L⁻¹ of Py and 50 mmol L⁻¹ of Pa in 0.1 mol L⁻¹ of KCl solution at various ratios, was used for optimization experiments. After deposition, the electrode was immersed in a solution, containing 150 mmol L⁻¹ of EDC and 300 mmol L⁻¹ of NHS, for 1 h at room temperature. Then, 10 µL of anti-NS1-Cys-AuNR was dripped onto the electrode surface and incubated for 1 h. The remaining reactive sites were blocked with 50 mmol L⁻¹ of glycine.

3. Results and Discussion

3.1 Characterization of the gold nanorods and bioconjugate

Aqueous colloids of AuNR were synthesized through the reduction of chloroauric acid by means of ascorbic acid in the presence of the CTAB surfactant. During the growth, CTAB forms micelles and a positively-charged bilayer around the AuNR (Young et al., 2011). Figure 1-A displays TEM images of the resulting AuNRs which have uniform morphology and an average width and length of 22.02 ± 3.44 nm and 54.51 ± 7.7 nm, respectively.

The UV-vis spectrum of AuNR presents two distinct bands of absorption: a weak band in the 520 nm region corresponding to the transverse resonance band, and a strong one at 720 nm corresponding to the longitudinal resonance band (Figure 1-B). These two peaks indicate the formation of elongated AuNRs and they are isolated from each other (Nikoobakht; El-Sayed, 2003). The transverse plasmon is the result of excitation across the nanorod diameter and is similar to plasmon resonances in spherical gold colloid. The longitudinal plasmon is due to

excitation along the nanorod length (Liao;Hafner, 2005). The position of the longitudinal band undergoes a red shift and the aspect ratio (AR) of the gold nanorods increases. In this work, synthesized AuNRs had an AR of 2.5 ± 0.5 .

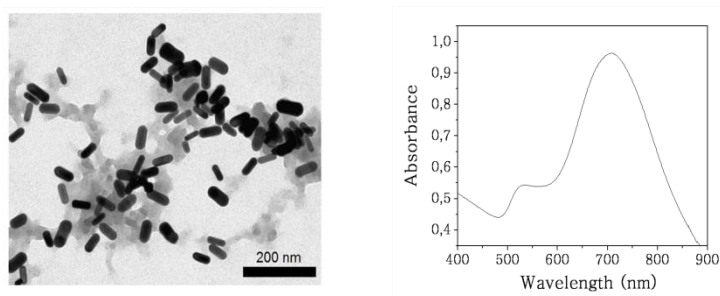


Figure 1. (A) TEM images of synthesized AuNRs; (B) UV-vis absorption spectrum of synthesized AuNRs.

After the addition of cysteamine and anti-NS1, changes in the peak intensities were observed (Figure 2 inset, spectra B and C). This behaviour was followed by broadening of the absorption bands, which indicates the attachment of cysteamine and anti-NS1 to the AuNR surface (Sharma et al., 2010). The AuNRs were functionalized with cysteamine-repelling amino terminal groups for covalent immobilization of anti-NS1 antibodies. The activated anti-NS1 carboxyl group then bound to the $-NH_2$ group of Cys-AuNR, which resulted in the formation of amide bonds. The experimental procedure for the preparation of anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate is shown schematically in Figure 2.

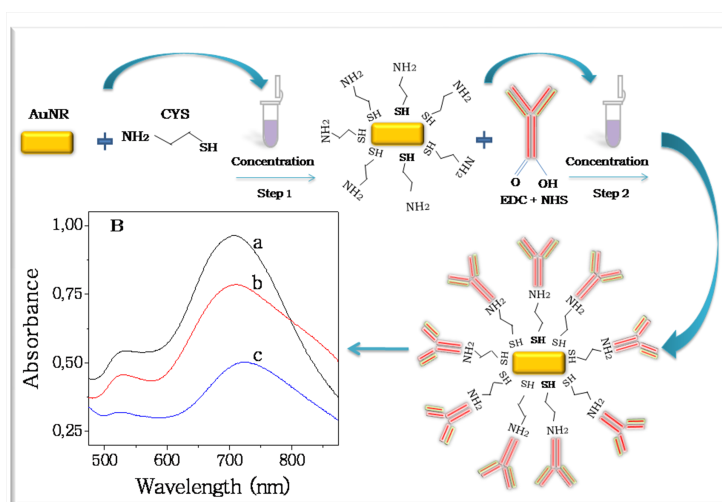


Figure 2. Scheme for the preparation of anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate. Inset: UV-vis absorption spectra of (a) synthesized AuNRs, (b) Cys-modified AuNRs, and (c) anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate.

3.2 Characterization of the PPy-PPa film

In this present work, PPy and PPa were copolymerized on the SPE surface, using a mixed Pa and Py solution, since the electrochemical growth of PPa is difficult because of its low conductivity. Based on the nature of PPy and PPa, it is crucial to optimize the ratio of Py to Pa, since PPy is conductive but hydrophobic, while PPa is less conductive but very hydrophilic (Chen, Lu & Li, 2008). For this reason, different ratios were tested to prepare PPy-PPa film on the SPE surface (50/50, 60/40, 70/30, and 80/20).

Cyclic voltammograms of SPE surfaces modified with various films are shown in Figure 3-A. It was seen that the current for the cathodic and anodic peaks decreased with the increase in the ratio until reaching its maximum value at 70% of Py, demonstrating that the PPa film was electropolymerized on the electrode surface. This indicates that when the Py ratio is about 60% to 70%, the film has enough COOH groups for efficient immobilization of the bioconjugate and excellent electroactivity. However, when there is 80% of Py, the film did not have enough COOH functional groups. PPy-PPa film takes the advantages of the high conductivity and good biocompatibility of PPy and the enhanced hydrophilicity and covalent-binding ability of PPa (Truong et al., 2011).

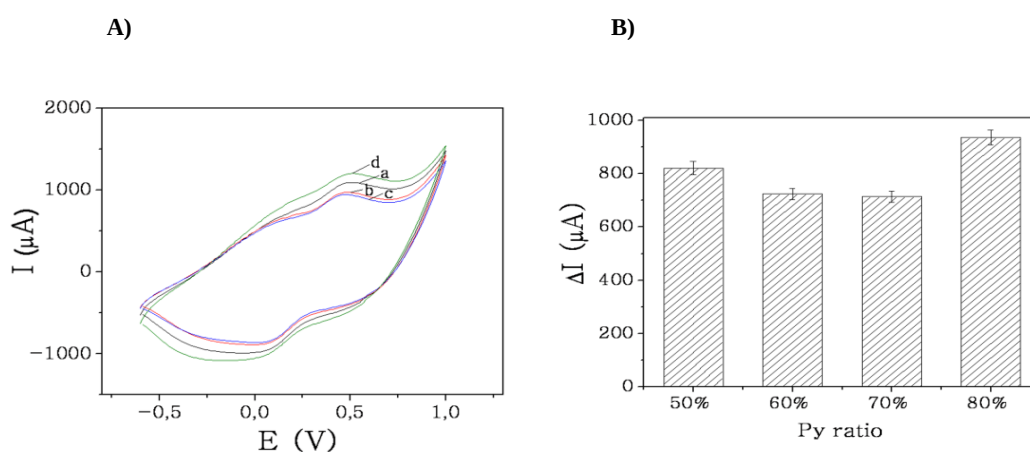


Figure 3. (A) Cyclic voltammograms of PPy-PPa films electrochemically deposited on the SPE surface at different Py:Pa ratios: (a) 50/50; (b) 60/40; (c) 70/30; and (d) 80/20 (%). (B) Effect of the Py ratio on the sensor response.

3.3 Electrochemical study of the immunosensor assembly

Cyclic voltammetry is an effective method to electrochemically characterize the modified electrode surface. This technique clearly shows that the charge transfer dynamics at the electrochemical interface are strongly influenced by the nature of the electrode surface and also by the structure of the electrical double layer (Kulkarni et al., 2006). Each assembly step of the modified electrode — shown schematically in Figure 4 — was electrochemically characterized using $5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ as the redox probe couple.

As shown in the inset of Figure 4, a couple of well-defined and reversible redox peaks were observed on the bare SPE (curve A). A widening of redox peaks and an increase in the amperometric response were noted after modification of the electrode with the PPy-PPa film (curve B), which was attributed to the increase in effective surface area caused by the film formation. The modification of the SPE surface with PPy-PPa film resulted in an increase of approximately 190% in the amplitude of the current. A consecutive decrease in the amperometric response is observed after the coating with the anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate and glycine (curves C and D), resulting in a further increase in the electrode-transfer resistance. This decrease in the area of the redox peaks was expected, due to the insulating nature of the antibodies.

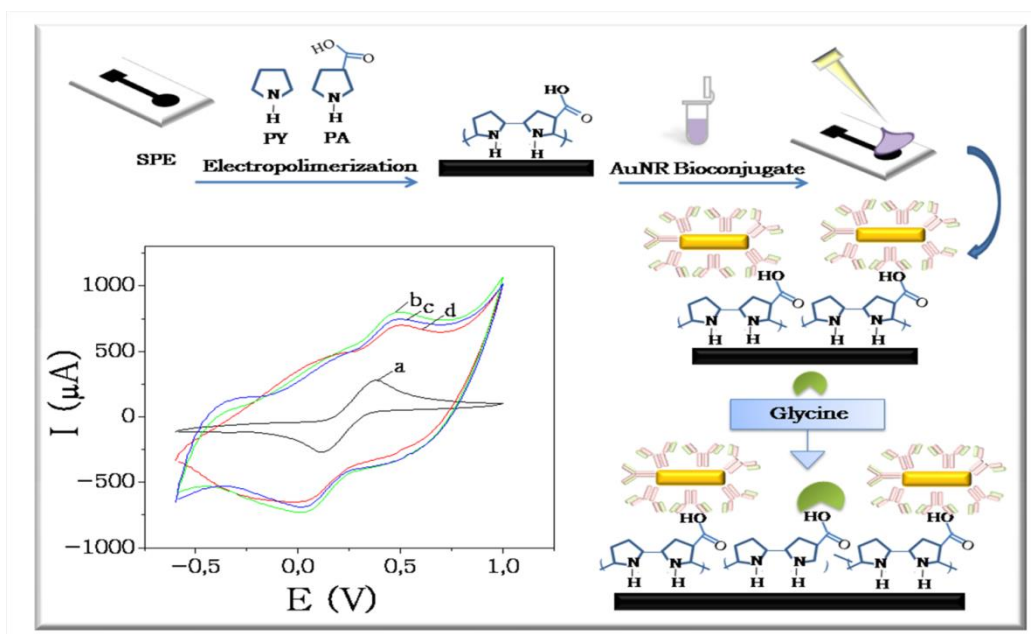


Figure 4. Schematic illustration of the stepwise preparation of the immunosensor. Inset: Cyclic voltammograms of the immunosensor for each immobilization step: (a) bare SPE; (b) PPy-PPa/SPE; (c) anti-NS1-Cis-AuNR/PPy-PPa/SPE; and (d) Glycine/anti-NS1-Cis-AuNR/PPy-PPa/SPE. Scans performed in 5 mmol L⁻¹ of K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆, at a scanning rate of 0.05 V s⁻¹.

3.4 Comparison of immunosensor electrochemical response with and without AuNR

In order to clarify the advantage of anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate use, the PPy-PPa modified electrodes were covered with anti-NS1 antibodies (Figure 5-A) and with anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugate (Figure 5-B). The immunosensor using bioconjugate exhibited a current variation 8 times greater than the immunosensor without AuNR (Figure 5-C). AuNR further enlarged the specific surface area, thus enabling a greater immobilization of anti-NS1 antibodies and, consequently, NS1 antigens. Therefore, the bioconjugate provided a stable and covalent immobilization of anti-NS1 antibodies and enhanced the sensitivity of the immunoassay (Zhu et al., 2013).

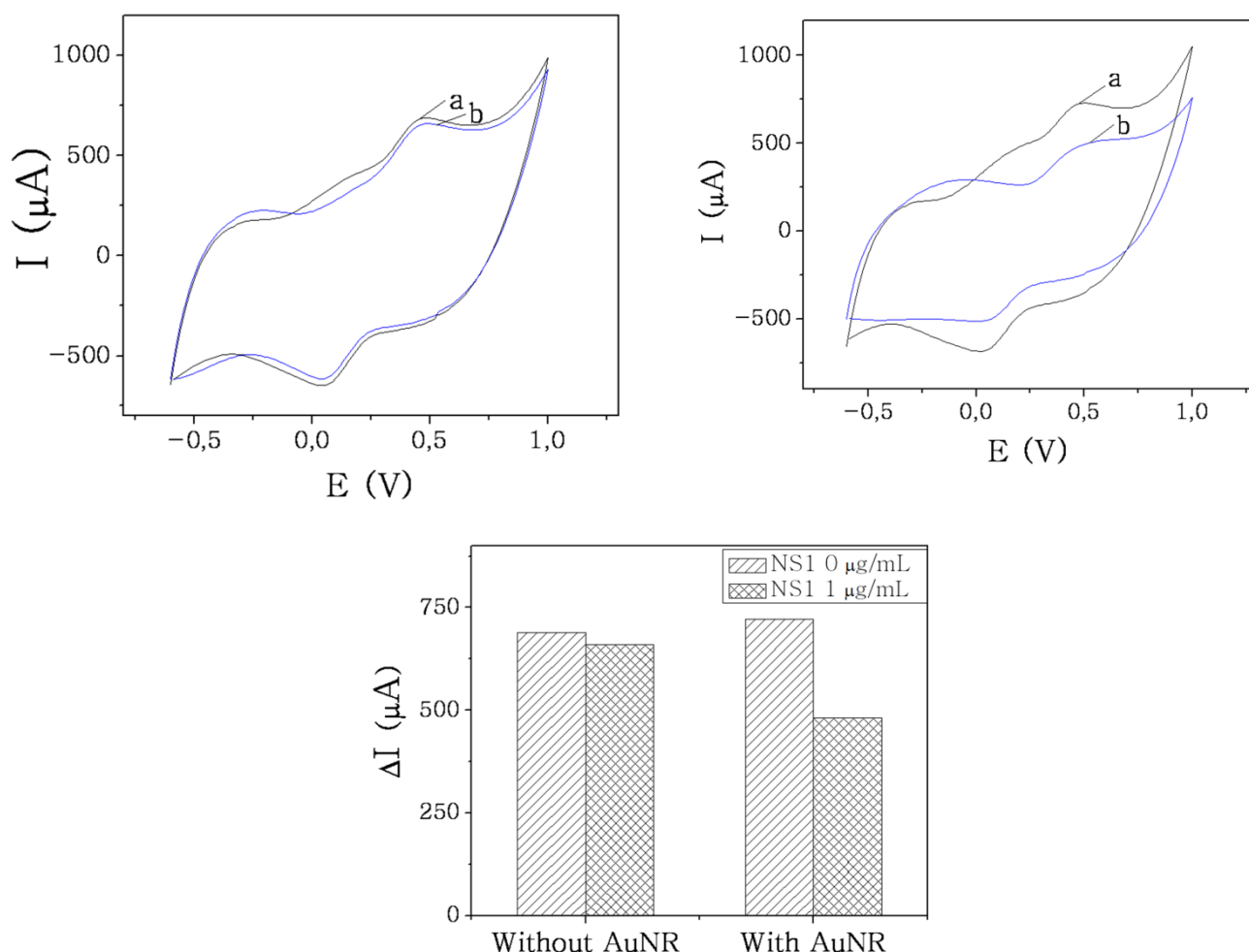


Figure 5. Comparison of responses for NS1 without and with AuNR

3.5 Detection of NS1 antigen

The calibration curve was plotted for different NS1 concentrations by CV. The results show that the anodic peak current decreased with the increase in NS1 concentration in the incubation solution (Fig 6). The resulting calibration curve was obtained for a concentration ranging from $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ NS1, with a correlation coefficient of 0.996 and a detection limit defined as three times the blank standard deviation signal of $0.0079 \mu\text{g mL}^{-1}$, which was much lower compared to the other methods used to detect the NS1 antigen (Su et al., 2003; Wu et al., 2005; Dias et al., 2013). Alcon et al. (2002) reported that the NS1 antigen was found circulating from the first day after onset of the illness up to the 9th day. In primary infections, NS1 levels range from 0.04 to $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ in serum samples for patients in the acute phase of the disease (up to 7 days). These levels match the levels detected by the gold nanorod SPE developed in this work. Thus, this immunosensor has real potential for dengue diagnosis, with the advantage of being easily transferred to point-of-care testing.

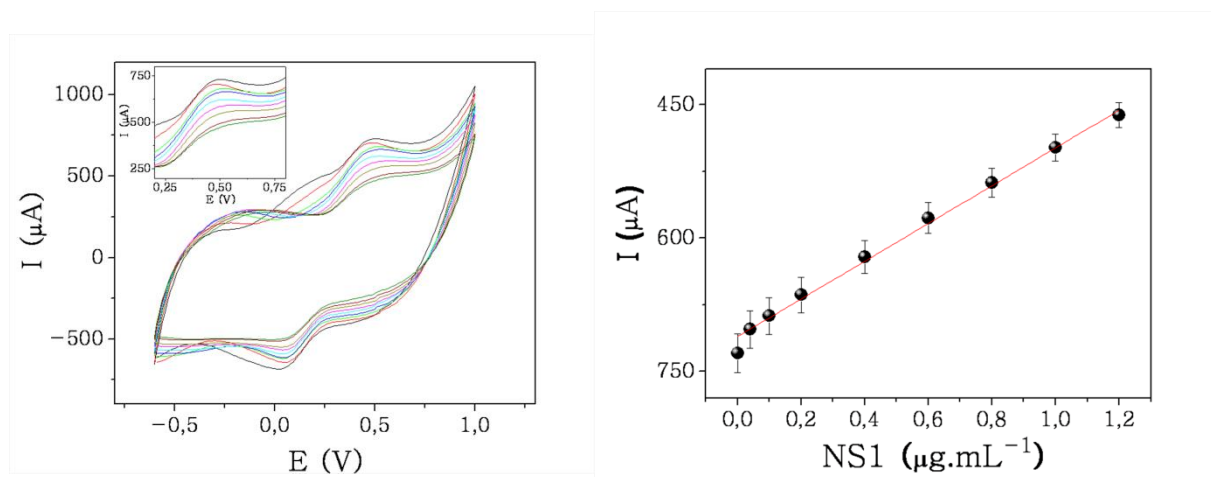


Figure 6. (A) Cyclic voltammograms of immunosensor in different NS1 concentration; (B) Calibration curve.

4. Conclusions

In this work, a promising electrochemical immunosensor approach based on Anti-NS1-Cys-AuNR bioconjugates was demonstrated for NS1 detection. Using the CV technique, the immunoelectrode was found to detect NS1 at concentrations ranging from 0.04 to 1.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a detection limit of 0.0079 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The electrochemical method for the investigation of nanomaterials illustrates the extraordinary sensitivity achievable by this technique. The success of the present report in relation to NS1 detection indicates the potential of GNRs as a biosensing platform for simple, specific and relevant diagnoses of dengue infection.

Acknowledgements

The authors thank the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and the Pernambuco Science and Technology Support Foundation (FACEPE) for the financial support.

References

- S. Alcon, A. Talarmin, M. Debruyne, A. Falconar, V. Deubel and M. Flamand, *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40, 376-381.
- M. A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, P. Matos and M. J. Arcos-Martínez, *Bioelectrochemistry*, 2009, 74, 306-309.
- A. M. Alkilany, L. B. Thompson, S. P. Boulos, P. N. Sisco and C. J. Murphy, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, 64, 190-199.
- W. Chen, Z. Lu, and C. M. Li, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 8485-8492.
- S. Datta and C. Wattal, *Indian J Med Microbiol.*, 2010, 28, 107-110.
- N. R. Dutra, M. B. Paula, M. D. Oliveira, L. L. Oliveira and S. O. De Paula, *J Glob Infect Dis.*, 2009, 1, 38-44.
- C. M. S. Dias, S. L. R. Gomes-Filho, M. M. S. Silva and R. F. Dutra, *Biosens Bioelectron.*, 2013, 44, 216-221.
- M. Foschini, A. Marletta, R. C. Faria, D. Leonard, F. Bessueille, N. Jaffrezic-Renault and D. Gonçalves, *Electroanalysis*, 2013, 25, 1-9.
- W. Hu, C. M. Li and H. Dong, *Anal. Chim. Acta.*, 2008, 630, 67-74.
- H. Li, S. Liu, Z. Dai, J. Bao and X. Yang, *Sensors*, 2009, 9, 8547-8561.

- D. X. Li, Y. J. Jang, J. Lee, J. Lee, S. T. Kochuveedu and D. H. Kim, *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 16453.
- H. Liao and J. H. Hafner, *Chem Mater.*, 2005, 17, 4636-4641.
- M. R. Q. Lima, R. M. R. Nogueira, H. G. Schatzmayr and F. B. Santos, *PLoS Negl Trop Dis.*, 2010, 4, 1-8.
- E. M. Linares, L. T. Kubota, J. Michaelis and S. Thalhammer, *J. Immunol. Methods.*, 2012, 375, 264-270.
- E. M. Linares, C. S. Pannuti, L. T. Kubota and S. Thalhammer, *Biosens Bioelectron.*, 2013, 41 180-185.
- S. A. Kulkarni, I. S. Mulla and K. Vijayamohanan, *J Phys Conf Ser.*, 2006, 34, 322-329.
- B. Nikoobakht, and M.A. El-Sayed. *Chem. Mater.*, 2003. 15, 1957-1962.
- J. M. Pingarrón, P. Yáñez-Sedeño and A. González-Cortés, *Electrochim. Acta.*, 2008, 53, 5848-5866.
- A. Sharma, Z. Matharu, G. Sumana, P. R. Solanki, C.G. Kim and B. D. Malhotra, *Thin Solid Films*, 2010, 519, 1213-1218.
- A. K. Singh, D. Senapati, S. Wang, J. Griffin, A. Neely, P. Candice, K. M. Naylor, B. Varisli, J. R. Kalluri, and P. C. Ray, *ACS Nano*, 2009, 3, 1906-1912.
- J. Spadavecchia, S. Casale, S. Boujday and C. Pradier, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2012, 100, 1-8.
- C.C. Su, T. Z. Wu, L. K. Chen, H. H. Yang and D. F. Tai, *Anal. Chim. Acta.*, 2003, 479, 117-123.
- F. S. R. R. Teles, *Anal. Chim. Acta.*, 2011, 687, 28-42.
- L. T. N. Truong, M. Chikae, Y. Ukita and Y. Takamura, *Talanta*, 2011, 85, 2576-2580.
- H. Xing, W. Bu, S. Zhang, X. Zheng, M. Li, F. Chen, Q. He, L. Zhou, W. Peng, Y. Hua and J. Shi, *Biomaterials*, 2012, 33, 1079-1089.
- X. Xu, X. Liu, Yanbin Li and Y. Ying, *Biosens Bioelectron.*, 2013, 47, 361-367.
- S. Song, Y. Qin, Y. He, Q. Huang, C. Fan and H. Y. Chen, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, 39, 4234-4243.
- S. Zanga, Y. Liub, M. Linb, J. Kangc, Y. Suna and H. Lei, *Electrochim. Acta*, 2013, 90 246-253.
- Y. Zhu, Y. Cao, X. Sun, and X. Wang, *Sensors*, 2013, 13, 5286-5301.
- T. Z. Wu, C. C. Su, L. K. Chen, H. H. Yang, D-F. Tai and K. C. Peng, *Biosens Bioelectron.*, 2005, 21, 689-695.
- R. W. Peeling, H. Artsob, J. L. Pelegrino, P. Buchy, M. J. Cardoso, S. Devi, D. A. Enria, J. Farrar, D. J. Gubler, M. G. Guzman, S. B. Halstead, E. Hunsperger, S. Kliks, H. Margolis, C. M. Nathanson, V. C. Nguyen, N. Rizzo, S. Vázquez and S. Yoksan, *Nature*, 2010, 30-38.