

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

**CONSTRUÇÃO DE GENOSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA DIAGNÓSTICO
DA HEPATITE C BASEADO EM MONOCAMADAS AUTO MONTADAS E
DETECÇÃO NÃO MARCADA**

Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques

Araraquara
2009

PAULO ROBERTO BRASIL DE OLIVEIRA MARQUES

**Construção de Genossensor Amperométrico para Diagnóstico da Hepatite C
Baseado em Monocamadas Auto Montadas e Detecção Não Marcada**

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Química Analítica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka

Araraquara
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

M357c	Marques, Paulo Roberto Brasil de Oliveira Construção de genossensor amperométrico para diagnóstico da hepatite C baseado em monocamadas auto montadas e detecção não marcada / Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques.- Araraquara : [s.n], 2009 172 f. : il.
Química	Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Orientador: Hideko Yamanaka
	1. Biotecnologia. 2. Genossensores. 3. Hepatite C. I. Título

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

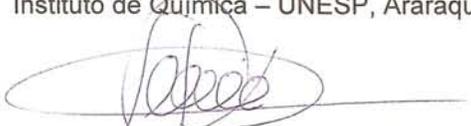
PAULO ROBERTO BRASIL DE OLIVEIRA MARQUES

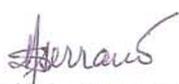
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 27 de abril de 2009.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Hideko Yamanaka (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara


Prof. Dr. Fernando Luis Fertoni
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto


Profª Drª Silvia Helena Pires Serrano
Instituto de Química – USP, São Paulo


Drª Neiva Sellan Lopes Gonçalves
Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Campinas


Prof. Dr. Eduardo Mathias Richter
Instituto de Química – UFU, Uberlândia

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus Pai que me guarda e me guia.

Ao meu filho Danilo, meu máximo alcançado na vida: quanto mais longe eu queira enxergar, mais longe ele conseguirá alcançar.

À minha esposa Clara, minha luz, minha companheira, minha metade. Agradeço todos os dias, você do meu lado.

Aos meus pais, instrumentos de minha criação, fontes de minha inspiração.

A Wellington de Abreu Gonzaga, em memória de um grande amigo: "... Mesmo que o tempo e a canção digam não... Qualquer dia amigo, a gente vai se encontrar".

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus pais queridos e todos os familiares, que sempre me incentivaram na busca de meus objetivos, sendo quais fossem os mesmos.

A minha esposa Clara e meu filho Danilo, agradeço de coração o apoio, o incentivo e a colaboração em todos os momentos partilhados no curso da realização desta tese, momentos estes muitas vezes de abdicção, em prol de uma realização conjunta. Obrigado, sem vocês nada teria tanto sentido. Amo vocês!

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka, pela orientação segura e precisa, pelos momentos de ensinamentos e aprimoramentos de minha formação acadêmica, pela liberdade de trabalho e por sua atuante sensatez profissional. Agradeço também pelos momentos de amizade que se iniciaram e se fortaleceram neste período de quatro anos, momentos estes que estarão sempre em minha memória.

Aos Professores que compõe o grupo de eletroanalítica do IQ-UNESP de Araraquara: Prof. Dr. Nelson Stradiotto, com quem pude aprimorar o exercício de uma crítica profissional construtiva, Prof^a Dr^a Maria Valnice, tanto pelas discussões para o aprimoramento, quanto pelas músicas que tocamos juntos nas rodas de violão (atividades extra laboratoriais fundamentais para a união do grupo) e mais recentemente à Prof^a Dr^a Maria Pilar, de quem estimo admiração.

À Prof^a Dr^a Maria Isabel Pividori e ao Prof Dr Salvador Alegret, pela orientação nos trabalhos realizados durante o estágio de doutorado sanduíche no grupo de sensores e biossensores da Universidade Autônoma de Barcelona-UAB.

Aos colegas de laboratório, de hoje e de ontem. Com quem partilhei, nestes quatro anos, diversos momentos de convívio profissional e pessoal, sendo: Fabiana, Leonardo, Leandro, Magno, Márcio Bergamini, Adelir, André e Regina, Daniela, Diana, Marly, Michele, Patrícia, Paim, Paula, Luciano, Thaís, Juliano e Marcelo. Em especial aos colegas do grupo de biossensores: Antônio, Carolina, Marcos, Glauco, Carla e Marcela. Pelas discussões e pelo convívio salutar. Aos demais membros do grupo, meu muito obrigado.

Às meninas do laboratório de biossensores da UAB: Anabel, Susana, Sílvia, Tâmara e Sandra, pela colaboração e amizade em um ambiente de trabalho agradável, pelas músicas e pelo boliche. !Hasta luego chicas!

Ao Prof Dr Antônio Eduardo Mauro e ao aluno Alexandre Legendre, do departamento de inorgânica do IQ UNESP, pelos complexos de cobre gentilmente cedidos.

À Cristine e Tomate, pela amizade adquirida, cultivada e fortalecida, pelos momentos de descontração e convivência. Obrigado!

Ao pessoal do handebol, com quem convivi paralelamente nestes quatro anos, em especial: Cubano, Leo (La selva), Ribeirão, Fi, Coraza, Varão e Yuri.

Ao CNPq, pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche concedidas, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho.

"Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância".

(Hipócrates)

"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos".

(Isaac Newton)

Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques

Curriculum Vitae resumido.

Dados Pessoais

Filiação Walter Brasil Conceição Marques e Rosarine Rabelo de Oliveira Marques
Nascimento 18/04/1974 - São Luís/MA - Brasil

Formação Acadêmica.

- 2009** Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Título: Construção de genossensor amperométrico para diagnóstico da Hepatite C baseado em monocamadas auto montadas e detecção não marcada.
Orientador: Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka.
Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 2008** Doutorado Sanduíche na Faculdade de Ciências e Biociências.
Universidade Autônoma de Barcelona, UAB, Espanha.
Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Isabel Pividori.
Título: Detecção eletroquímica baseada em partículas magnéticas para detecção de vírus da Hepatite C.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 2001** Mestrado em Química.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
Título: Metodologias analíticas envolvendo cromatografia gasosa e biossensores enzimáticos para controle de resíduos de pesticidas em amostras ambientais.
Orientador: Prof^a Dr^a Gilvanda Silva Nunes.
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 1999** Graduação em Química Industrial.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
Título: Avaliação de fósforo, nitrogênio, oxigênio e feopigmentos em amostras de sedimentos do lago de Viana: Brasil.
Orientador: Prof Dr Paulo Saraiva Cavalcante.

Formação Complementar Relevante

- 2006** 1^o Escola de Eletroquímica.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil.
- 2006** Sistemas de Imobilização e Caracterização de Biomoléculas.
Universidad de La Republica, UDELAR, Montevideú, Uruguai.
- 2005** Extensão Universitária em Representante Discente na Congregação.
Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, Brasil.
- 2004** Controle da Qualidade em Estudos Ambientais.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
- 2004** Microeletrodos.
Associação Brasileira de Química, ABQ, Fortaleza, Brasil.
- 2003** Pesticidas o Homem e o Meio Ambiente.
Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, Brasil.

- 2001 Eletrodos Modificados Aplicações em Sensores.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
- 2000 Novos Suportes para Imobilização de Proteínas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil.
- 2000 Desenvolvendo Software Para a Química.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
- 1999 Tópicos Sobre Coleta e Tratamento de Amostras Ambientais
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
- 1997 Avaliação Integrada do Ciclo de Vida dos Produtos.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
- 1997 Elaboração de Projetos de Pesquisa.
Centro de Estudos Honestino Guimarães, CEHOG, Brasil.
- 1996 Noções Básicas de Controle Alimentar.
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, São Luis, Brasil.
- 1995 Química em Micro Escala.
Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, SBPC, São Luís, Brasil.

Atuação Profissional

1. Centro de Ensino Médio e Profissionalizante – CEMP/MA

2004 - 2005 Professor contratado.
Disciplinas: Química Geral; Tecnologia Ambiental.

2. Universidade Federal do Maranhão - UFMA

2002 - 2004 Professor substituto.
Disciplinas: Química Analítica Quantitativa

Prêmios e Títulos

- 2005 Menção Honrosa no Encontro Nacional de Estudantes de Química. ENEQUI-UFMA/MA
- 2003 2º lugar-Maratona de Trabalhos Científicos, Executiva Nacional de Estudantes de Química-ENEQUI-UFV/MG

Produção Bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. MARQUES, P. R. B. O.; LERMO, A.; CAMPOY, S.; YAMANAKA, H.; BARDÉ, J.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. Double-Tagging Polymerase Chain Reaction with a Thiolated Primer and Electrochemical Genosensing based on Gold Nanocomposite Sensor for Food Safety. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 1332-1339, 2009.
2. MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v.31, p.1791-1799, 2008.

3. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O.; BANDEIRA, M. G.; BAYMA, A. B.; MOUCHREK FILHO, V. E.; GALVÃO, J. M. N. Avaliação bacteriológica de queijo tipo coalho das raças bovino e bubalina comercializados em São Luís do Estado do Maranhão. **Higiene Alimentar**, v. 21, p.91-96, 2006.
4. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O.; NUNES, G. S. Biossensor amperométrico para detecção screening de inseticidas carbamatos em águas de abastecimento. **Pesticidas Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.16, p.81-92, 2006.
5. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. FOURNIER, D.; MARTY, J-L. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster* Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v.20, p.824 - 831, 2004.
6. MARQUES, P. R. B. O.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; BRITO, N. M., NUNES, G. S. SANTOS, T. C. R. Avaliação preliminar dos riscos de contaminação ambiental por pesticidas aplicados na área da represa da boa esperança. **Cadernos de Pesquisa**, v. 14, p.9 - 23, 2003.
7. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S., QUEIROZ, M. E. R.; FRANCA, F. O.; SOUSA, H. S.; SANTOS, T. C. R. Análise de pesticidas em amostras ambientais oriundas da barragem da Boa Esperança (PI/MA Brasil): Avaliação preliminar. **Pesticidas Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.12, p.13 -30, 2002.
8. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S., FOURNIER, D.; MARTY, J-L. Acetylcholine enzyme sensor for determining methamidophos insecticide Evaluation of some genetically modified acetylcholinesterases from *Drosophila melanogaster*. **Analytica Chimica Acta**, v.434, p.1-8, 2001.
9. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; LIMA, F. J. C.; TANAKA, S. M. C. Inseticida metamidofos: aspectos analíticos e toxicológicos. **Pesticidas Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11, p.17 -34, 2001.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H.. Estudo eletroanalítico de interação de DNA com complexo de cobre em CDtrodo de ouro In: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia. 2007.
2. MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H., ANGNES, L. Potencialidades bioanalíticas de eletrodos confeccionados a partir de CDs graváveis In: V congresso Iberoamericano de Sensores - Ibersensor, 2006, Montevideú. Memórias do V Ibersensor. , 2006.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MARQUES, P. R. B. O., LERMO, A.; CAMPOY, S.; YAMANAKA, H.; BARDÉ, J.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. Double-tagged PCR with a thiolated primer and electrochemical genosensing with a gold nanocomposite biosensor In: II Workshop Nanociencia y Nanotecnología Analítica, 2008, Tarragona. Anais del II Workshop Nanociencia y Nanotecnología Analítica. Tarragona. Espanha, 2008.
2. MARQUES, P. R. B. O., YAMANAKA, H., ALEGRET, S.; PIVIDORI. Gold nanocomposite biosensor. Electrochemical genosensing of hepatitis C virus In: XVI Jornades de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia, 2008, Barcelona. Anais XVI Jornades de Biologia Molecular de la Societat Catalana de Biologia. 2008.
3. PILON, G.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Potencialidades de complexos de cobre e compostos corantes em estudos de interação com DNA: avaliação eletroanalítica e espectrofotométrica In: XXXVIII Semana da química, 2008, Araraquara. Anais da Semana da química 2008. , 2008.

4. MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Avaliação Eletroanalítica da Interação Entre DNA Calf Thymus e Compostos Corantes In: Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2007, Franca. Livro de resumos do 16 Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. 2007.
5. MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Estudo de interação entre complexo de cobre e oligonucleotídeo de HCV imobilizado em CDtrodo de ouro. In: 30ª Reunião Anual da SBQ, 2007, Águas de Lindóia. 2007.
6. MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.; SANTOS, C. R. Construção de um genossensor amperométrico para detecção de RNA de vírus de HCV: Avaliação preliminar. In: 29 Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. 2006.
7. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O.; NUNES, G. S., SANTOS, T. C. R. Construção de um biossensor screen printing para detecção de pesticidas carbamatos II In: Encontro de Estudantes de Química, 2005, São Luís. Anais do XXIV ENEQUI. , 2005.
8. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O.; NUNES, G. S.; ALMEIDA, G. P. Contextualizando educação ambiental a partir de disciplinas de química na formação de técnicos em meio ambiente In: Evento de Educação em Química, 2005, Araraquara. Anais do Evento de Educação em Química., 2005.
9. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; AMARANTE JÚNIOR, O. P. SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M. Avaliação Preliminar dos Riscos de Contaminação Ambiental por Pesticidas Aplicados na Área da Barragem da Boa Esperança In: XXII ENEQUI Encontro Nacional de Estudantes de Química, 2003, Viçosa. Anais do XXII ENEQUI. 2003.
10. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O ; BANDEIRA, M. G. Construção de um perfil cognitivo de alunos de escola pública segundo Piaget e Brunner. Uma aplicação ao ensino da química. In: Encontro Nacional de Estudantes de Química, 2003, Viçosa. Anais do XXII Encontro Nacional de Estudantes de Química. , 2003.
11. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O ; BANDEIRA, M. G. Importância da qualidade da água consumida em escolas públicas: Avaliação do grau de informação dos alunos do ensino médio da escola Fernando Perdigão In: VI ENQUIMA - Encontro de Química do Maranhão, 2003, São Luís. Anais do VI ENQUIMA - Encontro de Química do Maranhão. 2003.
12. MARQUES, P. R. B. O.; MARQUES, C. V. V. C. O ; BANDEIRA, M. G. Análise microbiológica de queijo tipo coalho das raças bovina e bubalina comercializados na cidade de São Luís –MA In: Reunião anual da SBPC, 2001, Salvador. Resumos da SBPC. 2001.
13. MARQUES, P. R. B. O., QUEIROZ, M. E. R.; SOUSA, H. S. Análises de resíduos de pesticidas em amostras de água e sedimentos da barragem da Boa Esperança/PI – MA In: Reunião anual da SBPC, 2001, Salvador. Resumos SBPC. 2001.
14. MARQUES, P. R. B. O., CAVALCANTE, P. R. S. S., SANTOS, F. Avaliação dos teores de nutrientes, matéria orgânica volátil, umidade, granulometria e feopigmentos em sedimentos do Lago de Viana-MA In: Encontro Nacional de Estudantes de Química, Belém. Resumos ENEQ. 2001.
15. MARQUES, P. R. B. O.; FOURNIER, D.; NUNES, G. S. MARTY, J. L. Biossensores baseados em acetilcolinesterases nativas e mutantes para detecção de inseticida metamidofós In: 11º ENQA-2001, 2001, Campinas. Resumos 11º ENQA-2001. , 2001.
16. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; SOUSA, H. S.; QUEIROZ, M. E. R.; FRANCA, F. O. Impactos por pesticidas na barragem da Boa Esperança In: 11º ENQA, 2001, Campinas. Resumos do 11º ENQA. , 2001.
17. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Avaliação espectrofotométrica das constantes de inibição de enzimas colinesterases mutantes de Drosophila melanogaster frente ao inseticida metamidophos In: XL Congresso Brasileiro de Química, 2000, Recife-PE. Resumos CRQ. , 2000.

18. MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S. Determinação espectrofotométrica das constantes de inibição de enzimas colinesterases modificadas de *Drosophila melanogaster* frente ao inseticida metamidofos In: Encontro de Química do Maranhão, 2000, São Luís. Livro de Resumos. 2000.
19. MARQUES, P. R. B. O.; CAVALCANTE, P. R. S. Caracterização biogeoquímica dos sedimentos de fundo do lago de Viana- MA/Brasil In: IV ENQUIMA - Encontro de Química do Maranhão, 1999, São Luís. UFMA,

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. MARQUES, P. R. B. O.; LERMO, A.; PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S.; YAMANAKA, H. Avaliação eletroanalítica do uso de CDs na construção de eletrodos modificados com DNA: aplicação na detecção de vírus da hepatite C em amostras soropositivas amplificadas In: Congresso Iberoamericano de Sensores, 2008, São Paulo. Anais do Congresso Iberoamericano de Sensores. , 2008.
2. MARQUES, P. R. B. O., PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S.; YAMANAKA, H. Gold nanocomposite biosensor: construction, characterization and application in electrochemical genosensing of hepatitis C virus In: VII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais, 2008, Guarujá. Anais do VII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais. , 2008.
3. MARQUES, P. R. B. O., PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S.; YAMANAKA, H. Gold nanocomposite biosensor. Electrochemical genosensing of hepatitis C virus In: NanobioEurope2008, 2008, Barcelona. Anais NanobioEurope2008. 2008.
4. MARQUES, Clara Virgínia Vieira Carvalho O, MARQUES, P. R. B. O., MARTY, Jean Louis, NUNES, Gilvanda Silva, Miraela Badea. A highly sensitive AChE-based biosensor for the detection of carbamate insecticides in drinking water In: BRAMAT 2005 International Conference on Materials Science and Engineering, 2005, Brasov. BRAMAT 2005 - ABSTRACT BOOK., 2005

Produção Técnica

1. MARQUES, P. R. B. O. **Técnicas bioanalíticas rápidas para análise de pesticidas**, 2005. (Curso de curta duração ministrado).
2. MARQUES, P. R. B. O. **A linguagem escrita em química: preparo de relatórios, seminários, artigos e monografias**, 2003. (Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Trabalhos de conclusão de curso de graduação

VERBINNEN, R. T. **Produção artesanal de sabonetes à base de óleo de babaçu**. 2004. Curso (Química industrial) - Universidade Federal do Maranhão

Iniciação científica

SANTOS, G. P. **Investigação espectrofotométrica da interação de complexos metálicos com DNA**. 2007. Iniciação científica (Química) - Instituto de química da UNESP de Araraquara

Participação em Eventos Relevantes.

Congresso Iberoamericano de Sensores: 2006 e 2008.

Nanobio-Europe, 2008.

Jornada Catalã de Biologia Molecular, 2008.

Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2005, 2007.

Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, 2006 e 2007.

Congresso Anual da Associação Brasileira de Química, 1993, 1995, 1996, 2000 e 2004.

Encontro Nacional de Química Analítica, 2001 e 2003.

Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1995 e 2001.

Participação em Banca de Trabalhos de Conclusão de Curso (Graduação)

1. MARQUES, P. R. B. O.; BOTELHO, J.; CARVALHO, F. Participação em banca de Ianni Silva Ramos. **Degradação oxidativa de SO₂ e CO₂**, 2004. (Química Licenciatura) Universidade Federal do Maranhão.
2. MARQUES, P. R. B. O.; AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R. Participação em banca de Ícaro de Oliveira Lima. **O herbicida trifuralina: Comparação de métodos analíticos e aplicação em amostras ambientais de solo e água de regiões de cultivo de soja (Balsas - MA)**, 2004 (Química industrial) Universidade Federal do Maranhão.
3. MARQUES, P. R. B. O., MARQUES, H. V. C. F.; RAMOS, A. C. S. Participação em banca de Raphael Teixeira Verbinnen. **Produção artesanal de sabonete a base de óleo de babaçu**, 2004. (Química industrial) Universidade Federal do Maranhão.
4. MARQUES, P. R. B. O., CAVALCANTE, P. R. S.; BARBIERI, R. Participação em banca de Marcel Felipe Sousa Barroso. **Varição nictemeral e sazonal do ferro ferroso (Fe²⁺) e ortofosfato (PO₄³⁻) no reservatório de Boa Esperança (MA-PI)**, 2003. (Química industrial) Universidade Federal do Maranhão.
5. MARQUES, P. R. B. O.; SILVA, A. B.; AZOULBEL, F. Participação em banca de Jordean Pereira Fontes. **Estudo preliminar da autenticidade do óleo de mamona**, 2002. (Química Licenciatura) Universidade Federal do Maranhão.
6. MARQUES, P. R. B. O., BANDEIRA, M. G.; MENDES FILHO, N. E. Participação em banca de Clara Virgínia Vieira Carvalho Oliveira Marques. **Importância da qualidade da água consumida em escolas públicas - avaliação do grau de informação dos alunos do ensino médio da escola Fernando Perdigão**, 2002. (Química Licenciatura) Universidade Federal do Maranhão.
7. MARQUES, P. R. B. O., MARQUES, H. V. C. F.; BOTELHO, J. Participação em banca de Akemi Damasceno Wada. **Obtenção e testes eletroquímicos de co-depósitos CoNi, CoNiP, e NiP**, 2002. (Química industrial) Universidade Federal do Maranhão.
8. MARQUES, P. R. B. O., CAVALCANTE, P. R. S.; MENDES FILHO, N. E. Participação em banca de Luzimary de Jesus Ferreira Godinho. **Varição nictemeral de formas nitrogenadas e de alguns parâmetros físicos e químicos no reservatório de Boa Esperança (MA/PI)**, 2002. (Química Licenciatura) Universidade Federal do Maranhão.

Participação em Banca de Comissões Julgadoras

Comissão científica julgadora dos trabalhos científicos do VII ENQUIMA, 2003.
Universidade Federal do Maranhão

Comissão científica julgadora de trabalhos científicos do VI ENQUIMA, 2002.
Universidade Federal do Maranhão

RESUMO

O presente trabalho descreve estudos de construção de biossensores modificados com DNA para detecção de vírus da hepatite C. Utilizaram-se como superfície eletródica substratos de ouro oriundos de CDs graváveis, já descritos na literatura. O procedimento de construção deste tipo específico de eletrodo foi modificado e esta modificação foi avaliada por meio de técnicas eletroquímicas, de microscopias de varredura eletrônica e de fluorescência. Duas propostas de imobilização foram avaliadas, sendo: a construção de monocamadas auto organizadas com moléculas de ácido mercaptopropiônico, com posterior ligação de material biológico via metodologia biotina estreptavidina e a construção de monocamadas a partir de moléculas de DNA modificadas com grupamentos tióis. As metodologias foram comparadas e a que fez uso do DNA tiolado foi escolhida para efetuar os procedimentos de imobilização, que foram então otimizados. Para monitorar o sinal de hibridização do genossensor, dois métodos foram estudados, sendo: detecção via oxidação da base nitrogenada guanina e detecção via interação do material genético com indicadores eletroanalíticos, sendo este último o que apresentou melhores resultados, sendo selecionado. Como indicadores foram avaliados os corantes azul de metileno e azul de meldola e os compostos de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$, que foram caracterizados e avaliados por técnicas eletroanalíticas e espectrofotométricas. Estes foram estudados frente aos processos de interação com o material genético nativo e degradado, por meio do método da razão molar. O azul de metileno e o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ apresentaram forte interação com o DNA de Calf Thymus, com constantes de interação de $1,5 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$. Estes foram utilizados como indicadores eletroanalíticos na etapa de hibridização, sendo eficientes para detecção de genótipos da hepatite C em amostras amplificadas de soro sanguíneo.

ABSTRACT

This paper describes a studies of biosensors modified DNA construction for hepatitis C virus detection. It was used gold from recordable CDs as a electrodic substrates just described in the literature. The procedure of construction of this particular electrode was modified and this modification was evaluated using electrochemical, scanning electron microscopy and fluorescence techniques. Two detention proposals were evaluated: first, the construction of self assembly monolayers with mercaptopropionic acid and subsequent binding of biological material by streptavidin biotin method and second, the construction of monolayers from molecules of DNA modified with thiol groups. The methods were compared and the DNA thiol was chosen to perform the detention procedures, which were then optimized. To monitoring the hybridization signal genosensor, two methods were studied,,: guanine oxidation detection and interaction of genetic material with electroanalytical indicators, the latter being the one with better results, and selected. As indicators were evaluated the methylene blue and meldola blue dye, and copper compounds $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$, which were characterized and evaluated by spectrophotometric and electroanalytical techniques. These coumpounds were studied before the interaction process with the native and degraded material by the molar ratio method. The methylene blue and $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ showed strong interaction with the Calf Thymus DNA with constant of 1.5×10^4 and $1.0 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$. These were used as indicators of hybridization in electroanalytical step and they were efficient for detection of hepatitis C genotypes in amplified blood serum samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho de representação do vírus da hepatite C (SECKO, 2009).	35
Figura 2. A) Fita simples constituída do esqueleto açúcar fosfato ao qual estão ligadas as bases nitrogenadas específicas. B) Estrutura molecular do ácido desoxirribonucléico, segundo Watson e Crick (1953).....	39
Figura 3. Esquema ilustrativo do acoplamento das bases nitrogenadas que compõe o DNA. Sítios de oxidação e redução nas moléculas de guanina, citosina e adenina.	42
Figura 4. Mecanismo proposto para oxidação da base guanina sobre superfície eletródica de ouro (FERAPONTOVA, 2004).	44
Figura 5. Princípio de funcionamento de um genossensor eletroanalítico.	45
Figura 6. A) Interação estreptavidina biotina. B) Representação da imobilização do DNA pela técnica de (●) biotina (⊕) estreptavidina.	48
Figura 7. Processo ilustrativo de formação de monocamadas auto organizadas.....	49
Figura 8. Esquema de monitoramento direto do processo de hibridização via oxidação da guanina (PIVIDORI, 2002).	52
Figura 9. Esquema de monitoramento do processo de hibridização via indicadores eletroativos (PIVIDORI, 2002).....	53
Figura 10. Processo de intercalação. Molécula pequena ligada entre os pares de bases. Interação de uma molécula grande com o sulco maior do DNA (IHMEELS; OTTO, 2005).	54
Figura 11. Esquema de uma determinação baseada no monitoramento do processo de hibridização via marcação enzimática com peroxidase.....	56
Figura 12: Esquema ilustrativo da confecção de CDtrodos: I) área recortada do CD; II) máscara de tonner prensada à superfície do CD; III) contato elétrico revestido com fita de teflon.....	61
Figura 13. Esquema ilustrativo da confecção de CDtrodo de ouro com uso de fita de galvanoplastia.	66
Figura 14. Micrografia de varredura eletrônica da superfície do CD de ouro. A) aumento de 2 mil vezes, B) aumento de 5 mil vezes.....	69
Figura 15. CDtrodos confeccionados pela técnica de A) máscara prensada e por B) fita de galvanoplastia.	70
Figura 16. Voltamograma cíclico para CDtrodo de ouro em meio de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, após 15 ciclos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$	71

Figura 17. A) Voltametria cíclica em CDtrodo. $K_4Fe(CN)_6$ 1 mmol L ⁻¹ em tampão fosfato pH 7,3. B) Relação de linearidade entre a corrente de pico anódica e catódica para com a raiz quadrada da velocidade de varredura.....	72
Figura 18. Voltamogramas cíclicos em eletrodo de ouro convencional. Solução 0,03 mol L ⁻¹ de ácido mercaptopropiônico em meio de tampão fosfato pH 7,2.....	73
Figura 19. Voltametria de pulso diferencial. Avaliação do comportamento do eletrodo de ouro convencional nas soluções tampão pH 5,7. Acetato, citrato, citrato-fosfato, fosfato e fitalato-hidróxido de sódio. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.....	74
Figura 20. Voltamagras de pulso diferencial. Eletrodo de ouro em solução tampão citrato-fosfato, em diferentes valores de pH. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.....	75
Figura 21. A) Gráfico do Pareto e B) dos efeitos principais entre tempo de incubação e quantidade de etanol. Resposta relativa à razão de pico.	77
Figura 22 . A) Gráfico de Pareto e B) dos efeitos principais entre tempo de incubação e quantidade de etanol. Resposta relativa à diferença de potencial de pico.	77
Figura 23. Superfícies de resposta: A) razão de pico e B) diferença de potencial de pico. Valores obtidos para porcentagem de etanol (25 e 75%) e tempo de preparo da monocamada de ácido mercaptopropiônico (2 e 16h).....	78
Figura 24. Voltamograma de pulso diferencial. Eletrodo de ouro convencional modificado com ácido mercaptopropiônico em solução tampão citrato-fosfato pH 6.0. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.	79
Figura 25. Micrografia de varredura eletrônica da superfície do CD de ouro modificado com monocamada de ácido mercaptopropiônico. Aumento de 5 mil vezes. A) 75% de etanol, B) 25% de etanol.	80
Figura 26. Voltamograma de pulso diferencial em solução tampão citrato-fosfato pH 6,0. (—) CDtrodo de ouro. (—) CDtrodo modificado com ácido mercaptopropiônico. $V = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.....	81
Figura 27. Voltamograma cíclico em tampão citrato-fosfato pH 6.0. CDtrodo de ouro modificado com ácido mercapropiônico. (—) primeira varredura, (—) segunda varredura.....	81
Figura 28. Voltamogramas cíclicos em meio de ácido sulfúrico 0,5 mol L ⁻¹ , traçado com (—) CDtrodo e (—) CDtrodo/MPA.....	83

Figura 29. Esquema estrutural de imobilização da enzima HRP, via metodologia (⊕) esteptavidina (●) biotina, sobre monocamada auto organizada de ácido mercaptopropiônico.....	85
Figura 30. Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato pH 7,0, traçado com (—) CDtrodo limpo e com (—) CDtrodo modificado com HRP em presença de peróxido de hidrogênio.....	86
Figura 31. Curva analítica para o monitoramento da concentração de peróxido de hidrogênio em CDtrodo modificado com enzima HRP, utilizando-se o ácido 5-aminosalicílico como mediador eletroanalítico.....	87
Figura 32. Voltamogramas cíclicos para $K_4Fe(CN)_6$ em ouro, (—) antes e (—) após a modificação com monocamada de HS-DNA HCV 1 ($0,5 \mu mol L^{-1}$, 30 min).....	89
Figura 33. Porcentagem de cobertura da superfície de ouro em função do tempo e da concentração do modificador HS-DNA HCV 1.....	90
Figura 34. Microscopia de fluorescência das superfícies de ouro. A) CD em tampão fosfato, B) CD com fluoresceína e C) CD modificado com HS-oligo HCV-FLU.....	91
Figura 35. Sinal de fluorescência de sonda HS-oligo HCV-FLU sobre CD. Formação de aglomerados.....	92
Figura 36. Fórmula estrutural do ânion molecular guanossina monofosfato.....	93
Figura 37. Voltametria cíclica para CDtrodo de ouro. (—) Tampão fosfato pH 7,1 e (—) guanossina monofosfato $1,0 mmol L^{-1}$ em pH 7,1.....	94
Figura 38. Voltametria cíclica em meio de tampão fosfato pH 7,2. Ferrocianeto de potássio $1,5 mmol L^{-1}$, (—) antes e (—) após ciclagem em solução de guanossina monofosfato.....	95
Figura 39. Voltametria de pulso diferencial em CDtrodo de ouro. (—) Tampão fosfato pH 7,1 e (—) guanossina $0,01 mol L^{-1}$ em pH 7,1. $v = 5 mV s^{-1}$. Amplitude de pulso = 50 mV.....	96
Figura 40. A) Curva analítica para a oxidação da guanossina sobre eletrodo de ouro. B) Região de linearidade.....	96
Figura 41. Voltamograma de pulso diferencial em CDtrodo de ouro. (—) Tampão fosfato pH 7,1 e (—) DNA de Calf Thymus $30 \mu g mL^{-1}$, em pH 7,1. $v = 5 mV s^{-1}$. Amplitude de pulso = 50 mV.....	97
Figura 42. Fórmula estrutura da molécula de 8 oxoguanina.....	98

- Figura 43. Voltamograma de pulso diferencial em CDtrodo de ouro. Tampão fosfato pH 7,1 (—) e DNA de Calf Thymus degradado, em pH 7,1 (—). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso = 50 mV. 99
- Figura 44. Cronoamperogramas. Sinal de corrente em função do tempo para (—) solução de tampão fosfato pH 7,1 e (—) solução de guanosina monofosfato 6,67 mmol L⁻¹. Potencial aplicado $E = + 1,07 \text{ V}$, tempo de aplicação de potencial, $t = 60 \text{ s}$ 100
- Figura 45. Curva analítica para a oxidação da guanosina sobre eletrodo de ouro, obtida por amperometria a potencial fixo. 100
- Figura 46. Cronoamperogramas. Sinal de corrente em função do tempo para (—) solução de tampão fosfato pH 7,1 e (—) DNA de Calf Thymus degradado, em pH 7,1. Potencial aplicado $E = + 1,07 \text{ V}$, tempo de aplicação de potencial, $t = 60 \text{ s}$ 101
- Figura 47. Voltamogramas cíclicos em CDtrodo de ouro: comportamento eletroquímico dos complexos (A) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ (0,88 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e (B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ (0,02 mol L⁻¹) em solução tampão fosfato pH 7,2. 102
- Figura 48. Voltametria cíclica para CDtrodo de ouro em meio de tampão fosfato pH 7,3. $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L⁻¹, (—) antes e (—) após ciclagem com complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ 103
- Figura 49. Voltametria cíclica para CDtrodo de ouro em meio de tampão fosfato pH 7,3. $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L⁻¹, (—) antes e (—) após ciclagem com complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ 104
- Figura 50. Fórmulas estruturais dos cátions A) azul de metileno e B) azul de meldola. 104
- Figura 51. Voltamogramas cíclicos: comportamento dos corantes. A) azul de meldola, 25 mmol L⁻¹. B) azul de metileno 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 105
- Figura 52. Voltamogramas cíclicos em CDtrodo de ouro. $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 8 mmol L⁻¹, (—) antes e (—) após ciclagem com A) azul de metileno e B) azul de meldola. Meio de tampão fosfato pH 7,2. 106
- Figura 53. Voltamogramas cíclicos. A) azul de metileno 0,1 mmol L⁻¹ e B) azul de meldola 25 mmol L⁻¹ em (—) ausência e (—) presença de DNA Calf Thymus 2,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tampão fosfato pH 7,3. 107
- Figura 54. Voltametria cíclica em meio de tampão fosfato pH 7,2. Sinal dos complexos A) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$, e B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ em (—) ausência e (—) presença de Calf Thymus DNA (2,86 $\mu\text{g mL}^{-1}$). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 108
- Figura 55. Espectro de absorção na região de ultravioleta. A) (—) DNA de Calf Thymus (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em (—) tampão fosfato pH 7,3. B) Curva analítica para DNA em comprimento de onda = 258 nm. Caminho óptico = 1 cm. 109

- Figura 56. Espectro de absorção dos complexos $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ (—) e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ (—) em água destilada. Caminho óptico = 1 cm. Concentração = $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ 109
- Figura 57. Curvas analíticas para os complexos: A) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ e B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ 110
- Figura 58. A) Espectro de absorbância do azul de metileno ($8 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Curvas analíticas para os picos de absorção do azul de metileno em crescentes concentrações. (—) 665, (—) 292 e (—) 246 nm $R = 999$. Caminho óptico = 1 cm..... 111
- Figura 59. A) Espectro de absorbância do azul de meldola ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$). B) Curvas analíticas para as bandas de absorção do azul de meldola. (—) 572, (—) 322 e (—) 267 nm. $R = 999$. Caminho óptico = 1 cm..... 111
- Figura 60. DNA degradado $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ + A) complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ ($8-39 \mu\text{mol L}^{-1}$) e B) azul de metileno ($0,6-4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$). 112
- Figura 61. A) Espectro de absorção da guanosina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 7,2. B) Curva analítica para a guanosina..... 114
- Figura 62. Monitoramento da absorbância da guanosina em função do aumento da concentração de (—) azul de metileno e de (—) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ 114
- Figura 63. Espectro do azul de metileno ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da adição de guanosina ($1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30$ e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Monitoramento das bandas de absorbância do azul de metileno em (—) 665, (—) 292 e (—) 246 nm. 115
- Figura 64. Bandas de absorção do DNA Calf Thymus nativo ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (—) ausência e presença dos compostos: (—) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ ($32 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (—) azul de metileno ($7,1 \mu\text{mol L}^{-1}$). 116
- Figura 65. A) Espectro de absorbância do (—) azul de metileno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do (—) azul de metileno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) + DNA ($2,4 \text{ nmol L}^{-1}$). B) Curvas analíticas para os picos de absorção do (—) azul de metileno em crescentes concentrações e para o (—) azul de metileno em crescentes concentrações + DNA ($2,4 \text{ nmol L}^{-1}$). 117
- Figura 66. Curva analítica para azul de metileno em presença de DNA. 118
- Figura 67. Relação entre o aumento da concentração de azul de metileno e a absorbância do DNA em 258 nm. A) Faixa de concentração sem sinal de absorção para o azul de metileno. B) Faixa de concentração com sinal de absorção para o azul de metileno. 119
- Figura 68. Monitoramento da absorbância das bandas do azul de metileno em função do aumento da concentração do DNA no meio. (—) 665, (—) 292 e (—) 246 nm. 120

- Figura 69. Gráfico do método da razão molar. Formação de complexo 1:1 entre o DNA e o azul de metileno. A) Monitoramento da absorção do DNA. B) Monitoramento da absorção do azul de metileno. 121
- Figura 70. Gráfico para cálculo da constante de interação entre o azul de metileno e o DNA. 121
- Figura 71. A) Variação da absorção do DNA nativo com relação ao aumento da concentração de complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. B) Região de linearidade. Caminho óptico = 1 cm. 122
- Figura 72. Gráfico da constante de formação do complexo formado entre o DNA e o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ 123
- Figura 73. Curva analítica para o azul de metileno em tampão fosfato pH 7,2, obtida por voltametria de pulso diferencial. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 50 mV. 124
- Figura 74. Sinal de corrente de pico de oxidação do azul de metileno em função do tempo de incubação. (—) Solução contendo azul de metileno ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$), (—) solução contendo azul de metileno e DNA ($6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), com voltamogramas medidos após incubação em mesma solução e (—) solução contendo azul de metileno e DNA, com voltamogramas medidos após incubações em diferentes soluções. 125
- Figura 75. Voltamogramas cíclicos de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato. (—) CDtrodo, (—) CDtrodo/DNA 15 min de aplicação de potencial + 0,5 V em solução de Calf Thymus DNA $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ 126
- Figura 76. Voltamogramas de pulso diferencial em (—) tampão fosfato. (—) Oxidação do azul de metileno em sensor modificado com DNA, após 180 s, em solução de incubação. 127
- Figura 77. A) Sinal de corrente de oxidação do azul de metileno sobre eletrodo de ouro. (A)- CD sem modificação. (B)- CD1/HS-DNA HCV 1. (C)- CD1/HS-DNA HCV 1 + amostra positiva HCV 1. (D)- CD2/HS-DNA HCV 1. (E)- CD2/HS-DNA HCV 1 + amostra positiva HCV 1. (F)- D1/HS-DNA HCV 1 + amostra positiva HCV 2b. B) Voltametria de pulso diferencial. Genossensor + (—) amostras soropositiva e (—) negativa de HCV. 128
- Figura 78. Voltametria de pulso diferencial em eletrodo de ouro, composto $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ (—) 0,4; (—) 0,8 e (—) $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, em meio de tampão fosfato pH7,2. 130
- Figura 79. Voltamograma de pulso diferencial obtido em eletrodo de ouro em meio de tampão fosfato pH 7,2, após estudo com composto $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ 131
- Figura 80. Valores de corrente de pico em função dos ensaios de lavagem da superfície de ouro adsorvida com complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. A)

Sem lavagem, B) rinsagem com água, C) rinsagem com solução água/etanol (1:1), D) agitação com solução água/etanol (1:1) por 5 minutos, E) agitação com solução água/etanol (1:1) por 10 minutos..... 132

- Figura 81. Valores de corrente de pico em função do tempo de incubação e da concentração do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ em solução. 133
- Figura 82. Voltametria de pulso diferencial em meio de tampão fosfato pH 7,2. Sinal de oxidação do complexo adsorvido sobre ouro após bloqueio com esperma de salmão. (—) 30 e (—) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 134
- Figura 83. Corrente de pico do complexo de cobre em função da concentração de esperma de salmão utilizado no bloqueio da superfície de ouro. 135
- Figura 84. Valores de corrente de pico de oxidação do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ adsorvido sobre a superfície de ouro em função da concentração de bloqueio e do tempo de incubação. 136
- Figura 85. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato pH 7,1 após ensaio de incubação com complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tempo de incubação = 10s. (—) CDtrodo, (—) CDtrodo/HS-DNA e (—) CDtrodo/HS-DNA/BSA-tween. 137
- Figura 86. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato. Avaliação da concentração de sequencia complementar no ensaio de hibridização do eletrodo modificado com sonda de HCV 1..... 139
- Figura 87. Valores de corrente de pico em função da concentração da sequencia complementar de HCV 1..... 139
- Figura 88. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato. Avaliação da concentração de sonda não complementar de HCV no ensaio de hibridização..... 140
- Figura 89. A) Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato. Avaliação do sinal entre a sequencia complementar e a não complementar, no ensaio de hibridização. B) valores de corrente de pico para as seqüências complementares e a não complementares. 141
- Figura 90. Voltametria de pulso diferencial com CDtrodo de ouro, em meio de tampão fosfato e amostra negativa de HCV, após 10 s de incubação com $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ 142
- Figura 91. Valores da intensidade de corrente de pico com relação aos ensaios com amostras negativas (HCV) de soro sanguíneo..... 143
- Figura 92. Voltametria de pulso diferencial em meio de tampão fosfato após incubação com solução de complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. (—) amostra negativa e (—) amostra de genótipo 1b. 143

Figura 93. Valores da intensidade de corrente de pico em função de amostras positivas e negativas de HCV em soro sanguíneo.....144

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Anti HCV</i>	Anti-Hepatite C Vírus
<i>5-ASA</i>	Ácido 5-Aminosalicílico
<i>BSA</i>	Bovine Serum Albumine
<i>ct-DNA</i>	Calf Thymus DNA
<i>Cu(NO₃)₂(en)₂</i>	bis-etilenodiamin-bis-nitrato de cobre (II)
<i>Cu(NO₃)₂(NN)₂</i>	bis-nitrogênio-bis-nitrato de cobre (II)
<i>DNA</i>	Ácido Desoxirribonucléico
<i>dsDNA</i>	DNA de fita dupla
<i>EDC</i>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
<i>ELISA</i>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<i>HCV</i>	Hepatite C Vírus
<i>HRP</i>	Horseradish Peroxidase
<i>HS-DNA</i>	DNA tiolado
<i>INNO-LIA</i>	INNO-Line Immuno Assay
<i>LIA</i>	Line Imuno Assay
<i>MCU</i>	11-mercapto-1-undecanol
<i>MEV</i>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<i>MPA</i>	Ácido Mercaptopropiônico
<i>PCR</i>	Reação de Polimerase em Cadeia
<i>QDs</i>	Quantun Dots
<i>RIBA</i>	Recombinant Immunoblot Assay
<i>RNA</i>	Ácido Ribonucléico
<i>SAM</i>	Self Assembly Monolayer
<i>ssDNA</i>	DNA de fita simples
<i>SPR</i>	Ressonância de Plasma de Superfície
<i>STA</i>	Streptavidina
<i>UV-Vis</i>	Ultra-Violeta e Visível
<i>8-oxoG</i>	8 oxoguanina
<i>λ</i>	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
2	HEPATITE	34
2.1	<i>Detecção, Diagnóstico e Tratamento da Hepatite C.....</i>	<i>36</i>
3	ESTRUTURA DO DNA.	38
3.1	<i>Detecção de DNA.....</i>	<i>41</i>
4	ELETROATIVIDADE DO DNA.....	42
5	GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS.	44
5.1	<i>Processos de Imobilização.....</i>	<i>46</i>
5.2	<i>Monocamadas Auto montadas.....</i>	<i>48</i>
6	MONITORAMENTO DOS PROCESSOS DE HIBRIDIZAÇÃO.....	51
6.1	<i>Intercaladores</i>	<i>53</i>
6.2	<i>Marcação Enzimática.</i>	<i>55</i>
7	NOVOS MATERIAIS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES.....	57
7.1	<i>Eletrodos Compósitos.</i>	<i>59</i>
7.2	<i>CDtrodos.</i>	<i>60</i>
8	JUSTIFICATIVA.....	61
9	OBJETIVO GERAL	62
10	Objetivos Específicos	62
11	EXPERIMENTAL.....	63
11.1	<i>Equipamentos.....</i>	<i>63</i>
11.2	<i>Reagentes</i>	<i>63</i>
12	METODOLOGIA	64
12.1	<i>Eletrodos de Trabalho Utilizados.....</i>	<i>64</i>
12.2	<i>Procedimentos de Imobilização Propostos.</i>	<i>66</i>

12.3	<i>Estudos de Caracterização e Interação DNA-Compostos Indicadores Eletroativos.</i>	67
12.4	<i>Avaliação Eletroanalítica da Oxidação da Guanina.</i>	68
12.5	<i>Construção e Aplicação dos Genossensores.</i>	68
12.6	<i>Estágio de Doutorado Sanduíche.</i>	68
13	RESULTADOS	69
13.1	<i>Estudos Iniciais de Caracterização do CDtrodo.</i>	69
13.2	<i>Caracterização Eletroquímica da Monocamada de MPA</i>	72
13.2.1	<i>Modificação com MPA</i>	75
13.2.2	<i>Monocamada de MPA sobre o CDtrodo.</i>	79
13.2.3	<i>Estudo da Área de Cobertura</i>	82
13.2.4	<i>Estudo da Viabilidade da Monocamada para Imobilização de Biomoléculas</i> .	84
13.3	<i>Estudos Iniciais com Sonda de HCV Tiolada.</i>	88
13.4	<i>Estudo Eletroanalítico da Molécula de Guanosina.</i>	92
13.4.1	<i>Estudo da Guanosina em Solução</i>	93
13.4.2	<i>Comportamento Eletroquímico dos Compostos Indicadores</i>	102
13.5	<i>Etapa Eletroanalítica de Estudos DNA x Compostos Indicadores</i>	106
13.6	<i>Caracterização Espectrofotométrica dos Compostos Indicadores Eletroativos.</i>	108
13.7	<i>Interação Composto x DNA</i>	112
13.7.1	<i>Estudo de Interação com DNA Degradado</i>	112
13.7.2	<i>Estudo Espectrofotométrico com Guanosina</i>	113
13.7.3	<i>Estudo do DNA Nativo</i>	115
14	CONSTRUÇÃO DO GENOSENSOR BASEADO EM INDICADORES ELETROATIVOS	123
14.1	<i>Compostos Corantes</i>	123
14.2	<i>Complexos de Cobre</i>	130

14.3	<i>Estudo de Bloqueio</i>	133
14.3.1	<i>Avaliação do Bloqueio com Esperma de Salmão</i>	134
14.3.2	<i>Avaliação do Bloqueio com BSA</i>	135
15	APLICAÇÃO	138
16	CONCLUSÕES	145
17	PROPOSTAS	147
	REFERÊNCIAS	148

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com o rápido crescimento do processo de globalização foi evidenciada uma crescente concorrência mundial, colocando novas exigências sobre os processos relativos as atividades em que a ciência química está inserida, bem como sobre a utilização de novos materiais aplicados tanto na área que concerne à química, quanto a áreas correlatas (CHARPENTIER, 2007; PETERS; DRUMMER; MUSSHOF, 2007; HUANG; CHOI, 2007). Dentre estas exigências, as ações de controle e monitoramento vêm alcançando lugar de destaque na sociedade atual. A necessidade de medições químicas se estende a muitas aplicações, tais como: alimentícias, medicinais, ambientais, militares, etc. (TAYLOR et al., 2001; PHILIP et al., 2001; INTERNATIONAL..., 2009; JORDANIA ACREDITATION SYSTEM, 2007). Os dados assim obtidos devem fornecer subsídios capazes de corroborar com ações determinantes para a qual a sociedade atual demanda. Dispositivos sensores, que possam detectar e quantificar espécies químicas, em distintos níveis são cada vez mais requisitados para aplicação em medições e os diversos sensores químicos vêm sendo considerados ferramentas fundamentais para essas aplicações (GOPEL; HESSE; ZEMEL, 1989; TIMMER; OLTHUIS; VAN DEN BERG, 2005). São caracterizados por dimensões reduzidas, robustez, facilidade de utilização e capacidade de manipular informações de análise, de maneira confiável e contínua (JANATA; JOSOWICZ; DE VANEY, 1994). Levando em consideração a quantidade destes dispositivos, os mesmos podem ser classificados em função da propriedade medida, sendo: i) sensores ópticos: baseados em medias ópticas, ressonância de plasma de superfície e de onda evanescente, ii) sensores piezelétricos: baseados em medida de onda acústica de volume e de superfície, iii) sensores eletroquímicos: baseados em medidas de potencial, corrente, carga iônica, efeito de campo e impedância, e iv) sensores condutimétricos: baseados em medidas de condutância. (SCHUETZLE; HAMMERLE, 1986; JANATA, 1989; SEIYAMA, 1989; YAMAUCHI, 1992; YU; YIN, 2002; THOMPSON, 2006).

O desenvolvimento de sensores tem sido considerado uma área promissora em estudos de química analítica, principalmente por conta dos desafios impostos quando se efetuam análises em matrizes complexas. Estas matrizes requerem metodologias rápidas, sensíveis, seletivas, estáveis e reproduzíveis (CRESPILHO; REZENDE, 2004; LOWINSOHN; BERTOTTI, 2006; SINGH, 2007). Os sensores

eletroquímicos mais utilizados são os potenciométricos e os amperométricos (BUDNIKOV et al., 1992). No caso dos sensores que fazem uso da amperometria, aplica-se um potencial externo ao sistema estudado, que faz com que uma determinada reação redox ocorra sobre a superfície de um eletrodo, resultando em um valor de intensidade de corrente que é uma medida direta da velocidade de reação eletroquímica, que pode ser monitorada e quantificada (STEFAN; VAN STADEN; ABOUL-ENEIN, 2001; BARD; FAULKNER, 2001). Este potencial aplicado confere à técnica uma certa seletividade eletroquímica. No caso, como o eletrodo constitui a superfície em que os processos são estudados, este pode ser considerado o transdutor eletroquímico (amperométrico), convertendo reações eletroanalíticas em dados mensuráveis (BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O, 1994; BARD; FAULKNER, 2001). Dentre estes sensores, merecem destaque àqueles em que a superfície eletroativa é propositalmente modificada por espécies quimicamente ativas, objetivando controlar a natureza da interface eletrodo-solução, elevando o grau de sensibilidade e seletividade do sensor eletroquímico e ampliando a aplicação dos mesmos (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002). As características físico-químicas da superfície destes eletrodos são alteradas e o eletrodo passa a responder, analiticamente, de acordo com as características do reagente modificador (INTERNATIONAL..., 1998). Estes eletrodos foram denominados eletrodos modificados e vieram minimizar as desvantagens dos eletrodos convencionais, tais como: bloqueio gradual da superfície por adsorção dos produtos gerados e a não diferenciação entre compostos com características redox similares (FUJIHIRA; RUSLING; RUBINSTEIN, 2007).

Os biossensores são parte significativa destes eletrodos modificados, no qual a modificação da superfície eletródica é efetuada com materiais de reconhecimento biológico, que podem ser enzimas, anticorpos ou até mesmo material genético, como oligonucleotídeos e DNA (EDELMAN; WANG, 1992; MURPHY, 2006). Este transdutor assim modificado deve ser capaz de detectar um evento de reconhecimento molecular entre a biomolécula e um analito específico, convertendo em sinal elétrico mensurável. O bioreconhecimento empregado por estes sensores apresenta seletividade similar aos processos ocorrentes com a biomolécula, quando a mesma encontra-se *in vivo*. Aliam-se então, a seletividade do material biológico com a sensibilidade do transdutor eletroquímico adequado (DIAMOND, 1998; EGGINS, 2002; MIKKELSEN; CORTÓN, 2004).

Este tipo específico de sensor modificado vêm sendo estudado e aplicado em diversas áreas do conhecimento, obtendo-se resultados promissores em detecção/quantificação de analitos de distintos interesses (PADDLE, 1996; PATEL, 2002; CASTILLO et al., 2004; ARYA; DATTA; MALHOTRA, 2008). A proposta inclui uma detecção rápida e segura, em baixos níveis, que, seguidamente, pode ser avaliada por metodologias já validadas, como a cromatografia, por exemplo (BUCK et al., 1990; WISE, 1990; CUNNINGHAM, 1998; SADANA, 2002). Os analitos de interesse ambiental e da área de saúde estão entre os mais estudados pelos biossensores. Pesticidas, peróxidos, polifenóis, metais, vírus e bactérias estão entre estes e dependendo do analito, distintos sistemas de modificação podem ser indicados para a construção do biossensor, variando-se desde a constituição do transdutor eletródico e o tipo de material biológico empregado, quanto os processos de imobilização deste material sobre a superfície do eletrodo e as reações monitoradas (WISE, 1991; MATHEWSON; FINLEY, 1992; BOISDÉ; HARMER, 1996; KELLER, 1998; MULCHANDANI; SADIK, 1999; ROGERS, 2006; ZACCO et al., 2007; PUMERA et al., 2007).

No geral, os biossensores podem ser classificados pelo tipo de interação existente entre o material biológico modificador e o analito de interesse. Biossensores enzimáticos utilizam enzimas como modificadores e são baseados nas reações catalíticas típicas destas, monitorando a quantidade de um produto ou de um reagente no sistema, bem como reações paralelas que possam ocorrer no meio ou ainda, fazendo uso de mediadores eletroquímicos (SCHELLER; SCHMID, 1992; USMANI; AKMAL, 1994; ROGERS; MULCHANDANI; ZHOU, 1995; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002). Os imunossensores constituem uma classe específica de biossensor que se baseiam nos imunoenaios e nos princípios resultantes das reações de afinidade da ligação antígeno anticorpo, que é dita como uma reação muito específica e seletiva. No geral, faz-se uso de marcadores para o monitoramento reacional, visto que os antígenos anticorpos são eletroquimicamente inertes. Estes marcadores, na sua grande maioria, são enzimas (CASS, 1990; BLUM; COULET, 1991; RICCARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002).

Uma subclasse destes biossensores tem chamado a atenção dos pesquisadores nas últimas décadas. Esta está baseada em processos de reconhecimento de genes específicos (complementaridade), no qual o eletrodo é modificado com material genético, sendo DNA ou seqüências específicas de

oligonucleotídeos (WANG, 2002; DRUMMOND; HILL; BARTON, 2003). Estes biossensores foram denominados de genossensores e incorporam uma camada genética específica de DNA, imobilizada na superfície de um transdutor como elemento de reconhecimento, convertendo parâmetros de interação genética em sinais analíticos mensuráveis (YANG, McGOVEN; THOMPSON, 1997). Sendo assim, os genossensores eletroanalíticos convertem sinais de interação entre bases nitrogenadas específicas, em sinais elétricos (potenciométricos, amperométricos, etc.), visto que as técnicas eletroquímicas são sensíveis, de baixo custo financeiro e de fácil uso e tornam-se então, atrativos para a atual indústria de diagnósticos clínicos, principalmente pela real possibilidade de produção em massa destes sensores (PALECEK; FOJTA, 2001). O genossensor trata-se de um forte candidato a investigações e diagnósticos genéticos, bem como detecção de espécies patogênicas e carcinogênicas, fármacos e seqüências de bases de DNA, efetuando diagnósticos de doenças pelo sequenciamento destas bases (LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999; BAN et al., 2004). DNA humano, viral e bacteriológico têm sido utilizados na construção destes sensores, com variadas aplicações, desde estudos forenses à detecção de patógenos, por exemplo (HAHN et al., 2005).

Neste aspecto, o uso de genossensores para diagnósticos na área médica clínica tem sido importante, principalmente a sua aplicação na química farmacêutica, como metodologias de alarme, diagnosticando resultados rápidos, precisos e de baixo custo, monitorando etapas iniciais de controle clínico, que são fundamentais para a área da saúde (MARQUES et al., 2003; MASCINI et al., 2005). Pacientes procedentes de etapas iniciais de contaminação viral, por exemplo, podem ser rapidamente diagnosticados e os processos iniciais de tratamento da virose podem ser efetuados de maneira mais eficaz, aumentando a possibilidade de eficiência do tratamento específico proposto, combatendo o agente causador da doença em suas etapas primárias do processo de infecção (ABAD-VALLE; FERNÁNDEZ-ABEDUL; COSTA-GARCÍA, 2005).

Atualmente, diversas doenças de caráter infecto-contagioso vêm causando preocupações em termos de saúde pública mundial. Uma destas infecções tem alcançado índices de contaminações alarmantes, tanto em nível de Brasil, quanto de mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002a). A virose transmitida pelo vírus conhecido com HCV é chamada de hepatite C e representa uma problemática para a saúde pública. É transmitida por meio de sangue contaminado, porém, ainda não

existe uma vacina disponível para este tipo específico de hepatite (AKAHANE et al., 1994; MATTHEWS; BINI, 2004). Atualmente atinge cerca de 170 milhões de pessoas, das quais 3,2 milhões somente no Brasil (1,5% da população), e 90% destas pessoas ainda não sabem que estão infectadas. Estima-se que 3% da população mundial encontra-se infectada com o vírus HCV, como por exemplo, de 100 a 140 mil infectados em Portugal (SEEFF, 1997; ERENZOY, 2001).

O diagnóstico do HCV tem sido efetuado por testes imunoserológicos que detectam a presença dos anticorpos anti HCV em 97% dos casos de indivíduos infectados. Porém, em certos casos de infecções agudas, falsos resultados podem ser obtidos (LOK; GUNARATNAM, 1997). Técnicas alternativas de diagnóstico, baseadas na detecção do RNA do vírus da hepatite, como investigações eletroquímicas, vêm sendo avaliadas e têm sido estudadas com o intuito de minimizar este problema, obtendo resultados promissores na detecção desta doença (YE et al., 2003). Neste aspecto, estudos iniciais efetuados com genossensores aplicados na detecção de vírus HCV têm sido reportados na literatura e no Brasil, o grupo de biossensores do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista vem estudando a construção e aplicação de genossensores possíveis de detectar o vírus (vários genótipos) em amostras soro positivas amplificadas. O grupo tem construído genossensores eletroquímicos com eletrodos de grafite e ouro, fazendo uso de metodologias de imobilização do tipo sol-gel, filmes poliméricos e monocamadas auto organizadas, monitorando o sinal analítico via enzimas marcadoras, intercalação com complexos e expulsão de íons cloreto de filmes de polipirrol (YAMANAKA et al., 2003; RICCARDI et al., 2002, 2004, 2006, 2008; MARQUES; YAMANAKA, 2007; TAGLIAVINI-SANTOS et al., 2008; ULIANA et al., 2008).

A aplicação de novos materiais na construção de genossensores, bem como o uso de distintas técnicas de imobilização de DNA, fatores estes associados aos variados tipos de monitoramento eletroanalítico, constituem uma gama de potencialidades que podem ser empregadas na área de biossensores, área esta que, apesar de ser bem específica, constitui uma ferramenta bem vasta em diversos ramos do conhecimento e encontra-se em pleno desenvolvimento investigativo.

2 HEPATITE

Nas últimas décadas, vários estudos apontaram para a análise de genes ligados a doenças infecto-contagiosas, sendo o vírus responsável pela hepatite, um dos genomas que vem sendo investigados com auxílio de métodos de aplicações moleculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002b; FERREIRA; SILVEIRA, 2004). Por conta do difícil diagnóstico da doença em estágios iniciais e pela ausência de vacina para tipos específicos, a avaliação analítica do vírus da hepatite vem alcançando lugar de destaque no âmbito da pesquisa científica (MERIC et al., 2002; CASSUTO et al., 2002; YAMANAKA; RICCARDI; COSTA, 2003; YE et al., 2003; RICCARDI et al., 2004; YAMANAKA et al., 2004).

Do ponto de vista científico, hepatite vem designar qualquer degeneração do fígado, que pode ser ocasionada por variadas possibilidades. No caso específico da ação dos vírus, estes parasitam as células hepáticas, objetivando a reprodução, atacando o fígado e destruindo estas células. O vírus do tipo C (HCV) vem ocasionar a infecção virótica aguda conhecida como hepatite C, que é transmitida por meio de sangue contaminado e enfatiza-se o fato de ainda não existir uma vacina disponível para este tipo específico de hepatite (ERENSOY, 2001; MATTHEWS; BINI, 2004; AKAHANE et al., 2004). A o vírus da hepatite do tipo C teve seu genoma publicado primeiramente por Choo e colaboradores (1989). Anteriormente, esta virose era estudada e denominada como hepatite não A, não B. É causada por um vírus de RNA (Figura 1) da família *flaviviridae*, que possui genoma de fita simples medindo 9,7 kilobases de comprimento. Apresenta seis genótipos distintos (1 a 6), subdivididos em grupos (a, b, c, etc.), e dentro de um mesmo genótipo e subgrupo, podem-se ter ainda variações do HCV, denominadas *quasispecies*, devido à replicação imperfeita do vírus, que resulta em pequenas mutações constantes (SIMMONDS et al., 1994; CONTE, 2000a).



Figura 1. Desenho de representação do vírus da hepatite C (SECKO, 2009).

O HCV não é considerado um vírus socialmente transmissível, sendo o contato direto com o sangue e derivados de sangue contaminados, a sua mais significativa forma de transmissão. A infecção está associada principalmente a transfusões sanguíneas, transplante de órgãos, processos de hemodiálise, uso de drogas injetáveis, dentre outros (BALDESSAR, 2007). O HCV foi tido como o agente causador de 90% dos casos de hepatite C pós transfusional, visto que a doença somente foi conhecida no final da década de oitenta e que vários indivíduos foram infectados durante procedimentos de transfusão de sangue efetuados até o início dos anos noventa (STRAUSS, 2001). Estes indivíduos devem ser avaliados para contaminação com HCV. No Brasil, desde 1993 os candidatos doadores de sangue devem, obrigatoriamente, passar por testes sorológicos anti HCV. Atualmente, por conta de medidas como esta, os casos de contaminação pós transfusional tornaram-se raros (ALTER, 1997). O risco de transmissão sexual é mínimo e a contaminação por contato com material cortante/perfurante deve ser considerada como fator de risco, como nos casos de material para tatuagem, alicates de unha ou lâminas de barbeiro, por exemplo. Procedimentos odontológicos e de acupuntura também podem apresentar riscos de contaminação. A transmissão vertical mãe criança é rara, porém, a gravidez não é contra indicada em casos de mulheres infectadas (TENGAN et al., 2001; TEIXEIRA; MARTINS FILHO; OLIVEIRA, 2005).

A hepatite C, como toda hepatite viral, apresenta um quadro de distribuição universal e magnitude variável de acordo com a região do país. Os números da doença em todo o mundo são alarmantes. Por ocasião da

Conferencia Internacional de Consenso sobre Hepatite C, estimou-se que 3% da população mundial encontra-se infectada com o vírus HCV e que 90% destas pessoas ainda não sabem que estão infectadas. A prevalência, com base em dados de pré-doadores de sangue, pode variar entre índices como 20% no Egito, 1,5% no sul da Europa e de 6,5% na África equatorial (CONTE, 2000b; ERENZOY, 2001).

Hoje atinge cerca de 150 milhões de portadores crônicos, dos quais 3,2 milhões somente no Brasil (1,5% da população), sendo este o maior índice de prevalência da América do Sul e uma incidência sete vezes maior que a do vírus da AIDS (STRAUSS, 2001; HEPATITIS C INFORMATION CENTRAL, 2009). Porém, ainda não existem estudos capazes de estabelecer sua real prevalência no país, visto que a vigilância epidemiológica das hepatites virais, no Brasil, baseia-se na notificação de casos suspeitos. O número de notificações não reflete a real incidência da infecção, pois, a grande maioria dos acometidos apresenta forma assintomática, sendo então, dificilmente captados. Alguns trabalhos têm buscado informações a cerca da distribuição do genótipo no Brasil (CODES et al., 2003; SILVA et al., 2005). Campiotto e colaboradores (2005) efetuaram um estudo da distribuição geográfica de genótipos de vírus da hepatite C, no Brasil, que determinou uma frequência genética estatisticamente diferente para cada região do país, porém, com genótipo do tipo 1 mais freqüente em cada região, sendo a região norte a de maior incidência para este genótipo.

De maneira geral, a evolução da hepatite C é lenta e progressiva. O tempo de incubação mostra-se variável, que pode ser de um a treze meses, sendo oito, em média. Cerca de 20% dos indivíduos pacientes curam-se ou tem doença crônica de natureza benigna e o restante 60% denotam evolução crônica. Dentre estes, um total de 20% desenvolvem cirrose hepática, mas que pode ser passível de transplante. Alguns casos podem evoluir para hepatocarcinoma (STRAUSS, 2001).

2.1 Detecção, Diagnóstico e Tratamento da Hepatite C.

O quadro clínico dos doentes com hepatite aguda do tipo C é bem semelhante ao dos outros tipos de hepatite virótica, necessitando de testes serológicos para efetuar a etiologia da doença em cada caso particular de infecção (MATTHEWS; BINI, 2004). Esta infecção com HCV possui um período de incubação médio de 7 a 8 semanas, no qual o anticorpo para o vírus pode ser detectado em 80% dos doentes. Após este período, o curso da hepatite C tem evolução clínica

flutuante, o que dificulta a sua confirmação pelos testes serológicos atuais, que são baseados na presença do anticorpo anti HCV (LOK; GUNARATNAM, 1997). Dentre estes, destacam-se os imunoenzimáticos (EIA), que são simples e relativamente baratos e detectam a maioria dos casos de infecção. O teste rotineiramente utilizado é o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), que vem adquirindo sensibilidade com a evolução dos mesmos, da primeira para as segundas, terceiras e quartas gerações do teste (BRANDÃO et al., 2001). O ELISA costuma apresentar resultados negativos nos primeiros meses após a contaminação, o que pode ainda falsear um resultado negativo para doadores de sangue. Os imunoenaios enzimáticos não diferem entre uma infecção aguda ou crônica, ativa ou curada (LE POGAM; 1998; GERMER et al., 1999; ERENZOY, 2001). O uso de testes suplementares, como RIBA (Recombinant Immunoblot Assay) e INNO-LIA (Line Immuno Assay) têm sido prático para auxiliar na confirmação da infecção, descartando falsos positivos em populações de baixo risco (GRETH, 1997). Técnicas alternativas, para a detecção direta do ácido nucléico do HCV, baseadas na biologia molecular vêm ganhando espaço, embora ainda menos acessíveis e mais onerosas. Verificam a viremia do doente de modo qualitativo, em estágios recentes de contaminação (FAGUNDES et al., 2008; GARCIA et al., 2008). A técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) e suas variações têm auxiliado como ferramenta complementar para o monitoramento terapêutico (CANTALOUBE, 1997; PRATT; CORNELLY, 2004; PAPAXANTHOS-ROCHE, 2004). A partir de um material genético simples, o processo pode gerar em questão de horas, bilhões de moléculas similares, material que pode ser utilizado na detecção de níveis baixos de infecção viral. Atualmente, pesquisas envolvendo sensores baseados no monitoramento da hibridização da material genético (genossensores), em conjunto com as técnicas de PCR, podem ser ferramentas auxiliares na análise de vírus da hepatite (HERMANSON, 1996; CASTRO et al., 2001).

Os métodos de detecção de seqüências do DNA estão sendo desenvolvidos de forma rápida e ampla em inúmeras áreas (GONÇALVES et al, 2005). A química eletroanalítica tem feito uso da técnica tradicional, imobilizando o DNA simples em suporte sólido, seguido de monitoramento do processo de hibridização (associação de duas fitas de DNA complementares através de pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas que os formam) para determinação de seqüências específicas de bases nitrogenadas. Baixo custo, simplicidade de análise, medida em tempo real,

rapidez e seletividade são os atrativos apresentados pela técnica (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000; MIKKELSEN, 2005). Por conta do difícil diagnóstico da doença em estágios iniciais e pela ausência de vacina específica, a avaliação analítica do vírus da hepatite vem alcançando lugar de destaque nestes trabalhos de pesquisa (CASSUTO et al., 2002; YAMANAKA, RICCARDI; COSTA, 2003; YE et al., 2003; RICCARDI et al., 2004; YAMANAKA et al., 2004).

O tratamento da hepatite C tem por objetivo deter a progressão da doença hepática inibindo a replicação do vírus, o que pode levar a uma redução da atividade inflamatória, impedindo a evolução para casos de cirrose ou carcinoma (STRAUSS, 2001; ARAUJO et al., 2007). Os medicamentos disponíveis atualmente são o interferon, o peginterferon e a ribavirina, que tem apresentado baixa eficácia terapêutica, atingido os objetivos propostos em menos da metade dos pacientes, além de provocarem fortes efeitos colaterais, como depressão, fadiga, insônia, arritmias, queda de cabelo e até aborto (CONTE, 2000b; MATTHEWS; BINI, 2004; PRADO et al., 2008). Como ainda não se tem uma vacina específica para a hepatite C, fortalece-se a idéia da importância de pesquisas que possam propiciar testes confirmatórios mais rápidos, eficientes e confiáveis, detectando e diagnosticando a doença de modo mais preciso, acarretando em um monitoramento do indivíduo contaminado em estágios iniciais da infecção, ou seja, em estágios de fácil controle. Deve-se levar em conta, também, o fator econômico, visto que os gastos com o tratamento deste indivíduo logo no início da virose torna-se de menor custo para a saúde pública. Calcula-se que entre os anos de 2010 e 2019, a hepatite C poderá causar um prejuízo de 54 bilhões de dólares por perda de vida útil (TEIXEIRA; MARTINS FILHO; OLIVEIRA, 2005).

3 ESTRUTURA DO DNA.

A descoberta da estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucléico pelos cientistas James D. Watson e Francis H. C. Crick, publicada na revista nature em 1953, tem sido considerada um dos grandes eventos da ciência do século 20, devido ao impacto que esta descoberta causou no meio científico, desde as influencias básicas em disciplinas consolidadas até o nascimento de novas áreas do conhecimento, passando pelas informações que esta estrutura forneceu, viabilizando uma gama de descobertas seqüenciais (WATSON; CRICK, 1953). A estrutura macromolecular é baseada em duas cadeias helicoidais antiparalelas,

dispostas sobre o mesmo eixo central (Figura 2). Cada cadeia polimérica é constituída de um número de nucleotídeos (adenilato, timidilato, guanilato e citidilato) dispostos em um esqueleto baseado em moléculas de açúcar (desoxirribose) e fosfato, alternados, sendo que, para cada molécula de açúcar existe ligada (ligação do tipo fosfodiéster) uma base nitrogenada. Enfim, cada unidade monomérica de DNA é constituída de uma molécula de desoxirribose, uma de fosfato e outra de uma base nitrogenada. As duas cadeias se mantêm ligadas por forças e atrações entre as bases nitrogenadas que compõem o material. Essas ligações são propostas basicamente da seguinte maneira: a cada molécula de guanina, encontra-se ligada uma molécula de citosina e a cada molécula de timina, uma de adenina, que, somente se fortalece pela característica peculiar da disposição antiparalela das cadeias, que assim se tornam complementares, devido às pontes de hidrogênio entre estas bases (ADAMS; KNOWLER; LEADER, 1992; NELSON; COX, 2006).

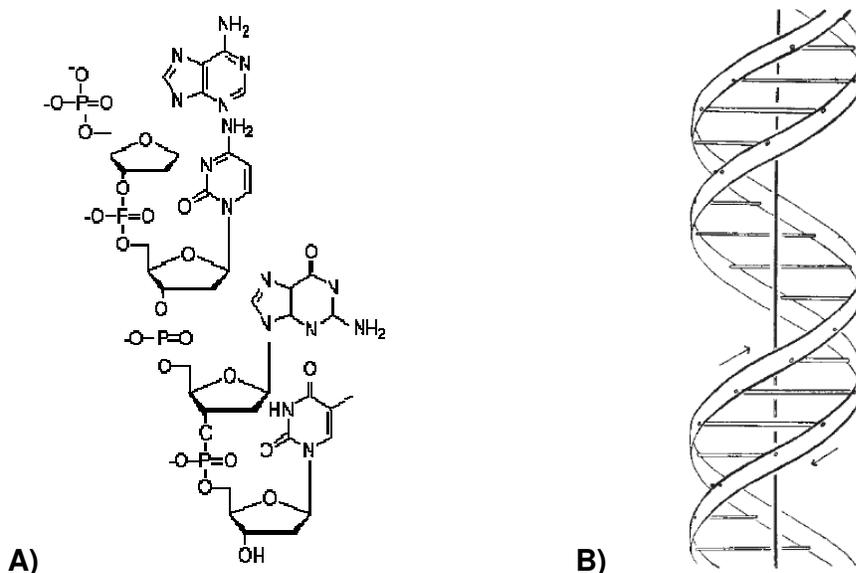


Figura 2. A) Fita simples constituída do esqueleto açúcar fosfato ao qual estão ligadas as bases nitrogenadas específicas. B) Estrutura molecular do ácido desoxirribonucléico, segundo Watson e Crick (1953).

A seqüência em que as bases encontram-se dispostas caracteriza um ácido nucléico. Biologicamente, esta seqüência carrega consigo informações que podem ser transmitidas de geração a geração de indivíduos. As informações podem ser copiadas a partir da formação de uma nova cadeia de DNA, ou seja, a separação de uma dupla hélice em suas duas cadeias fornece dois moldes sobre os quais se pode

construir duas novas cadeias com a mesma seqüência da cadeia mãe. Este processo é conhecido como replicação do DNA. Atualmente, a estrutura tridimensional de Watson e Crick é conhecida como forma B do DNA (DNA-B), considerada a mais estável em condições fisiológicas, ou seja, uma estrutura padrão para estudos iniciais de propriedades do DNA (DELVIN, 1992).

Dentre as várias propriedades químicas inerentes ao DNA, pode-se citar como uma das mais importantes, a capacidade de desnaturação reversível, que consiste na separação da dupla hélice, por condições extremas de pH ou temperatura, no qual são separadas as duas fitas pelo rompimento das pontes de hidrogênio, sem quebra das ligações covalentes existentes. Da mesma maneira, quando as condições de extremidade são revertidas, as fitas se unem novamente, formando a dupla hélice anterior. Este processo de re-ligação é conhecido como renaturação. Pode ocorrer em duas etapas (i: colisões aleatórias e ii: reanelamento), se as fitas estiveram completamente separadas, ou em uma única etapa, caso as fitas ainda se encontrem unidas por uma pequena quantidade de pares de bases (doze ou mais) (BERG et al., 2004).

Outra característica química de interesse está na capacidade de duas fitas complementares formarem pares, o que pode ser usado para detecção de seqüências específicas de DNA em espécies distintas, pela formação de DNA híbrido. Uma seqüência específica pode então ser detectada em presença de muitas outras seqüências diferentes em um mesmo material de análise, caso se tenha uma fita complementar a esta seqüência para hibridizar com ela. Esta complementar pode estar marcada de alguma forma (com enzimas, ou por radioatividade, por exemplo), podendo ainda ser de mesmo material genético, de diferente material ou mesmo sintetizada em laboratório. Este procedimento de hibridização constitui a chave para a biologia molecular moderna, levando a detecções específicas como a identificação de um único indivíduo dentre uma população, bem como a predição de uma doença muitos anos antes dos sintomas da mesma serem detectados (STRYER, 1995; BERG et al., 2004).

Alterações espontâneas na estrutura do DNA, particularmente ao longo da distribuição suas bases nitrogenadas, podem ocorrer de forma lenta, porém fisiologicamente significativas. Caso alguma destas alterações possa produzir variações permanentes na estrutura do DNA, mudanças ocorrerão também à cerca das informações genéticas transferidas para a próxima geração de indivíduos. Neste

caso específico, estas alterações são chamadas de mutações, que também podem ocorrer de forma não espontânea, ou seja, sob a ação de fatores externos, como a radiação UV ou por ação de radicais livres, por exemplo (DELVIN, 1992; PRATT; CORNELLY, 2004; NELSON; COX, 2006).

3.1 Detecção de DNA

Vários esforços têm sido efetuados no sentido de estudar as variadas deficiências e alterações genéticas ocorridas no DNA. Estas alterações podem levar a mutações genéticas, câncer e morte da célula. Neste aspecto, a detecção de bases específicas seqüenciais de ácidos nucleicos é de suma importância para o rápido diagnóstico destes problemas. Os estudos de sequenciamento genético já estão bastante avançados e este conhecimento está diretamente relacionado ao entendimento da estrutura e do comportamento da molécula de DNA (PASSAGLIA, 2003).

Os métodos de detecção de seqüências de DNA estão sendo desenvolvidos de forma rápida e ampla, em inúmeras áreas (ROBYT; WHITE, 1987; FINI et al., 1990; BISHOP; RAWLINGS, 1997; RAYLAY, 1999). A química analítica tem feito uso da técnica tradicional, utilizando o DNA de fita simples como sonda de investigação, seguido de monitoramento do processo de hibridização, que ocorre com grande especificidade e afinidade (CUNNINGHAM, 1998). Um grande interesse tem sido apresentado nos estudos baseados em metodologias eletroanalíticas para determinação de seqüências específicas de bases nitrogenadas pelo monitoramento do processo de hibridização (PALECEK; FOJTA, 2001). As vantagens são: o baixo custo, o formato simplificado de análise, a medida em tempo real, a rapidez e a seletividade (MIKKELSN, 1995; BERNEY, 2000; PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000). Na maioria dos formatos, a sonda que se utiliza para detectar a seqüência específica de DNA se encontra analiticamente marcada, sendo esta marcação o fator responsável pelo sinal analítico monitorado. Este processo de marcação pode ser efetuado com moléculas fluorescentes ou com enzimas, por exemplo (DIAMOND, 1998). Na área de eletroanalítica, o processo de monitoramento da hibridização tem sido efetuado por meio de sondas marcadoras, por uso de indicadores eletroativos e também diretamente pelos processos de oxidação da molécula de DNA. Estas três variações apresentam suas próprias peculiaridades,

devendo ser escolhida, cada uma, de acordo com o objetivo proposto, tipo de material eletródico empregado e material genético disponível (PIVIDORI, 2000).

4 ELETROATIVIDADE DO DNA

O comportamento eletroquímico do DNA vem sendo estudado há mais de quatro décadas, desde que a sua eletroatividade foi descoberta, em 1960, com estudos iniciais em eletrodos de mercúrio. Esta eletroatividade reside em pontos estruturais da molécula, sendo basicamente relativa aos processos sofridos pelas bases nitrogenadas, mais precisamente da guanina, da adenina e da citosina, visto que estes processos ainda não estão bem descritos para a base timina, e que as moléculas de açúcar e de fosfato são eletroquimicamente inertes (BRETT; SERRANO, 1995). A Figura 3 mostra os pontos estruturais nas moléculas, que são passíveis de sofrer processos redox.

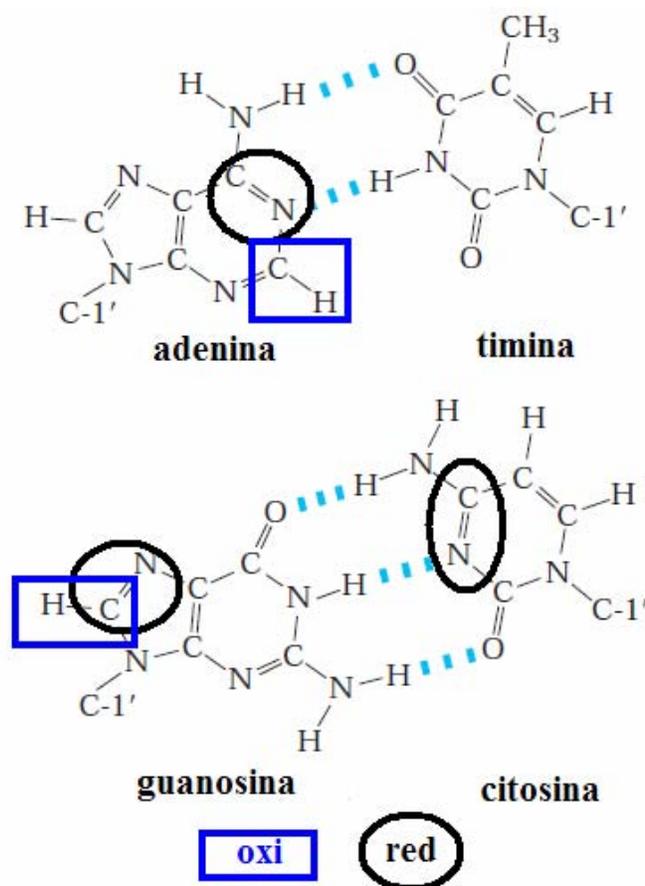


Figura 3. Esquema ilustrativo do acoplamento das bases nitrogenadas que compõe o DNA. Sítios de oxidação e redução nas moléculas de guanina, citosina e adenina.

Os primeiros estudos foram efetuados basicamente em termos de comportamento e estrutura do material genético (PALANTI, MARRAZZA; MASCINI, 1996; PALECEK, 2002). Desde então, uma gama de técnicas eletroquímicas, bem como distintos suportes eletródicos tem sido utilizados para a elucidação de vários aspectos relativos à estrutura do DNA. A literatura relata que a guanina é a base que mais facilmente se oxida, ou seja, que apresenta picos de oxidação em menores regiões de potencial quando comparada às outras bases nitrogenadas. Este potencial pode variar de valor quando se varia a superfície eletródica a qual o material genético está sendo avaliado (PIVIDORI, 2002). Em eletrodos de grafite, o DNA desnaturado tem apresentado dois picos anódicos quando estudado por voltametria de pulso diferencial, sendo + 0,89 e + 1,17 V, em pH 7,0, relativos à oxidação da guanina e adenina, respectivamente. Os processos de redução das bases guanina, citosina e adenina ocorrem a potenciais bem negativos, sendo possíveis basicamente em estudos com eletrodos de mercúrio. As bases timina e uracila podem ser oxidadas em condições de potenciais muito elevados e em meio de solvente não aquoso. (PALANTI; MARRAZZA; MASCINI, 1996). A maioria dos processos oxidativos destas moléculas é irreversível, dependente do pH e pode apresentar forte caráter adsorptivo sobre os suportes eletródicos (STEENKEN, 1989).

A oxidação da guanina, em eletrodos de carbono vítreo e grafite pirolítico tem sido reportada como uma reação irreversível, envolvendo quatro elétrons, acompanhada da formação do intermediário 8 oxoguanina (8-oxoG). Primeiramente uma reação lenta envolvendo dois elétrons e dois prótons H^+ (ataque nucleofílico na ligação $-N(7)=C(8)-$), produzindo a 8-oxoG, seguido da oxidação ($2e^-/2H^+$) desta, na posição $-C(4)=C(5)-$. No caso, para o eletrodo metálico de ouro, o procedimento inicial é semelhante, produzindo a 8-oxoG e posteriormente, os demais processos de oxidação envolvem reações de desprotonação de espécies formadas e suas subseqüentes hidratações (PALANTI, MARRAZZA; MASCINI, 1996). A Figura 4 apresenta uma proposta para um mecanismo de oxidação da guanina sobre eletrodo de ouro. A disposição das bases na molécula pode influenciar no sinal eletroanalítico obtido. Assim, o DNA nativo (dsDNA), o desnaturado (ssDNA) e o degradado apresentam, cada um, comportamento característico. Para o DNA de fita dupla, o fato das bases estarem ligadas entre si e dispostas na região central da molécula, colaboram para um processo de oxidação, do ponto de vista molecular, mais difícil e conseqüentemente o sinal de corrente é menor, em comparação com a oxidação de

uma fita simples de DNA. Em contra partida, o DNA degradado pode apresentar valores distintos, levando em consideração o grau de degradação do material (JELEN, FOJTA; PALECEK, 1996).

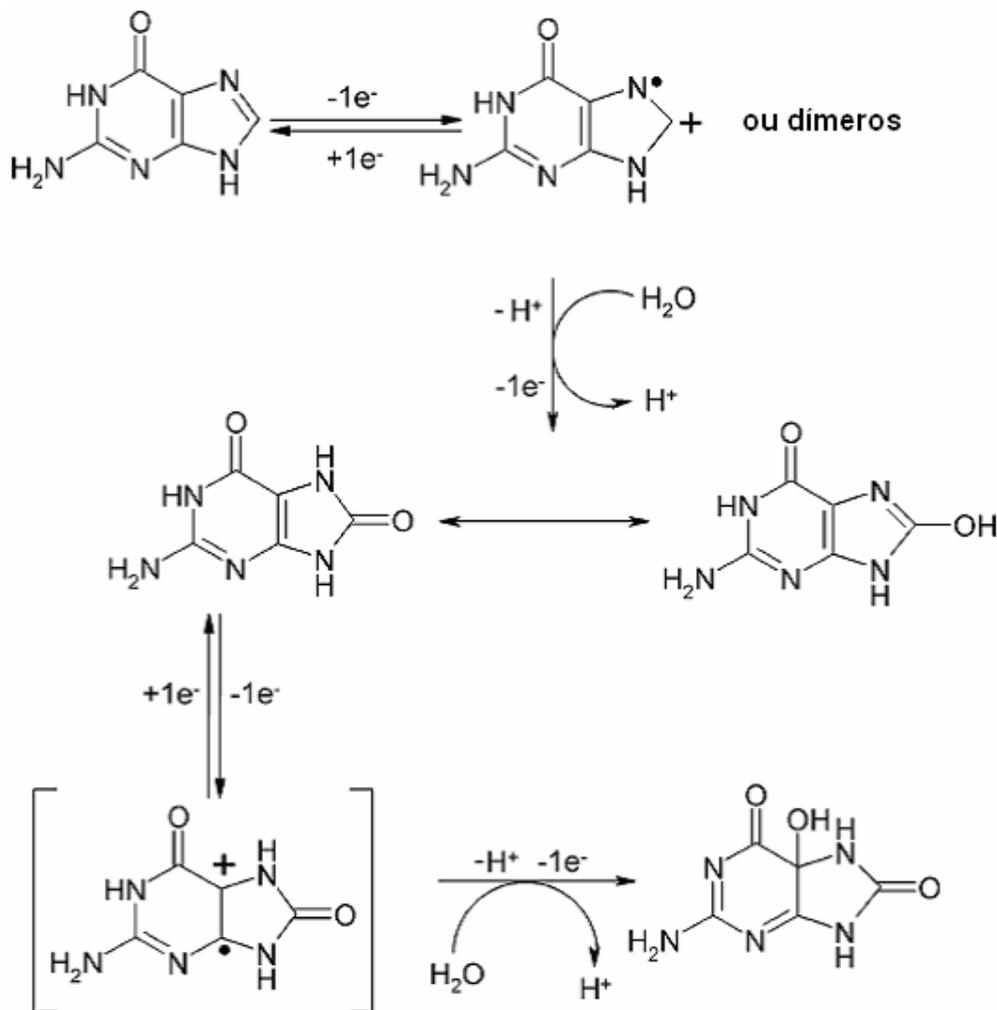


Figura 4. Mecanismo proposto para oxidação da base guanina sobre superfície eletródica de ouro (FERAPONTOVA, 2004).

5 GENOSSENSORES ELETROQUÍMICOS.

Recentes avanços em síntese de oligonucleotídeos, em conjunto com a atual microeletrônica vêm atuar de sobre maneira no desenvolvimento de biossensores baseados no reconhecimento de genes específicos (BERNEY, 2000). Os genossensores incorporam uma camada genética imobilizada na superfície de um transdutor, como elemento de reconhecimento, convertendo parâmetros de

interação genética em sinais analíticos mensuráveis (CUNNINGHAM, 1998; EGGINS, 2002). Sendo assim, os genossensores eletroquímicos convertem sinais de interação entre bases nitrogenadas específicas, em sinais elétricos (potenciométricos, amperométricos, etc.) (Figura 5). Estes sensores têm sido utilizados em investigações eletroquímicas como técnica altamente sensível, de baixo custo financeiro, de fácil uso, portátil e compatível com as atuais microtecnologias, principalmente pela real possibilidade de produção em massa (PALECEK, 2002). Estes genossensores são atrativos para as investigações e diagnósticos genéticos, bem como detecção de espécies patogênicas, analitos de interesse clínico, espécies carcinogênicas, fármacos e seqüências de bases de DNA (humano, vírus, bactéria, etc.) (LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ 1999; WANG, 2002).

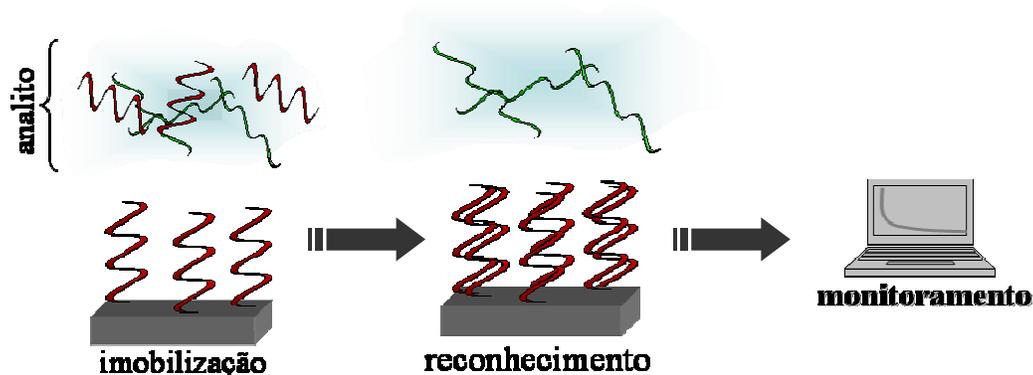


Figura 5. Princípio de funcionamento de um genossensor eletroanalítico.

A construção de um genossensor eletroquímico envolve, no geral, os seguintes passos: escolha do transdutor, imobilização do DNA e monitoramento eletroquímico do processo de hibridização (transdução do sinal). Cada passo deve ser otimizado, objetivando a melhor performance do genossensor. Para se alcançar uma sensibilidade e seletividade específica é requerido um processo máximo de hibridização eficiente, com o mínimo de adsorção não específica sobre a superfície do eletrodo (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000.).

Os transdutores amperométricos apresentam uma relação direta entre a intensidade de corrente e a concentração da espécie eletroativa, independência do volume da solução e possibilidade de automação e miniaturização. Estão entre os

mais empregados na construção de biossensores. Como transdutores, têm sido utilizados os eletrodos de carbono, ouro, grafite pirolítico, carbono vítreo, pasta de carbono e fibra de carbono. Os eletrodos do tipo convencional, micro eletrodos ou eletrodos impressos tem sido considerados ferramentas promissoras na investigação eletroquímica de material genético (LUCARELLI et al., 2004; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ et al., 2004). No caso específico dos eletrodos de ouro, se tem trabalhado com os convencionais comerciais ou com eletrodos a base de ouro depositado sobre suportes plásticos, vidros, impressos ou fotolitografados. A superfície do ouro tem sido apresentada como uma plataforma viável para imobilização de biomoléculas por meio de ligações covalentes de grupamentos do tipo tiol, técnica conhecida como imobilização por ligação com monocamadas auto montadas (ULLMAN, 1996).

5.1 Processos de Imobilização

Uma vez escolhido o transdutor e efetuada sua caracterizado deve-se escolher o processo pelo qual o material genético será imobilizado sobre o mesmo. A literatura tem relatado que o controle da superfície química é essencial para a alta atividade, orientação, acessibilidade e estabilidade do material biológico confinado (VELIKY; McLEAN, 1994; STEFAN, 2001; MIKKELSEN, 2004). Dentre as etapas de construção de um biossensor, o processo de imobilização do material biológico constitui um ponto crucial e determinante, desempenhando um passo extremamente importante na confecção do sensor biológico. A cinética de hibridização dos ácidos nucléicos na superfície de um suporte sólido está diretamente relacionada à acessibilidade do DNA a este suporte. Alguns autores enfocam a necessidade de ligar o material genético por uma das extremidades da cadeia, o que condiciona a uma estrutura ligada flexível, no que diz respeito às trocas na conformação quando ocorre o processo de hibridização. Ligações aleatórias na superfície do eletrodo podem levar a modificações químicas das bases componentes do material genético, o que, conseqüentemente, pode ocasionar o decréscimo na especificidade da camada de reconhecimento (PIVIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000).

Diversos métodos tem sido empregados objetivando uma melhor imobilização, podendo haver uma dependência com o tipo de transdutor escolhido, bem como o tipo de material genético que se quer ligar ao eletrodo (LUCARELLI, 2004). As técnicas têm utilizado DNA simples, de dupla e de tripla hélice imobilizados na superfície do sensor. O material genético mais usual consta de uma

cadeia curta de oligonucleotídeos que é capaz de hibridizar uma seqüência alvo específica. Dentre os variados métodos de imobilização podem-se destacar os processos efetuados por adsorção, imobilização por ligação covalente, complexação com avidina estreptavidina, matrizes poliméricas e monocamadas auto montadas. (LA-SCALEA, 1999; PIVIDORI, 2002).

Para os procedimentos de imobilização por adsorção, dois tipos podem ser descritos:

i) Adsorção física: o método usual é efetuado por aplicação de um volume específico da solução trabalho sobre a superfície do eletrodo, seguido de secagem desta solução, ocasionando a retenção do material genético. Basicamente, a técnica não requer reagentes especiais ou modificações no material genético, porém, pode levar a uma baixa eficiência da hibridização, por ser um procedimento de imobilização estritamente aleatório, além de ocasionar perda do material por lavagem do sensor, devido aos fracos processos de interação entre o DNA e a superfície do eletrodo.

ii) Adsorção eletroquímica: também conhecido como método de adsorção em potencial controlado, que requer um pouco mais de instrumentação, visto que se baseia na aplicação de um potencial positivo específico no eletrodo de trabalho, que vem favorecer os processos de adsorção do material genético sobre o mesmo, visto que o DNA é um poliânion. A estabilidade da imobilização é devido às interações eletrostáticas entre o esqueleto açúcar-fosfato, negativamente carregado e a superfície do eletrodo (carga positiva). Geralmente, o potencial aplicado é de + 0,5 V, que implica em uma adsorção sem destruição da molécula de DNA. Pode-se imobilizar tanto sondas de captura, para processos de hibridização, quanto dsDNA, para efetuar estudos de detecção de pequenas moléculas.

O processo de imobilizar material genético por formação de complexos estabelece ligações mais fortes entre a superfície do sensor e o material genético, tendo vantagens, como o baixo nível de perda de material por lixiviação, porém, possíveis processos de fragmentação ou mudanças de conformação da molécula podem ocorrer. Dentro desta proposta, a metodologia mais utilizada tem sido o uso do conjugado avidina biotina, que são proteínas que formam um complexo de extrema estabilidade. Biotina (vitamina H) é uma pequena molécula que se liga com uma alta afinidade com a avidina ou com a estreptavidina, podendo ser removida

somente sob condições experimentais extremas (Figura 6). Já a estreptavidina é uma proteína que possui quatro sítios de ligação idênticos.

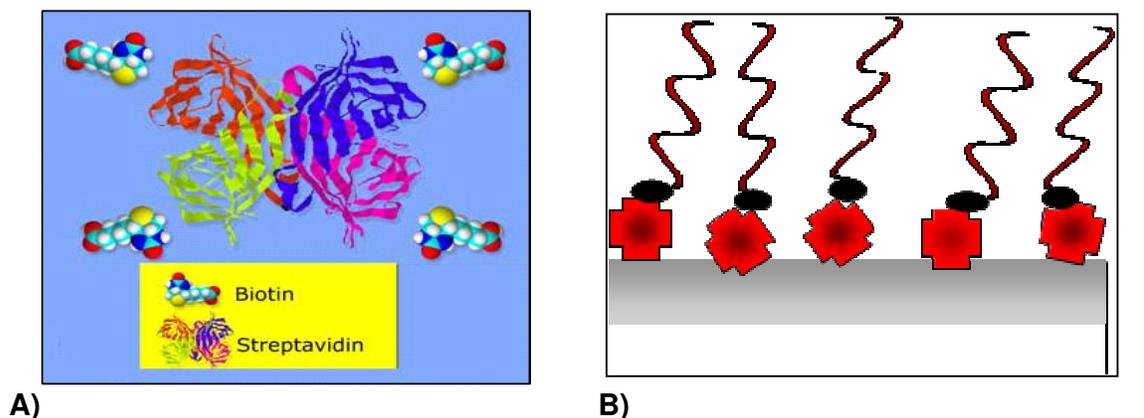


Figura 6. A) Interação estreptavidina biotina. B) Representação da imobilização do DNA pela técnica de (●) biotina (✚) estreptavidina.

A técnica consiste inicialmente na fixação de uma das moléculas na superfície do eletrodo. Este procedimento pode ser efetuado por adsorção, por exemplo, ou até mesmo por mistura em pasta de carbono. Seguidamente, imobiliza-se a molécula de oligonucleotídeo modificada com a outra molécula, que por sua vez estará disposta sobre a superfície do eletrodo de forma orientada e com uma certa estabilidade, visto que, por esta técnica, a imobilização não é fortemente afetada pelos valores variantes de pH, temperatura ou ação de solventes orgânicos e agentes desnaturantes (LA-SCALEA, 1999; KURAMITZ et al., 2003; WILLIAMS et al., 2003; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ et al., 2004; LUCARELLI, 2004). A técnica vem sendo estudada para detecção de RNA de HCV pelo grupo de eletroanalítica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, apresentando resultados satisfatórios (YAMANAKA; RICCARDI; COSTA, 2003; YAMANAKA et al., 2004; RICCARDI et al., 2004).

5.2 Monocamadas Auto Montadas.

A superfície de ouro merece destaque quando se pensa em material metálico empregado como superfície eletródica, devido à sua elevada pureza,

possibilitando efetuar trabalhos em ampla faixa de potencial na região positiva, permitindo ainda o controle e a modificação de sua superfície de trabalho. Uma técnica bastante empregada atualmente tem sido baseada na adsorção irreversível de alcanos funcionalizados sobre uma superfície metálica ordenada, sendo a aplicação de tióis sobre a superfície de eletrodos de ouro, uma prática preferida recentemente, devido à formação de uma estrutura altamente ordenada. Com uma superfície eletródica bem estruturada, fica mais fácil se efetuarem estudos posteriores relativos ao sistema de detecção analítica. (PALANTI; MARRAZZA; MASCINI, 1996; AKRAM; STUART; WONG, 2004; GOODING; PRAIG; HALL, 1998; FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003). A superfície do ouro tem sido apresentada como uma plataforma viável para imobilização de material genético via modificação da superfície do ouro por monocamadas auto organizadas (SAM, do inglês self assembled monolayers) (LA-SCALEA, 1999; LUCARELLI, 2004; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ et al., 2004; SENARATNE; ANDRUZZI; OBER, 2005; CARVALHAL, 2005). A imobilização pelo método de SAM tem melhorado a reprodutibilidade dos sensores devido à distribuição homogênea do material biológico sobre o transdutor (GOODING; HIBBERT, 1999; GOODING, 2001). Esta técnica consiste na modificação do eletrodo pela deposição de monocamadas de moléculas funcionais, sendo formadas espontaneamente pela simples imersão do eletrodo em solução contendo a molécula anfótera ou ainda pela aplicação de um potencial específico (Figura 7).

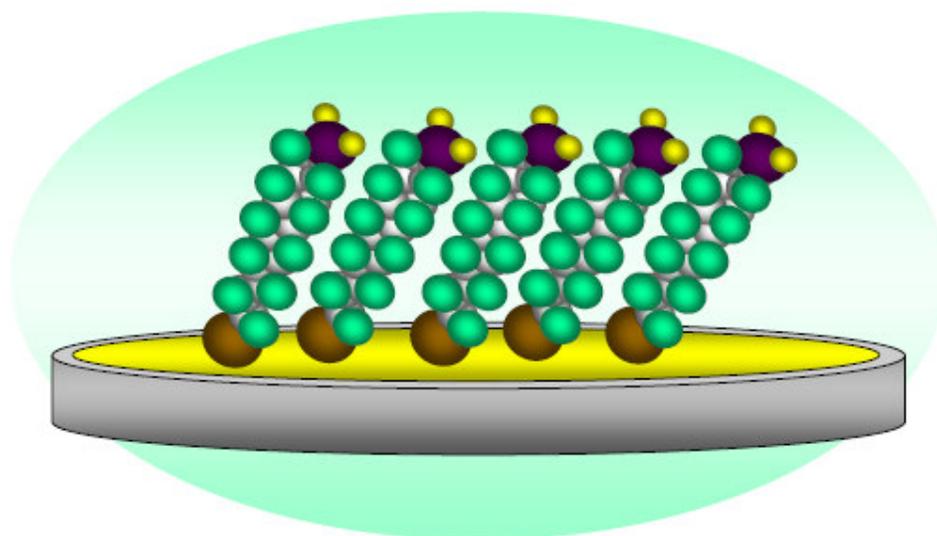


Figura 7. Processo ilustrativo de formação de monocamadas auto organizadas.

A adsorção da molécula ocorre por conta da interação entre os grupos funcionais do adsorvente com o adsorbato, seja por forças ou interações hidrofóbicas e após a modificação, a extremidade da monocamada passa a governar as propriedades do eletrodo. A aplicação desta técnica na confecção de biossensores apresenta potencialidades no que diz respeito ao aumento da sensibilidade e da estabilidade em função da faixa de potencial trabalhada, além de fornecer um micro ambiente bastante favorável ao material biológico imobilizado, permitindo a orientação deste material na superfície da monocamada, podendo levar a uma orientação do centro de oxi-redução para com a superfície do eletrodo, o que pode propiciar estudos de monitoramento de transferência eletrônica diretamente do sítio catalítico de enzimas, por exemplo. (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003; MENA; YÁÑEZ-SEDEÑO; PINGARRÓN, 2005; CAMPUZANO et al., 2006). Os alcanotóis têm sido investigados para construção de SAM em ouro objetivando estudos em bioeletroquímica, como superfícies alternativas de ancoramento de material biológico em eletrodos de ouro, como citocromo C, peroxidase, glicose oxidase e imunoglobulina G. (LI; CHENG; DONG, 1996; DONG, 1997; JIANG et al., 1997; GOODIN; HIBBERT, 1999; GOODING et al., 2001).

A estrutura da monocamada depende do substrato de ligação e da sua morfologia. A natureza do acoplamento e as forças de interação podem influenciar nesta estrutura. É importante ressaltar que o processo de acoplamento ocorre muito rapidamente, mas a organização morfológica é um processo lento, que pode durar em torno de horas ou até dias. A caracterização e a determinação da organização estrutural das monocamadas podem ser efetuadas por diversas técnicas (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003). Mendes et al. (2004) investigaram a transferência eletrônica entre a monocamada e o $K_4Fe(CN)_6$, em superfície de ouro policristalino, utilizando as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, discutindo também os efeitos do pH do meio e do comprimento da cadeia carbônica que forma a monocamada. Chah et al. (2002) efetuaram estudos de ionização e reprotonação de monocamadas de ácido mercaptopropiônico pela técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) e Piwonski et al. (2005) estudaram a morfologia de monocamadas por microscopia de tunelamento. Yu (2001) estudou a aplicação de monocamadas de alcanotóis de cadeias longas da superfície de CD graváveis, por espectroscopia de infravermelho, voltametria cíclica e microscopia de efeito túnel, comparando os resultados assim obtidos com o

estudados para filmes finos de ouro comercializados, indicando que este substrato é bastante viável como suporte para modificações com monocamada auto montadas.

Recentemente, sensores modificados com DNA tem feito uso da modificação por SAMs construídas a partir do próprio material genético, ou seja, efetua-se a monocamada com moléculas de oligonucleotídeos sintetizados com grupamentos tióis em uma das extremidades (PIVIDORI et al., 2000; LU et al., 2004; WIRTZ, et al., 2004; BRIONES et al., 2005; SAKAO et al., 2005; ABAD-VALLE, FERNÁNDEZ-ABEDUL; COSTA-GARCÍA, 2005). Com este tipo de monocamada, cada molécula de tiól adsorvido na superfície de ouro contém uma molécula analítica de interesse (sonda), o que não pode ser afirmado para o genossensor construído por formação de SAM em mais de uma etapa. Estes fazem uso da modificação com tiól para posterior ligação do material genético sobre esta, desta forma, não se pode afirmar que toda a extremidade da monocamada está ligada a um oligonucleotídeo, ou que todo oligo foi ligado à monocamada, obtendo-se perdas mais significativas de material de trabalho, além de oferecer processos adsortivos não específicos em maior intensidade (BIEBRICHER et al., 2004).

6 MONITORAMENTO DOS PROCESSOS DE HIBRIDIZAÇÃO.

No processo de monitoramento da formação da dupla fita, utiliza-se o eletrodo modificado com ssDNA específico, que por sua vez, vem identificar uma seqüência de bases complementares a partir da formação da dupla fita híbrida, sendo o processo de identificação considerado bastante eficaz e específico, mesmo em presença de variadas seqüências não complementares (FOJTA, 2002). O processo de hibridização deve ser efetuado sob condições controladas. O monitoramento deste processo pode ser efetuar direta ou indiretamente. O monitoramento direto é baseado nos processos redox sofridos pelas seqüências específicas de DNA, sobre tudo da molécula de guanina (Figura 8). Leva-se em conta os distintos comportamentos eletroanalíticos entre ssDNA e dsDNA, assim, o sinal obtido para a oxidação do DNA sobre o eletrodo modificado com fita simples difere do obtido pelo eletrodo após o processo de hibridização, visto que o eletrodo apresenta então um DNA de fita dupla sobre a superfície. Neste caso, o sinal monitorado pode diminuir, ou ainda aumentar, de acordo com as seqüências alvo. Caso o material genético investigado seja totalmente pareado com a fita sonda, o

sinal eletroanalítico tende a cair, já que as bases estão dispostas na parte interior da molécula hibridizada, dificultando os processos oxidativos.

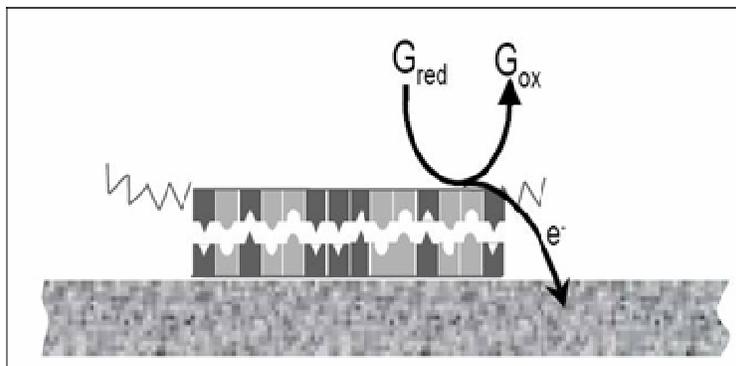


Figura 8. Esquema de monitoramento direto do processo de hibridização via oxidação da guanina (PIVIDORI, 2002).

No caso da fita alvo ser muito maior que a fita de investigação, pode ocorrer de ter excesso de bases oxidáveis sobrando, sem ser pareada, conseqüentemente, um aumento de sinal será obtido (THORP, 1998; PIVIDORI, 2002). Kerman e colaboradores (2003) efetuaram estudos de detecção e monitoramento do sinal da guanina em + 0,73 V, utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada, usando eletrodo de ouro modificado com monocamada de cisteína.

Para o monitoramento indireto, faz-se uso de indicadores eletroativos e ainda de sondas marcadas com enzimas. O procedimento com indicadores é descrito da seguinte maneira: inicialmente, o eletrodo modificado com ssDNA é mergulhado em uma solução que contém a seqüência alvo a ser detectada, um polinucleotídeo, por exemplo. Neste ponto, o processo de hibridização ocorre, sendo então, o eletrodo modificado transferido para uma outra solução, contendo o indicador específico de hibridização. Este deve apresentar atividade elétrica monitorável e também, capacidade de interagir com o DNA (PALECEK; FOJTA, 2001). Deste modo, a variação nas medidas eletroquímicas produzidas pela alteração no sequenciamento genético vem confirmar e constatar o processo de hibridização (Figura 9). Na hibridização é de suma importância a escolha do indicador eletroquímico. La Scalea et al. (1999) apresentam um resumo destes agentes e suas aplicações. Estes componentes interagem em distintas maneiras com o material genético, tendo preferência para o dsDNA. Uma desvantagem do

método está nos processos de adsorção não específicos, que podem influenciar nos resultados destes genossensores.

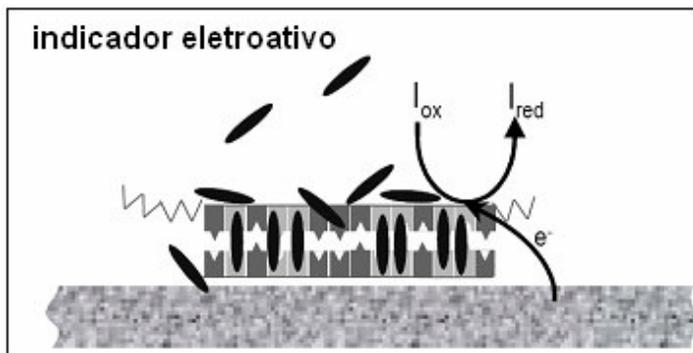


Figura 9. Esquema de monitoramento do processo de hibridização via indicadores eletroativos (PIVIDORI, 2002).

6.1 Intercaladores

O DNA é uma biomacromolécula que oferece diversos sítios de ligação para uma variedade de outras moléculas. Estas ligações podem acarretar em mudanças na estrutura do DNA e em suas funções. Existem três tipos básicos de processos de interação de moléculas/íons com o DNA (Figura 10):

- i) Interação eletrostática não específica entre a molécula/íon com a parte externa do DNA de dupla hélice;
- ii) Ligação com os sulcos (maior ou menor) da molécula, interagindo com as bordas dos pares de bases;
- iii) Intercalação planar entre os anéis aromáticos dos pares de bases.

A intercalação é um termo usado em química para a inclusão reversível de uma molécula (ou grupo) entre duas outras moléculas (ou grupos). As ligações eletrostáticas ou com os sulcos da molécula, geralmente não acarretam em mudanças na estrutura do DNA, porém, a intercalação entre a dupla hélice pode causar torções angulares na estrutura do esqueleto açúcar-fosfato ou ainda separar alguns pares de bases para que a molécula possa intercalar. Os três processos podem ser observados ao mesmo tempo, como no caso de algumas metaloporfirinas. As moléculas grandes possuem preferência pelos sulcos maiores

do DNA, sendo os sulcos menores, bem como os espaços planares disponíveis entre a dupla hélice, preferidos pelos ligantes pequenos (IHMEELS; OTTO, 2005).

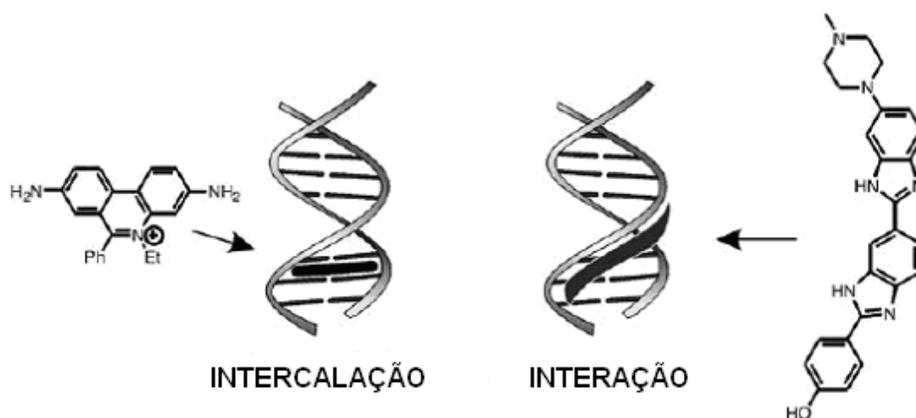


Figura 10. Processo de intercalação. Molécula pequena ligada entre os pares de bases. Interação de uma molécula grande com o sulco maior do DNA (IHMEELS; OTTO, 2005).

As bases nitrogenadas ficam situadas, na dupla hélice, dentro de um arranjo quase co-planar, permitindo que moléculas planares policíclicas intercalem entre dois pares de bases. Forças como: atração eletrostática, interação dipolo-dipolo, interações dispersivas e π -stacking, das moléculas intercaladoras, atuam no processo de interação com os anéis aromáticos das bases. Porém, forças de Van der Waals e hidrofóbicas governam as intercalações de maneira mais eficiente (WEMMER, 2000).

Apesar das constantes de formação entre os complexos e o DNA estarem na ordem de 10^{-4} a 10^{-6} , ou seja, muito menores que as constantes de formação entre os componentes do DNA, o processo de intercalação envolve uma pequena mudança de conformação na molécula, desenrolando e/ou alongando a mesma, podendo resultar em mudança na estrutura das moléculas de ribose, entre os carbonos C2' e C3', que pode aumentar os espaços entre os fosfatos e diminuir a densidade de carga ao longo da dupla hélice. A intercalação de uma molécula pequena impede que este processo ocorra novamente com outra molécula, por razões estéricas, ou mesmo pela redução do potencial eletrostático no sítio de intercalação. O processo de intercalação, com relação às pontes de hidrogênio entre as bases, pode ocorrer de modo axial, paralelo ou perpendicular. A determinação de como esta ligação entre o intercalador e o DNA está efetuada constitui uma

ferramenta de avaliação qualitativa e quantitativa deste processo de associação. A variações nas propriedades de absorção e emissão de luz podem auxiliar na elucidação destes processos (WEMMER, 2000; PIVIDORI, 2002; IHMELS; OTTO, 2005).

O estudo de interações entre o DNA (nativo e desnaturado) imobilizado e compostos de interesse, também vêm sendo citados na literatura (BRABEC, 2000; LU et al., 2002; IHMELS; OTTO, 2005; BOAL; BARTON, 2005). Os intercaladores eletroativos têm sido muito apreciados para interação com DNA, seja para pesquisas de detecção de pontos de mutação, quanto para estudos de interação, visto que eles podem aumentar consideravelmente o sinal eletroanalítico monitorado, além de apresentarem reações reversíveis em potenciais mais baixos, minimizando o efeito de interferentes (MARTINEZ; CHACON-GARCIA, 2005).

Neste contexto, merecem destaque os trabalhos efetuados com complexos metálicos ($\text{Co}(\text{bpy})_3^{+3}$, $\text{Co}(\text{phen})_3^{+3}$, $\text{Fe}(\text{phen})_2^{+3}$ e $\text{Fe}(\text{bpy})_2^{+3}$), compostos corantes (azul de metileno e azul de nilo) e drogas (daunomicina, doxorubicina, distamicina). Alguns complexos de cobre apresentam afinidade para com a dupla fita de DNA, podendo servir de indicativo de hibridização e pontos de mutação, visto que estes complexos têm afinidade por bases nitrogenadas específicas constituintes de DNA (CARTER, RODRIGUEZ; BARD, 1989; LABUDA et al., 1999; LIU et al., 1999; LIU et al., 2002; NAVARRO et al., 2003; ITO et al., 2005; IHMELS et al., 2005; HERNÁNDEZ-SANTOS, GONZALÉS-GARCIA; COSTA-GARCIA, 2005; LU et al., 2004; 2002).

6.2 Marcação Enzimática.

Uma das técnicas mais utilizadas para o monitoramento da etapa de hibridização é a metodologia de marcação enzimática. Diversas estratégias têm sido utilizadas, baseando-se na marcação de uma sonda de DNA com uma enzima específica, que posteriormente pode ter sua atividade enzimática monitorada e associada ao material genético alvo. A literatura tem relatado o uso de enzimas do tipo glicose oxidase, fosfatase alcalina e, na maioria dos estudos, a enzima peroxidase. As atividades são avaliadas frente a um substrato específico, reação que pode ser mediada, sendo a resposta do mediador relacionada com a detecção analítica (IKEBUKURU, KOHIKI; SODE, 2002). A Figura 11 apresenta um esquema

de monitoramento pelo método da marcação enzimática desenvolvido por PIVIDORI (2002).

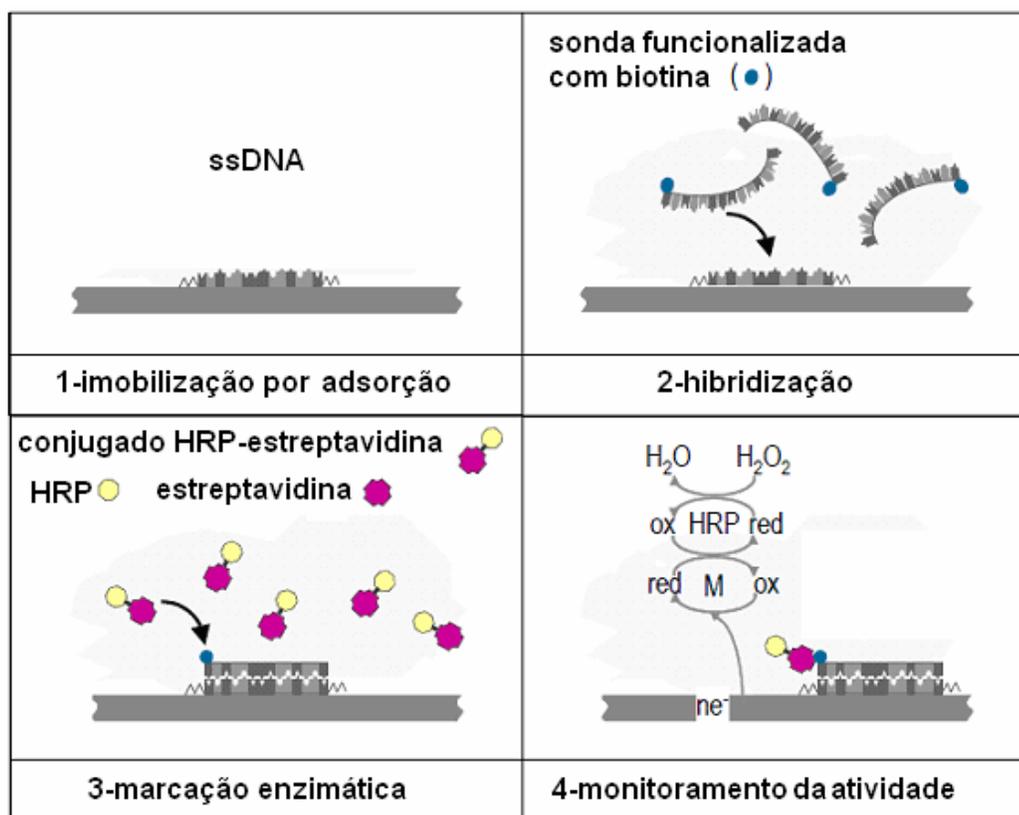


Figura 11. Esquema de uma determinação baseada no monitoramento do processo de hibridização via marcação enzimática com peroxidase.

As peroxidases (EC 1.11.1.7) estão entre as enzimas mais utilizadas em estudos analíticos, devido ao seu mecanismo catalítico de ação já se encontrar bastante estudado na literatura. São de fácil aplicação e manuseio, possuindo um baixo custo quando comparadas com outras enzimas empregadas para os mesmo propósitos. São metaloenzimas do tipo oxiredutases, catalisando diferentes reações oxidativas para uma variedade de substratos, podendo utilizar, por exemplo, o peróxido de hidrogênio como receptor de elétrons (redução de H_2O_2 para água). As peroxidases são de fácil obtenção e apresentam reações de conjugação já dominadas pela biologia molecular, o que permite a sua conjugação tanto no formato direto simples, quanto no composto, ou seja, a mais de uma molécula. Ela apresenta ainda uma forte afinidade com seus substratos, além de elevada atividade a ser monitorada. A enzima apresenta estabilidade em pH entre 5.0 e 9.0, sendo a faixa

ótima de trabalho para a HRP, por exemplo, está entre 6.0 a 7.5, com atividade próxima de 84% (DUNFORD, 1999; HERMANSON, 1996).

7 NOVOS MATERIAIS PARA CONSTRUÇÃO DE BIOSENSORES.

Nas últimas décadas, a literatura tem relatado diversas propostas de renovações aplicadas na área de sensores modificados com material biológico. Além dos eletrodos do tipo convencional, uma gama de micro eletrodos, eletrodos impressos, dentre outros, têm sido empregados como ferramentas promissoras na construção de biossensores aplicados em investigações eletroquímicas (MARQUES et al., 2004; PEREIRA et al., 2006). A busca de novos suportes visa ampliar as possibilidades de emprego de distintos materiais na construção destes sensores específicos, objetivando minimizar problemas básicos, como a renovação de superfície, por exemplo, bem como maximizar as potencialidades de imobilização de biomoléculas e as suas distribuições espaciais sobre as superfícies modificadas. A aplicação em análise de campo também é um dos objetivos buscados por estes novos sensores específicos. Materiais híbridos e em escala nanométrica vem sendo utilizados na construção de biossensores eletroquímicos, com resultados muito interessantes em termos de versatilidade e detecção analítica (HE; TOH, 2006).

Entende-se por nano materiais aqueles que compreendem materiais de tamanho menor que 100 nm, apresentando uma ou mais dimensões (partículas, pós, tubos ou fios) (NALWA, 2002). No que compete à tecnologia dos biossensores de DNA a aplicação de materiais em escala nanométrica vem contribuindo com o avanço desta tecnologia de detecção analítica (HUANG; CHOI, 2007). Nano partículas de ouro podem ser conjugadas com moléculas fluorescentes, aumentando a sensibilidade da detecção de sensores ópticos, por exemplo. Estas partículas de ouro podem ser conjugadas com o próprio material genético investigativo e ainda serem conjugadas com elementos indicadores, como o ferroceno. Esta proposta de aliar estas partículas com compostos metálicos pode ser de grande valia quando se faz uso de métodos de stripping, por exemplo. O uso da ligação com tiol também torna a proposta da construção de biossensores com nano partículas de ouro uma técnica promissora. Sílicas dopadas com complexos metálicos podem ser utilizadas como indicadores do processo de hibridização (HE; TOH, 2006).

A descoberta dos nano tubos de carbono tem sido considerada a abertura de uma nova fronteira na química e na física do carbono e sua aplicação na

construção de biossensores vem somar consideravelmente no desenvolvimento desta área, principalmente devido às diversas possibilidades de funcionalização, que tornam este material bastante atrativo e versátil (HERBST et al., 2004; LI; THOSTENSON; CHOU, 2008). Uma modificação simples aplicada a eletrodos pode ser efetuada, por exemplo, pela incorporação de um pequeno volume de uma dispersão de nano tubos de carbono a um eletrodo de carbono vítreo. A possibilidade de acoplamento de indicadores redox a estes tubos vem sendo aplicada, com ganho na etapa eletrocatalítica de determinações eletroquímicas. Outra técnica descrita é a confecção de materiais híbridos, como a combinação dos nano tubos com polímeros condutores, que aliam características tais como: estabilidade, reprodutibilidade, maior números de sítios ativos, forte aderência e homogeneidade (AGUÍ, YÁÑEZ-SEDEÑO; PINGARRON, 2008). Uma aplicação importante está na construção de biossensores enzimáticos que fazem uso do monitoramento direto da transferência eletrônica entre o sítio catalítico da enzima e o suporte eletródico, abrindo a possibilidade de preparo de biossensores sem mediadores (KATZ; WILLNER, 2004). Também podem ser utilizados para ampliar o sinal de detecção direta dos processos de oxidação da guanina em genossensores eletroanalíticos baseados no monitoramento direto do processo de hibridização (TROJANOWICZ, 2006).

Uma classe específica de nano partículas de grande interesse para a classe de biossensores são os chamados quantum dots (QDs), que são partículas semi condutoras tridimensionais confinadas em uma estrutura de 1 a 10 nm. São constituídos basicamente de clusters cristalinos em um número que vai de centenas a milhões de átomos. Este material pode agregar moléculas como a avidina ou distintos alcanotiolados, que podem servir de ancoramento para imobilização de inúmeras biomoléculas. Apresentam flexibilidade e cinética de associação rápida, tendo vantagens na construção de sensores que vão de aumento da sensibilidade a altas taxas de reação para multi ensaios, como no caso dos imunossensores (MERKOCÇI et al., 2005).

Considerando os novos materiais aplicados, devem-se destacar as micro esferas, também conhecidas como beads, que são partículas com diâmetro de 10 a 400 μm , muito utilizadas em ensaios de detecção em fluxo, combinando as vantagens da química em fase sólida com a atual micro fluídica. Podem ser materiais condutores, como partículas de grafite, ou não, como o vidro. São

passíveis de funcionalização, podendo ser suporte para variadas imobilizações de biomoléculas (MERKOÇI et al., 2005; WANG et al., 2003).

7.1 Eletrodos Compósitos.

A literatura relata o uso de transdutores rígidos na construção de biossensores eletroquímicos, denominados eletrodos compósitos, que constituem eletrodos confeccionados a partir da mistura de resina epóxi com material condutor, como o pó de grafite, por exemplo. Este material fica disperso na matriz polimérica, ou agrupado em zonas do material. Cada componente individual mantém sua própria natureza, enquanto que o compósito final apresenta qualidades químicas, mecânicas e físicas diferentes de ambos os materiais componentes. A rigidez do material implica em vantagens físico-mecânicas e aumenta a robustez do material. Com o material eletródico disperso em uma superfície polimérica, este pode se comportar como um arranjo de micro eletrodos, agregando fenômenos de superfície mais ricos quando comparado com eletrodos de superfície contínua (CÉSPEDES, MARTÍNEZ-FÀBREGAS; ALEGRET, 1996).

Este tipo de eletrodo têm sido aplicado na construção de genossensor eletroanalítico para a detecção de distintos analitos. A sua aplicação tem sido relacionada ao uso do monitoramento da atividade de enzimas, como a HRP, como indicadores do processo de hibridização (PIVIDORI, MERKOÇI; ALEGRET, 2000; 2001; CASTAÑEDA et al., 2007; LERMO et al., 2007; 2008; PIVIDORI et al., 2007). Um outro tipo bem característico de eletrodo compósito rígido é o eletrodo magnético, que na verdade é uma variação do anteriormente citado. Faz uso de um ímã inserido no corpo de eletrodo. Este é utilizado em conjunto com a técnica das micro partículas magnéticas. Em uma primeira etapa, utilizam-se partículas magnéticas modificadas com moléculas de interesse, como a estreptavidina, por exemplo. Estas partículas magnéticas possuem tamanho característico (2,8 μm) e podem servir de suporte para imobilizar o material biológico (DNA biotilado). Posteriormente, todos os processos de hibridização, bloqueio e lavagem ocorrem em solução, sobre a superfície das partículas e, por fim, o eletrodo magnético é colocado em contato com as mesmas, que são atraídas pelo ímã interno. O eletrodo é então transferido para a solução trabalho e a etapa eletroquímica é efetuada. Este tipo de metodologia aumenta a área superficial de trabalho, aumentando assim, o

sinal analítico e diminuindo os limites de detecção (ERDEM et al., 2006; ZACO et al., 2007; LERMO, 2007).

7.2 CDtrodos.

Nos últimos dez anos, um novo tipo de sensor eletroanalítico foi desenvolvido pelos grupos de pesquisa dos Professores Ívano Gutz e Lúcio Angnes, ambos do Instituto de Química da USP de São Paulo. Este sensor é baseado no uso de CDs compactos graváveis para a construção de eletrodos (ANGNES et al., 2000; RICHTER et al., 2003). A idéia inicial partiu da informação de que estes CDs possuem em sua constituição uma fina camada metálica de ouro ou prata, de alta pureza e uniformidade, depositada por sputtering, a qual geralmente possui uma espessura de 50 a 100 nm e área total da ordem de 100 cm². Os eletrodos confeccionados a partir desses materiais foram denominados de CDtrodos, possuindo comportamento eletroquímico semelhante aos eletrodos convencionais, com performances compatíveis, apresentando superior versatilidade, facilidade de obtenção, boa repetibilidade e um custo bem mais baixo. Estes foram inicialmente aplicados em estudos de quantificações de mercúrio, cobre e ácido ascórbico, por técnicas eletroanalíticas convencionais (RICHTER et al., 2000; RICHTER et al., 2001; MUÑOZ; MATOS; ANGNES, 2001a, 2001b; RICHTER; PEDROTTI; ANGNES, 2003).

A confecção dos CDtrodos de ouro, por exemplo, consiste inicialmente na rápida remoção das camadas poliméricas da superfície do CD, pela ação de ácido nítrico concentrado, o que dá acesso à camada metálica, seguido de lavagem com água destilada e secagem da superfície com nitrogênio gasoso. Posteriormente, mascaras de tonner são prensadas, a uma temperatura de aproximadamente 100 °C, na superfície do CD, delimitando assim a área de trabalho, região não coberta do CD. Recobre-se com esmalte e encaixa-se o contato elétrico (fio comum) com auxílio de fita de teflon. Um esquema ilustrativo é apresentado na Figura 12.

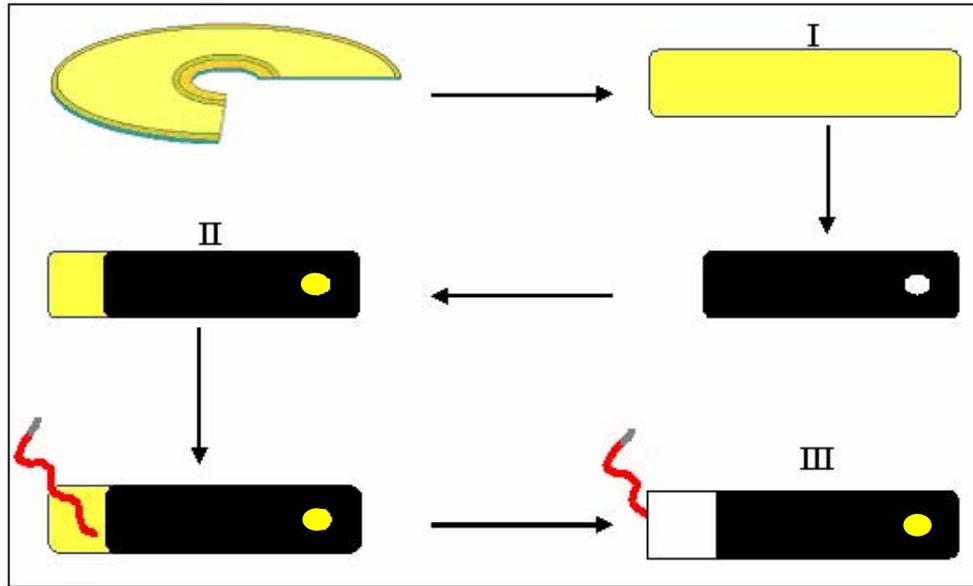


Figura 12: Esquema ilustrativo da confecção de CDtrodos: I) área recortada do CD; II) máscara de tonner prensada à superfície do CD; III) contato elétrico revestido com fita de teflon.

Estes CDtrodos apresentam a possibilidade de serem modificados com tio-compostos, empregando a técnica de SAM, possibilitando a ancoragem de DNA sobre a superfície do transdutor modificado, permitindo a confecção de eletrodos descartáveis para análises de materiais biológicos.

8 JUSTIFICATIVA

A hepatite C é uma infecção virótica praticamente assintomática que pode ser tornar grave e levar a morte, portanto é importante destacar a necessidade do diagnóstico precoce da doença nas primeiras etapas de desenvolvimento, visando as devidas medidas de tratamento. Considerando-se que as terapias atuais são poucos eficazes, associando-se a este fato a inexistência de uma vacina e que há uma enorme escassez de dados referente à doença no Brasil, são de fundamental importância estudos que possam contribuir com a rápida detecção da doença no organismo humano. Dentre estes estudos, a construção de genossensores para diagnóstico de viremia vem alcançando dados satisfatórios e promissores, fazendo uso da atual microtecnologia e da biologia molecular. Este estudo de tese de doutorado vem colaborar com esta premissa, desenvolvendo um genossensor para a detecção de HCV sobre suportes eletródicos alternativos, avaliando processos de

imobilização de DNA e de monitoramento da etapa de hibridização, sendo aplicado em amostras reais de soro sanguíneo.

9 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um genossensor amperométrico para detecção do c-DNA do vírus da hepatite C, com base na imobilização de DNA pelo método de monocamadas auto montadas em eletrodo de ouro e avaliação do monitoramento do processo de hibridização via oxidação da guanina e por interação com compostos indicadores eletroanalíticos.

10 Objetivos Específicos

- i) Construção e caracterização de CDtrodos de ouro.
- ii) Avaliação da molécula de modificação do eletrodo, bem como a avaliação desta modificação;
- iii) Estudos de viabilidade de imobilização de biomoléculas sobre o eletrodo modificado;
- iv) Estudos de caracterização eletroquímica e espectrofotométrica dos indicadores eletroativos;
- v) Avaliação eletroanalítica e espectrofotométrica do DNA;
- vi) Estudos de interação do DNA com compostos indicadores;
- vii) Estudos referentes aos processos redox da guanina;
- viii) Aplicação do(s) indicador(es) escolhido(s), na construção do genossensor;
- ix) Avaliação da viabilidade dos genossensores em padrões;
- x) Aplicação em amostras reais.

Complementando os objetivos específicos da referida tese, buscando intercâmbio internacional e conseqüente aprimoramento profissional foi efetuado um estágio de doutoramento sanduíche de seis meses na Universidade Autônoma de Barcelona-UAB, com o conceituado grupo de pesquisa do Prof Dr Salvador Alegret, sob a supervisão da Prof^a Dr^a Maria Isabel Pividori.

11 EXPERIMENTAL

11.1 Equipamentos

As medidas eletroquímicas foram efetuadas empregando-se sistemas de potenciostato/galvanostato μ AUTOLAB tipo III, interfaciado a um computador, em um sistema convencional de três eletrodos mergulhados em uma célula de 10 mL de volume máximo, com medidas efetuadas a temperatura ambiente. Como eletrodos de trabalhos, foram utilizados eletrodo de ouro convencional, de área geométrica $0,0078 \text{ cm}^2$ e eletrodos de CDs graváveis de ouro. O eletrodo de referência constou de um eletrodo de prata, cloreto de prata, saturado em KCl ($\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{sat}}$) e o contra-eletrodo, um fio de platina. A célula eletroquímica foi colocada em uma gaiola de Faraday, com $25 \times 20 \times 20 \text{ cm}$, construída com placas de circuito impresso, conectada a um sistema de terra próprio para o equipamento.

As medidas espectrofotométricas foram efetuadas com espectrofotômetro Hewlett Packard-8453, interfaciado a um computador, empregando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico cada, com 3000, 400 e 50 μL de volumes. Para obtenção de micrografias de varredura eletrônica foi utilizado o equipamento *scanning electron microscope* (SEM) JEOL-JSM-T330. Para estudos de microscopia de fluorescência foi utilizado um equipamento da marca Leica MZ FLIII fluorescence stereomicroscope. Para etapas de limpeza em ultra-som, utilizou-se um equipamento de marca lunic, modelo USC-700. Empregou-se o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore, para a obtenção de água ultrapura. Para etapas de tratamento quimiométrico de dados foi utilizado o programa MINITAB *statistical software release 13.1*.

11.2 Reagentes

Conjugado enzima horseradish peroxidase (EC 1.11.1.7) biotinizada tipo VI-A, estreptavidina, albumina de soro bovino (BSA), ácido cítrico ($\text{HO}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$), ácido 3-mercaptopropiônico ($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$), DNA de Calf Thymus (D1501), guanosina 5' monofosfato disódio ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_8\text{P}$), azul de meldola ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) e detergente tween 20 foram obtidos da Sigma–Aldrich. Fosfato de potássio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico (Na_2HPO_4), citrato de sódio ($\text{HO}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio (NaCl) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) foram de marca pela Mallinckrodt. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2), acetato de sódio (CH_3COONa), hidróxido de sódio (NaOH), etanol

absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e ftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KOH}_4$) foram fornecidos pela Merck. Ferricianeto de potássio ($\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$), ácido acético (CH_3COOH) da Synth. 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$) foi obtido da Fluka. Ácido nítrico (HNO_3), ácido perclórico (HClO_4), azul de metileno ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}$), obtido pela Acros. Complexos de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ fornecido pelo grupo de pesquisa do Prof Dr Antônio Eduardo Mauro, do Departamento de Química Inorgânica do IQ-UNESP de Araraquara. Oligonucleotídeos 5'-biotinilados de 18-mer (VHC 1: biotina-CGC TCA ATG CCT GGA GAT), foram fornecidos pela Life Technology, Gaithersburg, MD, USA. Sondas de oligonucleotídeos de HCV tipo 1, 18 mer, (5' CGC TCA ATG CCT GGA GAT) e complementar, sonda de captura tiolada (5'SH-CTG GAG ATT TGG GCG TGC-3') e com fluoresceína (5'SH-CTG GAG ATT TGG GCG TGC-FLU) foram obtidas da Bioneer. Alumina para polimento metalográfico (0,05 μ) da Arotec.

As soluções tamponantes foram preparadas com água ultrapura e estocadas em geladeira, a 4 °C, por no máximo 15 dias. As soluções de oligonucleotídeos foram armazenadas a - 20° C.

12 METODOLOGIA

12.1 Eletrodos de Trabalho Utilizados.

A superfície de ouro foi selecionada como substrato eletrodico para a construção dos eletrodos de trabalho, sendo empregados dois tipos distintos: o eletrodo de ouro convencional e eletrodos confeccionados a partir de CDs graváveis de ouro. O eletrodo de ouro convencional foi utilizado no sentido de se obter dados comparativos com os eletrodos construídos com CDs, em etapas de trabalho em que esta comparação se julgou relevante.

A limpeza do eletrodo foi efetuada seguindo procedimentos descritos na literatura por Mendes et al (2004). O eletrodo foi inicialmente polido com alumina 0,05 μm em suspensão, sendo lavado com água destilada. Posteriormente foi submetido a ultrassom, por cinco minutos, em frasco contendo etanol absoluto, sendo novamente lavado com água destilada. Este foi então, colocado em contato com solução piranha (7:3 v/v de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) por dez minutos, sendo novamente lavado com água destilada. O eletrodo mecanicamente limpo foi então ciclado em solução 0,5 mol L^{-1} de H_2SO_4 , entre os potenciais de 0,0 e + 1,5 V, em velocidade de

varredura de 100 mV s^{-1} (vs Ag/AgCl saturado em KCl), até obtenção de comportamento estável do voltamograma (aproximadamente 30 ciclos).

Para a construção dos CDtrodos de ouro foram adquiridas duas marcas de CDs graváveis, sendo: Mitsuo Archive Gold CD-R 100 ®, comprados diretamente do fabricante e MAM-A Inkjet ®, gentilmente cedidos pelo Prof Dr. Lúcio Anges. Os eletrodos foram construídos de acordo com os seguintes procedimentos: primeiramente, a remoção da camada de policarbonato da superfície do CD foi efetuada pela ação de ácido nítrico concentrado, gotejado sobre a mesma, em capela. Esta remoção deu acesso direto à camada metálica de ouro. Logo em seguida, o excesso de ácido foi retirado com água destilada e a superfície do CD foi seca com nitrogênio gasoso. Posteriormente, a área de trabalho foi delimitada sobre esta superfície e o contato elétrico (fio elétrico comum ou lâmina de cobre) foi conectado ao CD, com auxílio de fita de teflon. Uma capa fina de parafilme foi enrolada sobre esta fita.

Dois tipos de CDtrodos foram construídos, sendo estas construções distintas na etapa de delimitação da área de trabalho. Para o primeiro, a área de trabalho foi delimitada por mascaras de tonner desenhadas em computador e posteriormente impressas com impressoras laser, em folhas de papel parafinado e posteriormente prensadas, a uma temperatura de aproximadamente $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sobre a superfície do CD. A área não recoberta pela máscara determinou a superfície eletródica de trabalho. As bordas do CDtrodo foram recobertas com esmalte. Este procedimento foi anteriormente esquematizado na Figura 12. O segundo tipo foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa em biossensores do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. A delimitação da área foi efetuada com fita costumeiramente utilizada em ensaios de galvanoplastia. Com auxílio de um perfurador de rolhas foi feito um orifício fita, o qual, depois de colocada sobre o CD, delimitou a área de trabalho do eletrodo. A Figura 13 representa um esquema ilustrativo da construção do CDtrodo.



Figura 13. Esquema ilustrativo da confecção de CDtrodo de ouro com uso de fita de galvanoplastia.

Para a limpeza e ativação da superfície de ouro dos CDtrodos foram efetuadas ciclagens sucessivas em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , no intervalo de potencial entre 0,0 e + 1,5 V, em velocidade de varredura igual a 100 mV s^{-1} (vs Ag/AgCl saturado em KCl). Para as etapas de caracterização dos eletrodos de trabalho foram efetuados ensaios pelas técnicas eletroanalíticas de voltametria cíclica, bem como pela metodologia de microscopia de varredura eletrônica, objetivando analisar a estrutura de superfície eletródicas.

12.2 Procedimentos de Imobilização Propostos.

Conforme comentado na fundamentação teórica da tese (item 5.2), a superfície de ouro é suscetível aos processos de formação de monocamadas auto montadas de moléculas tioladas. Partindo desta premissa, esta metodologia de trabalho foi proposta para a modificação da superfície do eletrodo. Dois tipos de monocamadas foram inicialmente sugeridas, sendo: uma SAM clássica, com uso de um modificador e posterior ligação de material biológico sobre a mesma e uma SAM construída com material biológico previamente modificado com tiol em uma das extremidades.

Para a etapa clássica, a molécula de ácido mercaptopropiônico (MPA) foi selecionada como molécula base para os estudos de construção da SAM. O MPA têm sido avaliado em diversos trabalhos com SAM, sendo uma alternativa viável para imobilização de moléculas biológicas em substratos de ouro. Possui uma estrutura contendo três carbonos, tendo a molécula de tiol em uma das extremidades e um grupo carboxila na outra, sendo este grupo passível de formação de ligação amida com moléculas de interesse. Desta forma, o tiol é responsável pela

interação do MPA com a superfície de ouro, enquanto que a carboxila se encarrega da ligação com a biomolécula, efetuando assim uma imobilização que é descrita como eficiente, estável, organizada e orientada, o que é fundamental quando se estudam biomoléculas que necessitam interagir com uma molécula alvo, visto que o sítio de ligação se disponibiliza de maneira reprodutiva para toda a camada biológica imobilizada (BIEBRICHER et al, 2004). Inicialmente foram efetuados ensaios de caracterização eletroanalítica do MPA em solução, empregando-se voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, objetivando avaliar os processos de oxidação-redução do mesmo sobre a superfície de ouro. Estes ensaios forneceram dados iniciais para o pré-entendimento da estabilidade da monocamada. Posteriormente, foram propostos os estudos de construção da monocamada, em que se buscou definir as variáveis: tempo de preparo, concentração do reagente modificador e solvente apropriado. A viabilidade da monocamada em imobilizar moléculas biológicas foi avaliada pela imobilização da molécula estreptavidina (STA) sobre a mesma e posterior ligação do conjugado enzima HRP-biotina, seguido do monitoramento da atividade enzimática da peroxidase. Em uma segunda etapa, foi estudada a construção da monocamada via molécula de oligonucleotídeo modificado com tiol em uma das extremidades. Da mesma forma, ensaios de concentração e tempo de preparo foram efetuados para determinar as condições otimizadas. A monocamada assim construída foi avaliada via microscopia de fluorescência. Os dados foram comparados e a metodologia de modificação do eletrodo foi selecionada.

12.3 Estudos de Caracterização e Interação DNA-Compostos Indicadores

Eletroativos.

Dentro dos objetivos propostos neste trabalho consta a avaliação de moléculas passíveis de efetuar o processo de interação com o DNA de fita dupla. Para tanto foram selecionados quatro compostos a serem estudados, sendo: dois complexos metálicos e dois compostos corantes. Os complexos, baseados em cobre como centro metálico, foram sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro, do IQ-UNESP, sendo o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ e o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. As moléculas de azul de metileno e azul de meldola foram selecionadas como compostos corantes, sendo baratos e de fácil obtenção. Para estudos iniciais, o DNA Calf Thymus foi selecionado como fonte de material genético a ser estudado. Inicialmente, o

comportamento espectrofotométrico dos compostos em estudo foi avaliado, sendo posteriormente, efetuados estudos eletroquímicos. Após as etapas de caracterização foram então realizados os estudos de interação entre o DNA nativo e degradado e as referidas moléculas, pelas técnicas anteriormente citadas.

12.4 Avaliação Eletroanalítica da Oxidação da Guanina.

Para efetuar o estudo relativo ao comportamento eletródico da guanina em solução foi utilizada a molécula de guanosina, que se caracteriza como um monômero de DNA que contém a base citada. O objetivo inicial foi avaliar o comportamento eletroquímico da guanosina, visando o entendimento do comportamento da guanina, visto que, embora as estruturas destas duas moléculas se diferenciem, os processos oxidativos referentes às duas moléculas residem no mesmo ponto estrutural, que é o nitrogênio da posição 7 da base.

12.5 Construção e Aplicação dos Genossensores.

Depois de otimizadas as etapas do procedimento de imobilização e possível método de monitoramento do processo de hibridização, os genossensores foram avaliados empregando-se padrões de oligonucleotídeos e em amostras reais. Estas amostras amplificadas foram obtidas a partir de rotina laboratorial, sendo fornecidas inicialmente pelo núcleo de atendimento a comunidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara e posteriormente pelo Laboratório do Grupo de Estudos das Hepatites da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

12.6 Estágio de Doutorado Sanduíche.

No referido estágio foram efetuados estudos de treinamento de construção de eletrodos compósitos, bem como atividades de detecção analítica com a metodologia de partículas magnéticas. Foi proposto um novo eletrodo compósito baseado em grafite e nano partículas de ouro, que foi utilizado para detecção de bactérias. Os dados relativos a esta etapa de trabalho não estão descritos nesta tese, porém, o artigo resultante deste referido estágio encontra-se em apêndice.

13 RESULTADOS

13.1 Estudos Iniciais de Caracterização do CDtrodo.

Inicialmente, a técnica de micrografia de varredura eletrônica foi definida para investigar a superfície de ouro dos CDs graváveis. O CD foi atacado com ácido nítrico, para retirada das camadas poliméricas, como descrito anteriormente. Uma área de 2 cm² foi delimitada por corte com tesoura e o CD assim constituído foi analisado. O CD de ouro, na qual a avaliação foi efetuada, foi o de marca Mitsui®. Observa-se, pela Figura 14, as raias bem definidas da região delimitada do CD, onde as informações digitais são gravadas. Estas raias apresentam, no geral, 0,1 µm de profundidade, com 0,4 µm de largura interna, sendo 1,3 µm de largura da parte superior da raia. As micrografias demonstraram que a superfície do CD apresentou-se bem ordenada.

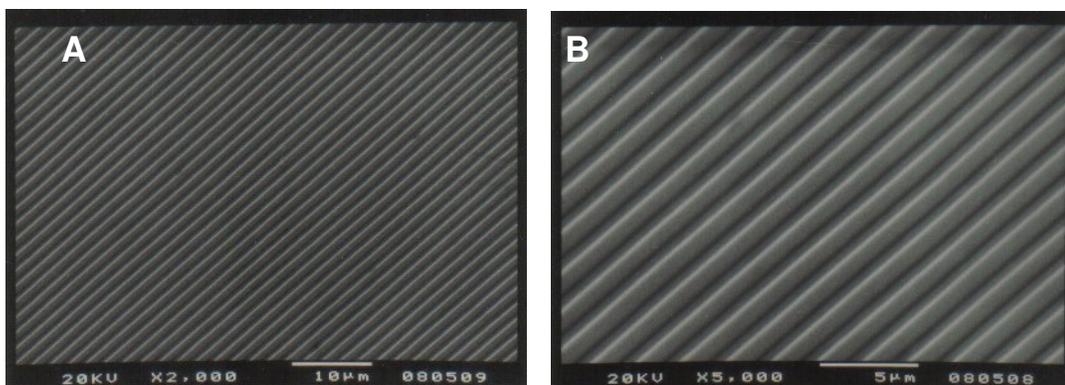


Figura 14. Micrografia de varredura eletrônica da superfície do CD de ouro. A) aumento de 2 mil vezes, B) aumento de 5 mil vezes.

Uma vez investigada a topografia da superfície, as etapas de construção do CDtrodo foram iniciadas. A confecção de eletrodos, a partir de CDs graváveis, no geral, foi simples e rápida, de fácil aprendizado. Deve-se tomar cuidado para evitar o contato das mãos com a superfície do material, visto que as moléculas de gordura contidas na pele podem sujar a superfície de trabalho. Comparando-se os dois tipos de CDtrodos empregados neste trabalho, o CDtrodo construído com fita de galvanoplastia apresentou-se de preparo mais rápido quando comparado com o construído com máscaras de tonner, justamente por esta máscara necessitar de

auxílio de impressora e prensa, com temperatura e pressão controlados e tempo definido, o que não se fez necessário com o CDtrodo de fita.

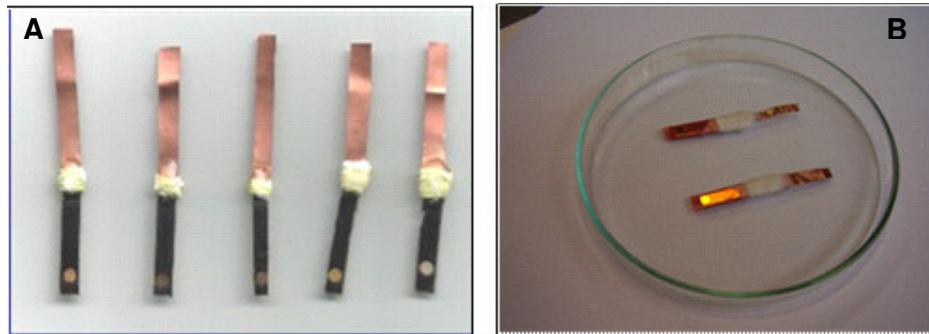


Figura 15. CDtrodos confeccionados pela técnica de A) máscara prensada e por B) fita de galvanoplastia.

A fita de galvanoplastia também se torna adequada para estudos efetuados em meio contendo álcool, visto que, para os CDtrodos de tonners, a máscara foi parcialmente retirada neste meio, modificando a área de trabalho do eletrodo, inviabilizando os estudos. A etapa de limpeza proposta, com uso de ácido sulfúrico foi eficiente, ativando a superfície de ouro. Uma etapa de 15 ciclos consecutivos, na faixa de potencial de 0,0 a + 1,5 V foi suficiente para que os respectivos voltamogramas apresentassem comportamento repetitivo. A Figura 16 apresenta o 15^o ciclo de um processo de limpeza de um determinado CDtrodo preparado, com características representativas de um eletrodo de ouro em meio ácido sulfúrico descrito na literatura, ou seja, picos relativos aos processos de formação e remoção de óxidos sobre a superfície de ouro (CAMPUZANO; PEDRERO; MONTEMAYOR, 2006).

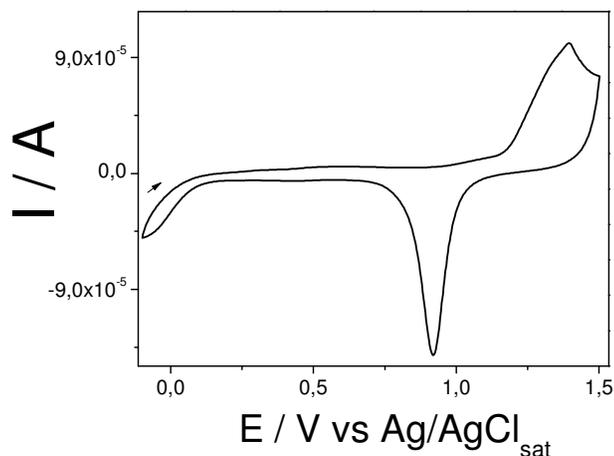


Figura 16. Voltamograma cíclico para CDtrodo de ouro em meio de ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, após 15 ciclos. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$.

A partir da construção e limpeza eficientes do eletrodo de trabalho, buscou-se caracterizar o mesmo frente a um composto padrão, objetivando verificar os processos oxidativos do mesmo sobre o material eletródico. Para tanto, fez-se uso de uma solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. A Figura 17 apresenta o comportamento voltamétrico sobre o CDtrodo de ouro em solução de ácido sulfúrico. Observa-se o par redox característico aos processos de oxidação e redução do composto. A razão de pico apresentada (I_{pa}/I_{pc}) para o sistema foi de 0,99, sendo um valor próximo a unidade e a diferença obtida entre os valores relativos aos potenciais de oxidação e redução foi de 77 mV, indicando processos reversíveis sobre a superfície do eletrodo. Posteriormente, foi efetuado um estudo de variação da velocidade de varredura. Observa-se uma excelente relação de linearidade da dependência da corrente de pico para com a raiz quadrada da velocidade de varredura, o que evidencia transporte de massa governado por difusão.

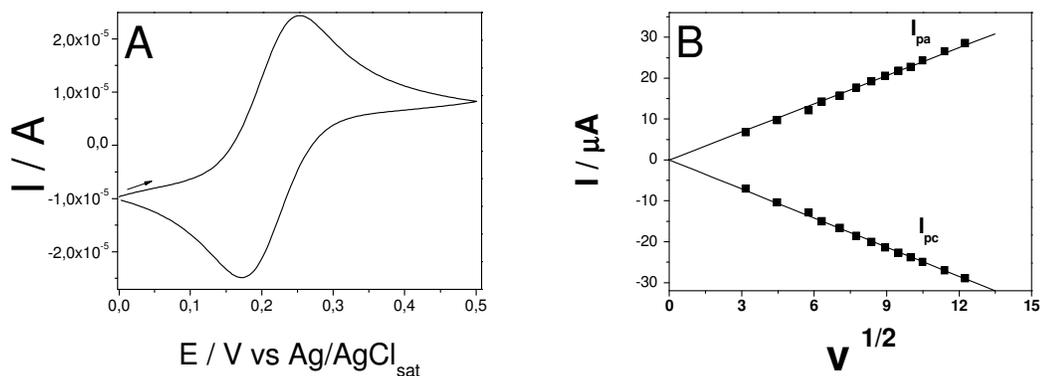


Figura 17. A) Voltmetria cíclica em CDtrodo. $K_4Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,3. B) Relação de linearidade entre a corrente de pico anódica e catódica para com a raiz quadrada da velocidade de varredura.

Observou-se então que os CD apresentaram-se como excelente plataforma para a construção de eletrodos de ouro, visto que o seu comportamento eletroquímico foi semelhante aos eletrodos de ouro convencionais. Para esta primeira etapa de caracterização, os dois tipos de CDtrodos estudados apresentaram os mesmos resultados, indicando que as diferenças efetuadas na construção dos eletrodos não afetaram o desempenho dos mesmos, em termos de reprodutibilidade frente aos processos eletroquímicos efetuados na superfície de ouro do CD.

13.2 Caracterização Eletroquímica da Monocamada de MPA

Inicialmente os estudos de caracterização do comportamento eletroquímico do composto MPA foram efetuados com eletrodo de ouro convencional. A técnica de voltametria cíclica foi primeiramente empregada. Voltamogramas cíclicos foram obtidos em meio de tampão fosfato, pH 7,2. Pela Figura 18 observam-se já no primeiro ciclo voltamétrico, dois picos de oxidação do composto, sendo o primeiro em + 0,72 e o segundo em + 0,89 V. Quando a varredura reversa foi efetuada um pico de redução foi observado a potenciais próximos de + 0,60 V. Para a segunda varredura, o primeiro pico de oxidação anteriormente pronunciado não mais foi formado e apenas o segundo pico é apresentado. Para varreduras subseqüentes, o comportamento evidenciado foi o mesmo obtido para a segunda varredura, apenas com menores valores de intensidade de correntes de pico.

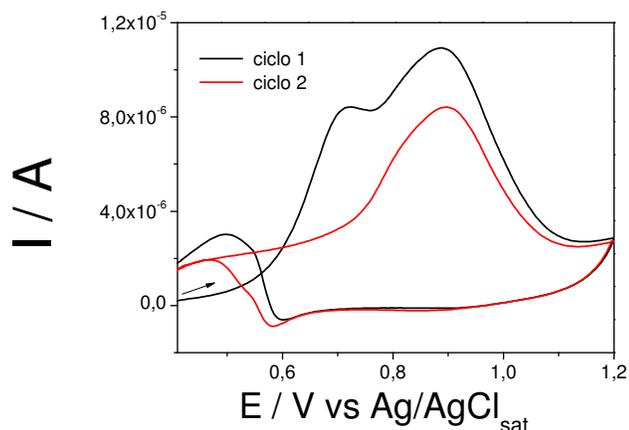


Figura 18. Voltamogramas cíclicos em eletrodo de ouro convencional. Solução $0,03 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido mercaptopropiônico em meio de tampão fosfato pH 7,2.

Estes picos relativos ao MPA foram observados em regiões de potencial muito próximas da oxidação do ouro. Para melhor estudar a oxidação do MPA foram selecionados cinco tampões usualmente empregados em sistemas de detecções biológicas, buscando aquele que melhor separasse esse processos oxidativos citados. Soluções tampão acetato, citrato, citrato-fosfato, fosfato e ftalato-hidróxido de sódio foram selecionados. Todos foram preparados a partir de seus sais, segundo protocolos descritos em *Methods in enzymology* (COLOWICK; KAPLAN, 1955), sendo avaliados em pH 5,7, valor coincidente entre os cinco tampões biológicos, visando minimizar o efeito de diferentes valores de pH no sinal eletroanalítico. O eletrodo de ouro foi então mergulhado em solução tampão e o sinal eletroquímico foi registrado entre os valores de 0,0 a + 1,2 V.

A Figura 19 apresenta o comportamento voltamétrico dos tampões selecionados frente ao eletrodo de ouro. Observa-se que a solução tampão citrato-fosfato desloca a região de formação de óxidos para potenciais mais positivos (+ 0,9 V) quando comparado com as demais soluções. Os tampões apresentaram dois picos característicos, sendo um de pequena intensidade de corrente na região de potencial próxima a + 0,2 V, que pode ser atribuído à oxidação do Au metálico para Au (I) e o segundo pico em regiões que variaram de potenciais de + 0,7 a + 0,9 V, de acordo com o tampão especificado. Este segundo pico, de maior intensidade, é

relativo ao processo de oxidação do Au (I) para Au (II), formando óxidos mais estáveis.

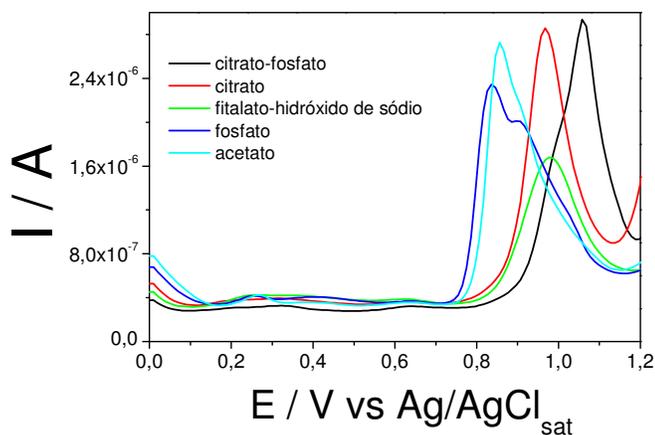


Figura 19. Voltametria de pulso diferencial. Avaliação do comportamento do eletrodo de ouro convencional nas soluções tampão pH 5,7. Acetato, citrato, citrato-fosfato, fosfato e fitalato-hidróxido de sódio. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.

O passo seguinte foi avaliar o comportamento de soluções tampão de citrato-fosfato em diferentes valores de pH, sendo estudada a faixa de 5,0 a 7,0, visto que a literatura cita que as monocamadas com MPA são estáveis nesta faixa de pH. A valores de pH mais ácidos, a formação de óxidos na superfície do eletrodo é deslocada para potenciais mais positivos, enquanto que em valores de pH mais básicos, a formação predomina em potenciais menos positivos. De acordo com o comportamento demonstrado na Figura 20, o pH em torno de 6,0 foi o escolhido para se iniciar os estudos com o eletrodo de ouro.

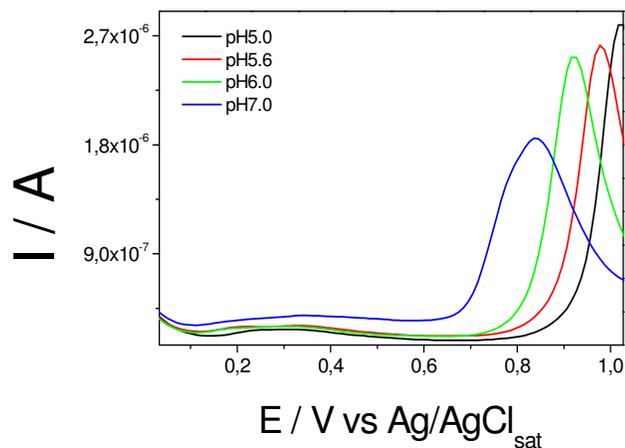


Figura 20. Voltamogramas de pulso diferencial. Eletrodo de ouro em solução tampão citrato-fosfato, em diferentes valores de pH. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.

Segundo Mendes et al. (2004), a baixos valores de pH, a transferência eletrônica aumenta nas monocamadas de ácido mercaptopropiônico em ouro, devido a total protonação do grupamento carboxílico terminal, a valores mais elevados, facilita-se a desprotonação do terminal, carregando o mesmo, negativamente, podendo então, oferecer repulsão para espécies em solução, dificultando a transferência eletrônica. A faixa de pH ótima para se trabalhar com o MPA então, pode ser considerada entre 6,0 e 8,0.

13.2.1 Modificação com MPA

O processo de adsorção da monocamada de alcanotiol pode ser considerado uma adição oxidativa da ligação enxofre-hidrogênio para a superfície do ouro, seguida de eliminação redutiva do hidrogênio. Quando a superfície está limpa, o próton provavelmente termina como uma molécula de H_2 (ULMAN, 1996).



De acordo com a literatura, o uso de etanol leva a formação de uma monocamada bem mais definida e conseqüentemente mais organizada, sendo a superfície modificada de forma mais uniforme, minimizando a formação dos

chamados "buracos" e "ilhas" (FREIRE et al, 2003). Por este motivo, os estudos iniciais de modificação com MPA foram efetuados em meio alcoólico. Buscando definir as condições de tempo de preparo da monocamada e quantidade de álcool na solução trabalho, efetuou-se estudo quimiométrico de planejamento fatorial 2^2 . Foram selecionados os tempos de 2 e 16 horas, bem como 25 e 75% de álcool na solução, como valores máximos e mínimos a serem trabalhados. O eletrodo de ouro convencional foi modificado com monocamada de MPA (10 mmol L^{-1}), adicionando-se o mesmo em solução trabalho pelo tempo pré-estabelecido. Depois de modificado, o eletrodo foi lavado com água destilada e em seguida avaliado pela técnica de voltametria cíclica, em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 mmol L^{-1}). A resposta analisada foi em termos de razão de pico e de diferença de potencial de pico. A Tabela 1 apresenta os valores de resposta obtidos para o estudo de planejamento experimental.

Tabela 1: Dados do planejamento fatorial. Valores de resposta para planejamento fatorial 2^2 .

Ensaio	Etanol (%)	Tempo (h)	ΔE_p (mV)	I_{pa}/I_{pc}
A₁	+	+	125	0,91
A₂	-	-	111	0,85
A₃	+	-	110	0,92
A₄	-	+	92	0,95

Os sinais positivos indicam os níveis altos (maiores valores) e os sinais negativos, os níveis baixos (menores valores) avaliados. A análise dos valores de resposta é facilitada pelos gráficos do pareto e pelo gráfico dos efeitos principais.

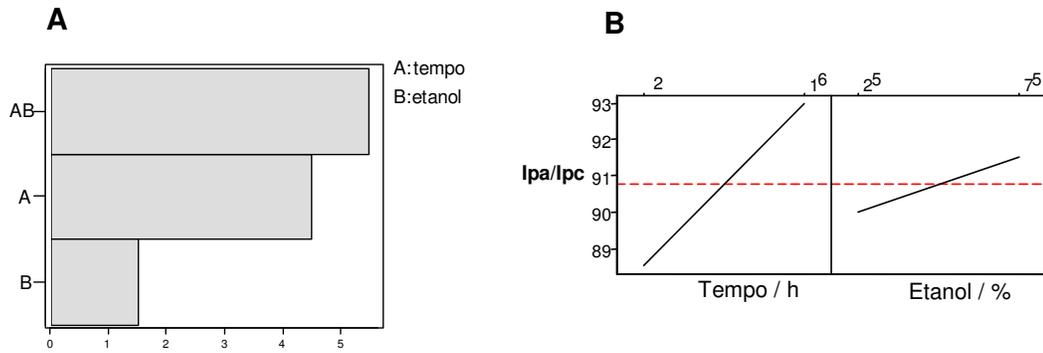


Figura 21. A) Gráfico do Pareto e B) dos efeitos principais entre tempo de incubação e quantidade de etanol. Resposta relativa à razão de pico.

O gráfico do Pareto (Figura 21A) indica que o tempo de preparo da monocamada e a interação entre este tempo e a quantidade de etanol são os efeitos mais importantes. Considerando-se a diferença de potencial de pico, os efeitos principais são: a porcentagem de etanol e a interação entre o tempo e esta porcentagem, como demonstrado na Figura 22. O gráfico dos efeitos principais para a resposta baseada na diferença de potencial de pico indica que a porcentagem de etanol influencia mais que o tempo de preparo da monocamada, comportamento contrário ao apresentado para a razão de pico.

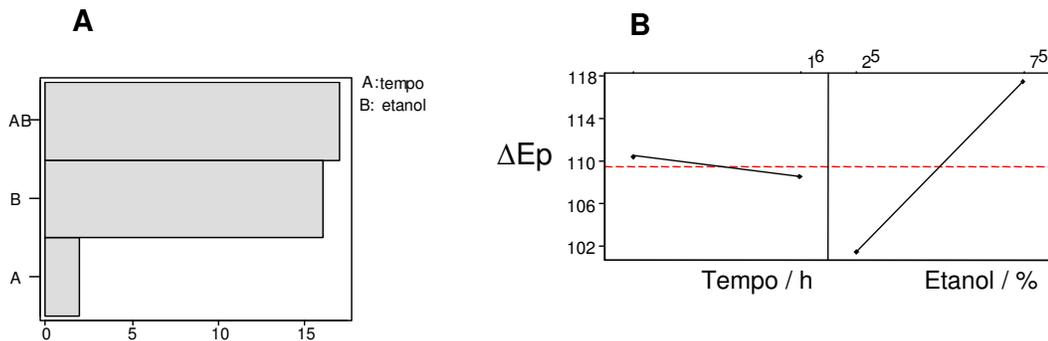


Figura 22 . A) Gráfico de Pareto e B) dos efeitos principais entre tempo de incubação e quantidade de etanol. Resposta relativa à diferença de potencial de pico.

Comparando-se os gráficos relativos as duas respostas (ΔE_p , I_{pa}/I_{pc}), os efeitos são mais pronunciados para a diferença de potenciais de pico. As superfícies de respostas para os dois parâmetros são apresentadas na Figura 23. Comparando-se estes resultados com os gráficos de pareto e dos efeitos principais, pode-se dizer

que um tempo maior de preparo da monocamada, associado a uma baixa concentração de álcool, no meio de preparo, podem levar, tanto a um baixo valor de diferença de potenciais de pico, quanto a um valor mais próximo da unidade, para o parâmetro razão de corrente de pico. Esta condição de trabalho indicou que, possivelmente, a transferência eletrônica sobre a superfície de ouro modificada pelo MPA não estaria sendo alterada. A literatura relata que o tempo de 2 h de incubação do eletrodo de ouro com a solução contendo o ácido mercaptopropiônico é suficiente para a formação da monocamada, porém, um tempo maior, em torno de 16h se faz necessário para o rearranjo e auto organização da monocamada (FREIRE; PESSOA; KUBOTA, 2003).

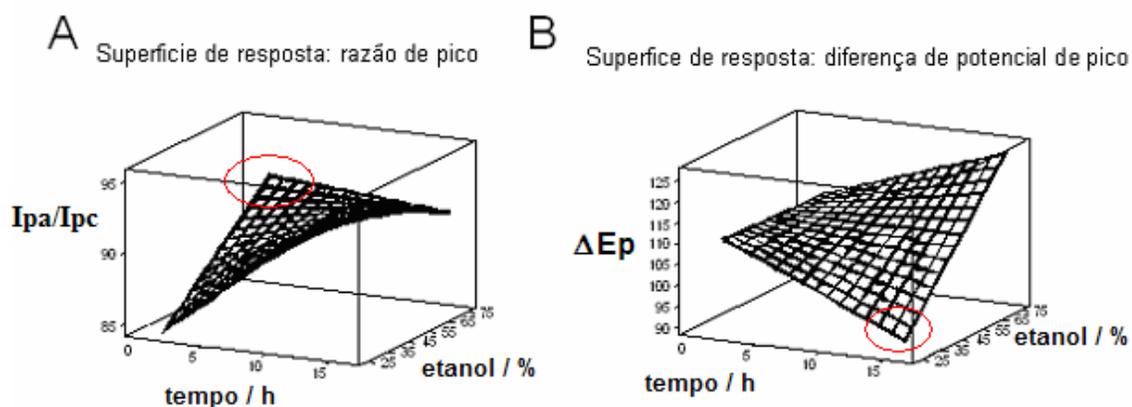


Figura 23. Superfícies de resposta: A) razão de pico e B) diferença de potencial de pico. Valores obtidos para porcentagem de etanol (25 e 75%) e tempo de preparo da monocamada de ácido mercaptopropiônico (2 e 16h).

Após estes estudos, outra modificação da superfície do eletrodo convencional foi efetuada. O eletrodo limpo foi imerso em 150 μL de solução etanólica (25% v/v) de MPA na concentração definida de 10 mmol L^{-1} , a temperatura ambiente, por 16 h (*overnight*). Posteriormente foi lavado com etanol, para remoção de excesso de moléculas fisicamente adsorvidas. Depois de efetuada a modificação, o eletrodo foi avaliado pela técnica de voltametria de pulso diferencial frente à solução tampão citrato-fosfato pH 6.0. Voltamogramas de pulso diferencial foram traçados entre os potenciais de 0,0 e + 1,2 V, objetivando avaliar a estabilidade da mono camada auto montada na superfície do eletrodo.

A Figura 24 apresenta o voltamograma de pulso diferencial do eletrodo de ouro modificado com MPA em tampão. Observa-se um pico de oxidação em aproximadamente + 0,70 V. Campuzano et al. (2006) sugerem que este pico esteja relacionado à oxidação da monocamada de MPA presente na superfície do eletrodo indicando que a intensidade de corrente de pico decresce com sucessivas varreduras, o que evidencia um processo de desinstabilidade irreversível, resultando na remoção da monocamada da superfície do eletrodo. Este comportamento também foi observado no presente estudo.

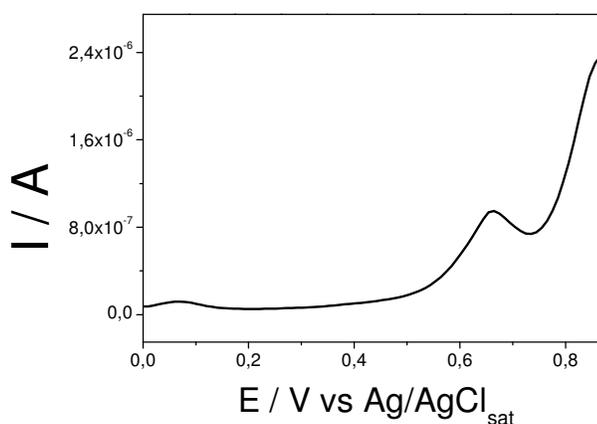


Figura 24. Voltamograma de pulso diferencial. Eletrodo de ouro convencional modificado com ácido mercaptopropiônico em solução tampão citrato-fosfato pH 6.0. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.

13.2.2 Monocamada de MPA sobre o CDtrodo.

Para completar os estudos anteriormente efetuados para a superfície do eletrodo convencional foi proposta uma avaliação microscópica da superfície de ouro do CD modificado com monocamada de ácido mercaptopropiônico. A superfície delimitada (2 cm^2) foi modificada com MPA (10 mmol L^{-1} , 16 h). Dois tipos foram utilizados, sendo o primeiro modificado em solução contendo 25% e o segundo, 75% de etanol. As micrografias foram então efetuadas e estão apresentadas na Figura 25. Estas aqui apresentadas diferem das anteriormente mostradas na Figura 14. Estas diferenças podem indicar que o ouro foi modificado de forma significativa com a monocamada de MPA. Pode-se observar que, quando os CDs foram modificados por distintas soluções etanólicas, evidenciaram distintas micrografias, ou seja,

diferentes superfícies, o que corrobora com a proposta da influencia da quantidade de etanol no meio modificador.

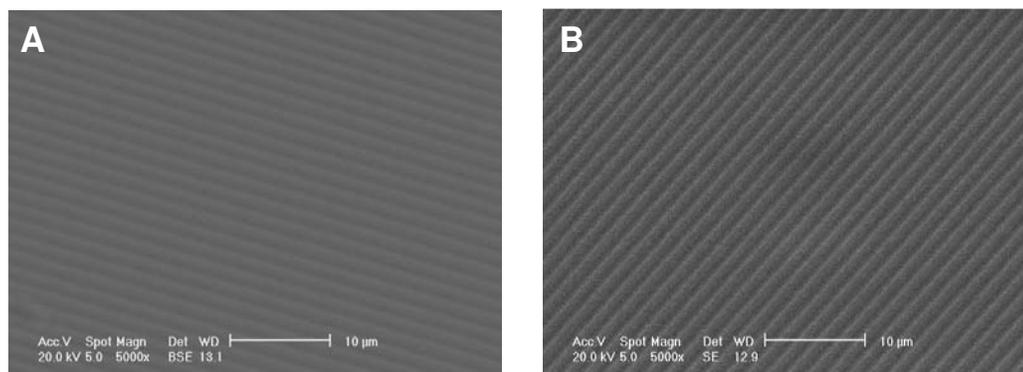


Figura 25. Micrografia de varredura eletrônica da superfície do CD de ouro modificado com monocamada de ácido mercaptopropiônico. Aumento de 5 mil vezes. A) 75% de etanol, B) 25% de etanol.

Partindo deste princípio, o uso de álcool na solução de preparo da monocamada parece realmente distribuir de maneira uniforme as moléculas de MPA sobre a superfície de ouro e a associação do tempo de preparo com a quantidade de álcool em solução pode levar a diferenças nas estruturas da monocamada. No período em que esta etapa de trabalho estava sendo realizada, a confecção dos CDtrodos foi efetuada a partir da metodologia das máscaras de tonner, ou seja, material susceptível ao ataque alcoólico, o que acarretaria em perda da máscara e conseqüente variação da área de trabalho delimitada. Com isto, os ensaios iniciais de modificação sobre o CD, aqui apresentados, foram efetuados em meio aquoso. O CDtrodo foi modificado com o MPA, por gotejamento da solução trabalho na superfície ativa do eletrodo, nas mesmas condições de concentração e tempo trabalhadas anteriormente para o eletrodo convencional, a temperatura ambiente. Foi efetuada em seguida uma análise do comportamento da monocamada sobre a superfície do CDtrodo, em meio de tampão citrato-fosfato pH 6,0, por voltametria de pulso diferencial. De acordo com a Figura 26, pode se perceber um comportamento semelhante ao demonstrado pela monocamada de MPA na superfície de ouro convencional, com pico anódico na região de + 0,70 V, relativo à oxidação da monocamada de MPA.

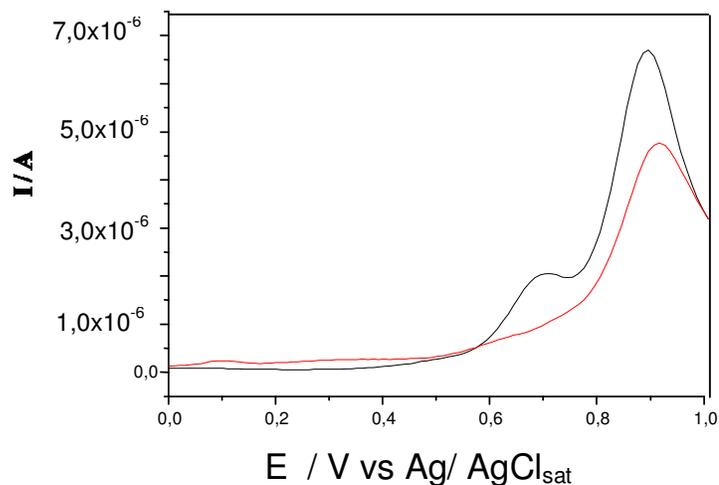


Figura 26. Voltamograma de pulso diferencial em solução tampão citrato-fosfato pH 6,0. (—) CDtrodo de ouro. (—) CDtrodo modificado com ácido mercaptopropiônico. $V = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 25 mV.

A Figura 27 apresentam voltamogramas cíclicos do CDtrodo modificado com MPA, em solução tampão citrato-fosfato pH 6,0. O gráfico apresentou pico relativo à oxidação da monocamada em valores próximos + 0,70 V, concordante com os dados obtidos anteriormente e para a varredura seguinte, esse pico não foi detectado, indicando que a oxidação da monocamada é um processo irreversível, como citado anteriormente.

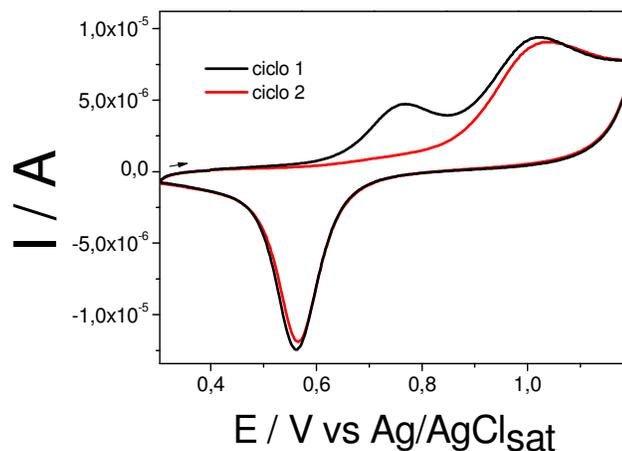


Figura 27. Voltamograma cíclico em tampão citrato-fosfato pH 6,0. CDtrodo de ouro modificado com ácido mercaptopropiônico. (—) primeira varredura, (—) segunda varredura.

13.2.3 Estudo da Área de Cobertura.

Uma vez caracterizada a monocamada de MPA sobre a superfície de ouro, buscou-se efetuar um estudo para avaliar o grau de cobertura desta monocamada, ou seja, quanto da superfície de ouro o MPA poderia estar recobrindo. Uma cobertura eficiente é estabelecida pelo compromisso entre a concentração do modificador, o tempo de preparo da monocamada e o solvente utilizado para este propósito. Campuzano et al. (2006) estudaram o grau de cobertura de monocamadas de MPA empregando voltametria cíclica. Foi evidenciado um pico característico da monocamada em potenciais próximos de + 1,0 V, em meio de ácido sulfúrico. A porcentagem de cobertura foi calculada em 40%, para um tempo de 15 h de modificação em meio contendo 24% de álcool etílico. Porém, seus dados, quando efetuados estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica, indicaram um grau de 90% de cobertura.

A informação da quantidade de material sobre o eletrodo é de suma importância para a investigação, visto que a superfície modificada não deve ser totalmente recoberta pela monocamada, quando se pensa em estudos para construção de biossensores, pois esta modificação excessiva pode até passivar a superfície do eletrodo. Partindo destas informações, buscou-se neste estudo um tempo menor de preparo da monocamada, objetivando a modificação parcial da superfície do ouro.

O CDtrodo limpo foi então modificado como segue: ao CDtrodo, adicionou-se 50 μL de solução 10 mmol L^{-1} de ácido mercaptopropiônico e o conjunto foi deixado em repouso por 2h, a temperatura ambiente. Posteriormente o eletrodo foi lavado com água destilada. A técnica de voltametria cíclica foi então utilizada para avaliar o grau de cobertura. Primeiramente o CDtrodo limpo foi mergulhado em solução de H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , previamente deaerada (nitrogênio, 5 min) e os voltamogramas cíclicos foram então registrados nestas condições. O CDtrodo foi então lavado e posteriormente modificado como descrito anteriormente, sendo assim, novamente avaliado pela técnica de voltametria cíclica em meio de ácido sulfúrico.

A Figura 28 apresenta os voltamogramas cíclicos em meio de ácido sulfúrico, relativos ao CDtrodo limpo e modificado com MPA. Observa-se, para ambos, voltamogramas com comportamentos característicos de eletrodos de ouro

em meio de ácido sulfúrico, com picos anódicos relativos à região de formação dos óxidos de ouro (acima de + 0,90 V) e picos catódicos relativos à redução desta camada de óxidos, em torno de + 0,70 V. É possível observar que o voltamograma do CDtrodo modificado com MPA apresentou-se com picos menores que os relativos ao eletrodo sem modificação. Isto se deve por conta da monocamada aderida à superfície de ouro, que ocupou uma área específica da superfície do CD, o que levou então, a uma menor formação de óxidos, por conta de uma menor área agora disponível para estes processos.

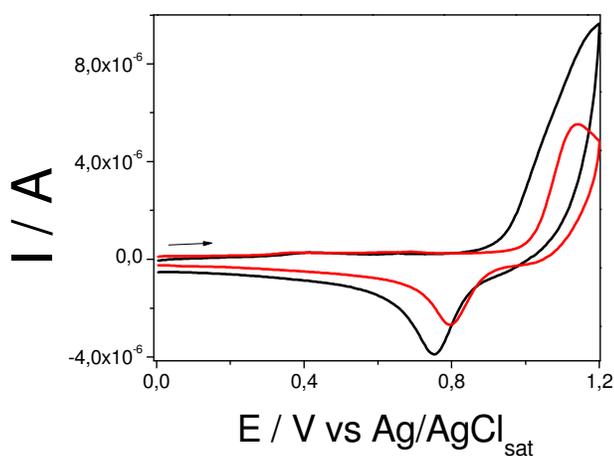


Figura 28. Voltamogramas cíclicos em meio de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, traçado com (—) CDtrodo e (—) CDtrodo/MPA.

A quantidade de material depositado nesta superfície de ouro pode ser estimada pela razão entre a corrente de pico, relativo ao processo de redução dos óxidos formados, antes e após a modificação (CAMPUZANO et al., 2006). A integração desta corrente obtida fornece os dados de tempo do processo eletroquímico descrito e para estas condições, estes dados fornecem a carga antes e após a modificação da superfície. A razão entre estas pode fornecer a quantidade de material depositado na modificação da superfície. O presente estudo evidenciou uma estimativa em torno de 35% de cobertura da superfície do CDtrodo pelo ácido mercaptopropiônico.

O processo voltamétrico efetuado para determinar o grau de cobertura implica em ciclos que podem estar deteriorando parte da monocamada, então, possivelmente este dado para a cobertura com MPA pode estar subestimado,

podendo chegar a valores em torno de 50%. Para estudos que fazem uso da técnica de monocamadas como ponte de ligação para moléculas biológicas sobre superfície de ouro, este grau de cobertura aqui obtido foi considerado satisfatório, visto que a total modificação pode implicar na inativação da superfície eletródica.

13.2.4 Estudo da Viabilidade da Monocamada para Imobilização de Biomoléculas.

Uma vez que a modificação na superfície de ouro foi caracterizada, objetivou-se avaliar a capacidade desta monocamada de MPA em imobilizar moléculas biológicas. Efetuou-se, então, um estudo com a enzima peroxidase imobilizada sobre o ouro do CD. Esta enzima vem sendo bastante estudada na literatura, para a construção de biossensores e o grupo de eletroanalítica do instituto de química da UNESP de Araraquara também vem aplicando a enzima em suas atividades de pesquisa. Estudos apresentados na literatura relatam a imobilização de enzimas sobre monocamadas, porém, embora esta monocamada seja organizada, isto não indica necessariamente que a enzima seja imobilizada sempre com a mesma orientação do sítio ativo, visto que a ligação amida formada entre o MPA e a enzima se dá por conta dos resíduos de aminoácidos em sua estrutura, que por sua vez estão dispostos por toda a superfície espacial da molécula. Partindo deste princípio, buscou-se a metodologia de ligação covalente entre biotina e avidina, já comentada anteriormente na revisão bibliográfica (item 5.1). Além de ser uma técnica bem difundida na literatura, também vem sendo estudada pelo grupo de eletroanalítica do IQ/UNESP (PIDORI; MERKOÇI; ALEGRET, 2000; KURAMITZ et al., 2003; WILLIAMS, 2003, RICCARDI et al., 2006).

Pretendeu-se abordar uma metodologia de imobilização via formação de monocamada de MPA, acoplado-se moléculas de estreptavidina sobre a monocamada, objetivando-se ligar posteriormente o conjugado molecular peroxidase-biotinilada. Esta proposta pode viabilizar uma imobilização mais orientada do sítio ativo da enzima, visto que a ligação entre a estreptavidina e a biotina ocorre também, de forma orientada (Figura 29)(BIEBRICHER, 2004). O monitoramento da atividade enzimática via substratos, como o peróxido de hidrogênio, pode ser efetuado, o que pode auxiliar no entendimento do processo de imobilização proposto. Uma vez que o comportamento desta enzima já está bem

estabelecido na literatura, esta imobilização pode evidenciar se a mesma pode ser viável para a ligação de material genético sobre a superfície do eletrodo de ouro.

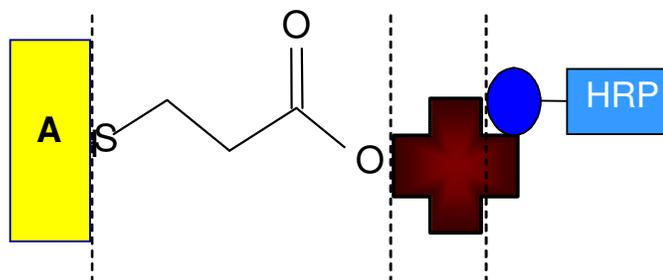


Figura 29. Esquema estrutural de imobilização da enzima HRP, via metodologia (+) esteptavidina (●) biotina, sobre monocamada auto organizada de ácido mercaptopropiônico.

A modificação foi efetuada com MPA 10 mmol L^{-1} em solução aquosa, por gotejamento sobre a superfície eletroativa do CDtrodo. Esta solução foi deixada em contato com o ouro por 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, foi efetuada a ligação da STA na monocamada, fazendo uso de carbodiimida (EDC), reagente específico para ativação de grupos funcionais. Foi adicionada solução de STA ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$), contendo 6 mmol L^{-1} de EDC, na superfície do CD/MPA. O conjunto foi deixado em repouso por uma hora, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Logo após, sobre o CDtrodo previamente modificado foi adicionada solução de HRP biotilada, na concentração de 132 U/eletrodo e deixado em repouso durante 30 min, a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Entre todas as etapas de modificação do eletrodo foram efetuadas lavagens com solução tampão fosfato pH 7,0, objetivando-se retirar excesso de material adsorvido do meio.

A Figura 30 compara o comportamento do CDtrodo sem modificação com o modificado com HRP, em solução tampão fosfato pH 7,0, em presença de peróxido de hidrogênio, na faixa de potencial entre $-0,20$ a $+0,50 \text{ V}$. Observa-se uma mudança no comportamento voltamétrico após a imobilização da HRP, pela presença de picos relativos a processos redox, sendo $E_{pa} = +0,21 \text{ V}$ e $E_{pc} = +0,10 \text{ V}$, o que sugere que a modificação foi efetuada de forma adequada, visto que o mesmo sinal não foi inicialmente apresentado para o CDtrodo ou para o CDtrodo/MPA. De acordo com a literatura, quando imobilizada, a HRP pode efetuar

a transferência direta de elétrons com o eletrodo, através do mecanismo entre o centro ativo da enzima e o substrato doador de elétrons ao qual ela está imobilizada. O eletrodo substitui o substrato doador de elétrons em um ciclo comum da reação do peróxido. Enzimas imobilizadas no eletrodo podem ser oxidadas pelo peróxido e então reduzidas por elétrons provenientes do eletrodo (FREIRE et al., 2003).

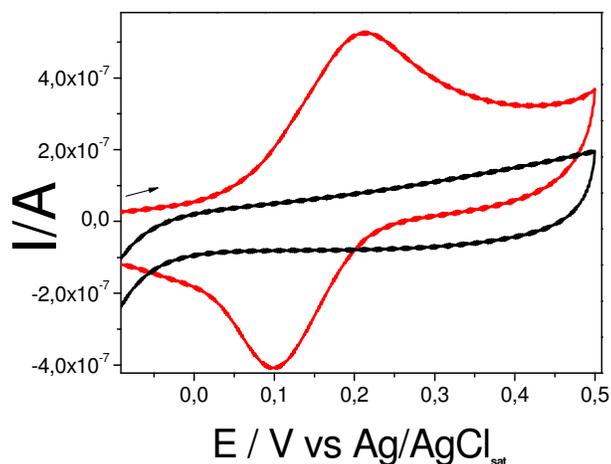
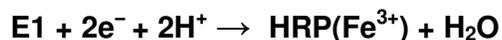


Figura 30. Voltamogramas cíclicos em solução tampão fosfato pH 7,0, traçado com (—) CDtrodo limpo e com (—) CDtrodo modificado com HRP em presença de peróxido de hidrogênio.

O mecanismo reacional geral de detecção eletroanalítica do H_2O_2 em eletrodos modificados com HRP pode ser descrito por duas reações, sendo:



HRP (Fe^{3+}) denota o estado de oxidação inicial da HRP imobilizada na superfície do eletrodo. E1 é o composto intermediário que representa a enzima no estado de oxidação +5. A primeira reação envolve transferência de dois elétrons do grupo prostético ferriheme da HRP pelo H_2O_2 . A segunda reação representa a transferência eletrônica entre o eletrodo e a forma oxidada da HRP. No entanto, em geral, a transferência eletrônica direta entre materiais eletródicos comuns e esta enzima é um processo lento, sendo a transferência eletrônica mediada é mais eficiente na redução bioeletrocatalítica de peróxido em eletrodos modificados com

HRP. Desta forma, um ensaio mediado foi proposto, sendo utilizado o ácido 5-aminosalicílico (5-ASA) como mediador. Este tem sido amplamente estudado pelo grupo de pesquisa em biossensores do IQ UNESP de Araraquara, sendo a redução do complexo formado entre o sítio catalítico da enzima e o mediador, o princípio do processo de monitoramento na reação em estudo (ESHKENAZI et al., 2000; ULIANA, 2009). O eletrodo foi modificado com citado anteriormente e o monitoramento da concentração de peróxido foi efetuado pela técnica de amperometria a potencial constante, sendo este potencial de -0,050 V (ULIANA, 2009). A Figura 31 apresenta a curva analítica para a variação da concentração de peróxido de hidrogênio. Observa-se uma linearidade de sinal de corrente com relação ao aumento da concentração de peróxido no meio contendo o mediador 5-ASA (concentração fixa em $0,005 \text{ mol L}^{-1}$).

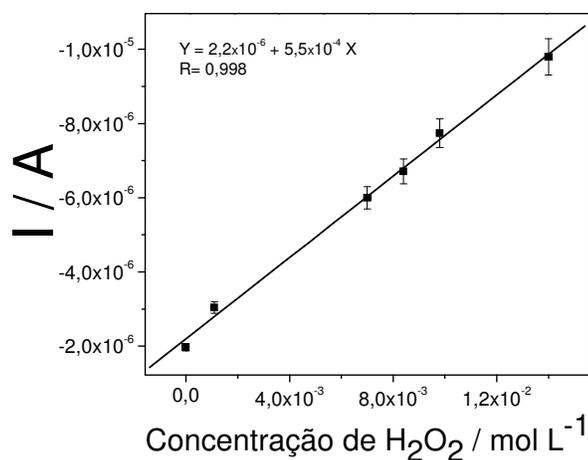


Figura 31. Curva analítica para o monitoramento da concentração de peróxido de hidrogênio em CDtrodo modificado com enzima HRP, utilizando-se o ácido 5-aminosalicílico como mediador eletroanalítico.

O procedimento de imobilização da enzima HRP proposto pela formação de monocamadas de ácido mercaptopropiônico evidenciou que a enzima foi satisfatoriamente imobilizada de forma orientada sobre a superfície do CDtrodo de ouro, mantendo sua atividade catalítica, de acordo com os dados obtidos para as medidas de transferência eletrônica direta e mediada. Assim, evidencia-se que esta metodologia de imobilização pode ser aplicada para a imobilização de sondas específicas de DNA biotilado sobre a superfície de ouro do CDtrodo.

13.3 Estudos Iniciais com Sonda de HCV Tiolada.

Esta etapa de trabalho objetivou avaliar o uso de sondas de oligonucleotídeos modificadas com grupamentos tióis para a construção de monocamadas de oligonucleotídeos sobre a superfície do eletrodo de ouro. Para tanto, foi adquirida uma sonda de seqüência específica do vírus da hepatite C do genótipo 1, modificada por uma molécula de hexanotiol (HS-5' CGC TCA ATG CCT GGA GAT 3'). Inicialmente buscou-se estimar e avaliar o grau de cobertura da superfície pela monocamada proposta. O estudo foi baseado na variação de voltamogramas cíclicos obtidos em solução $K_4Fe(CN)_6$, antes e após a modificação com a monocamada de oligotiol. Esta modificação foi efetuada gotejando-se solução de oligotiol (em concentração definida) sobre a área de trabalho do eletrodo. Este eletrodo foi então colocado em conjunto de placas de Petri, em tempos determinados. Etapas de lavagem foram efetuadas com tampão fosfato pH 7,2, por 3 min sob agitação constante. O objetivo do estudo foi avaliar a porcentagem de cobertura da superfície de ouro a partir dos dados de concentração da sonda e o tempo de preparo da monocamada. As concentrações de 0,5 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HS-DNA HCV 1 e os tempos de 30, 60, 90 e 120 min foram definidos para os estudos iniciais. A porcentagem de cobertura da superfície foi obtida pela razão entre a área do segundo voltamograma (após modificação - A_2) e a área do primeiro voltamograma obtido (antes da modificação - A_1), de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Cobertura (\%)} = [(A_2/A_1) - 1] \times 100$$

A Figura 32 apresenta o gráfico dos voltamogramas cíclicos para a modificação com 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HS-DNA HCV 1 e o tempo de 30 min, no qual foi obtido o valor de 32% de cobertura. O gráfico de barras apresentado na Figura 33 compara os resultados obtidos para o estudo, nos tempos e concentrações avaliadas.

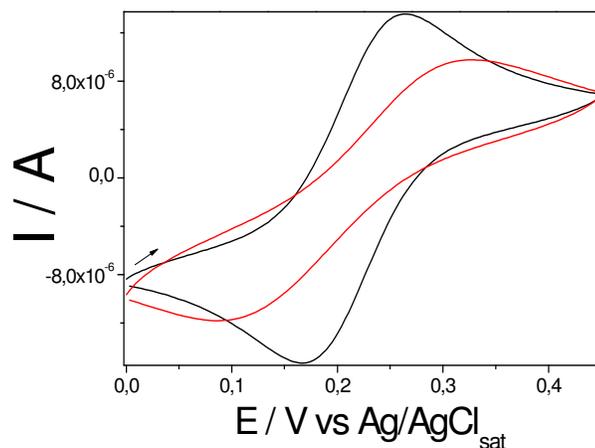


Figura 32. Voltamogramas cíclicos para $K_4Fe(CN)_6$ em ouro, (—) antes e (—) após a modificação com monocamada de HS-DNA HCV 1 ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 30 min).

No geral, foram observadas duas condições características a serem consideradas: i) para valores menores de tempo, os graus de cobertura da superfície, tanto para a concentração de $1,0$ quanto para $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram aproximados, indicando que as concentrações trabalhadas não foram fatores determinantes na porcentagem de área coberta. Pode-se enfatizar que a porcentagem de cobertura não apresentou dependência com a concentração do oligonucleotídeo para o tempo de 30 min de modificação. ii) Para valores de tempo maiores, a concentração tornou-se um parâmetro muito importante para definir o grau de cobertura da superfície de ouro. Tanto para 90, quanto para 120 min, as modificações levaram a valores de 86% de cobertura. Uma porcentagem de cobertura em torno de 30 a 40 % tem sido considerada boa para a construção de monocamadas em biossensores eletroanalíticos, visto que uma cobertura de grau maior, como a de 85%, por exemplo, pode ser fator limitante para a análise, no sentido de que esta modificação pode dificultar os processos faradáicos sobre a superfície do eletrodo de trabalho, bem como limitar os processos de hibridização da fita dupla, pelo impedimento estérico. Estas duas condições foram selecionadas para estudos futuros (Figura 33).

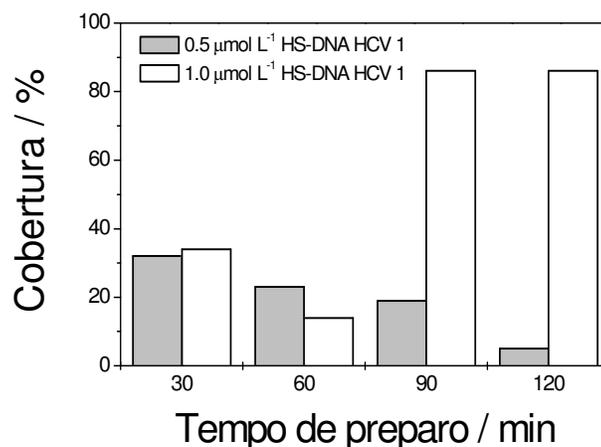


Figura 33. Porcentagem de cobertura da superfície de ouro em função do tempo e da concentração do modificador HS-DNA HCV 1.

Para melhor entendimento da distribuição espacial das moléculas de oligotiol sobre a superfície do eletrodo foi proposta uma avaliação via investigação pela metodologia de microscopia de fluorescência, objetivando caracterizar a camada de material genético imobilizada sobre a mesma. Para tanto foi adquirida uma outra sonda tiolada, similar a trabalhada anteriormente, porém, com uma modificação na extremidade 3', que foi constituída de uma molécula de fluoresceína (FLU). A molécula de tiol, na extremidade 5' foi responsável pela adsorção do DNA no eletrodo enquanto a molécula de fluoresceína (3') foi excitada e seu sinal de fluorescência foi monitorado. O procedimento de imobilização foi efetuado em solução tampão fosfato, com $1,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sonda, por duas horas a 42°C . Duas etapas de lavagem foram efetuadas, com tampão, por 10 min, a 42°C . As Três condições específicas foram avaliadas, sendo: A) CD limpo, sem modificação, mergulhado em solução tampão, para controle; B) CD limpo, sem modificação, mergulhado em solução contendo somente fluoresceína, na concentração de $10,4 \text{ mg L}^{-1}$, para ensaio em branco e C) CD modificado com a sonda de trabalho. A Figura 34 apresenta as microscopias de fluorescência para as condições citadas.

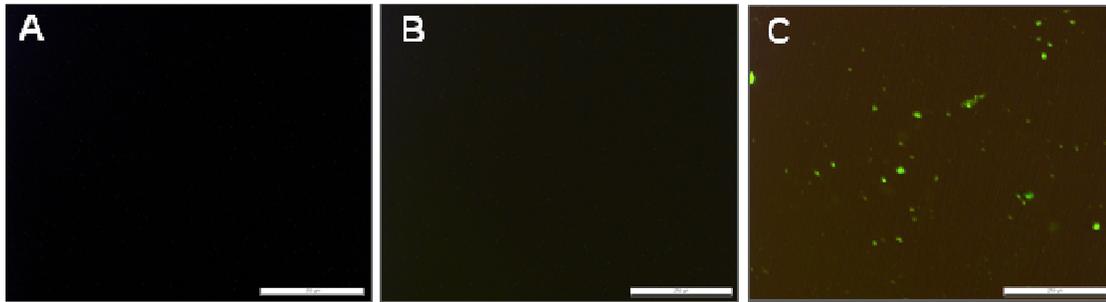


Figura 34. Microscopia de fluorescência das superfícies de ouro. A) CD em tampão fosfato, B) CD com fluoresceína e C) CD modificado com HS-oligo HCV-FLU.

Para a condição do ensaio controle (A), nenhuma fluorescência foi obtida, indicando que o meio não influenciou no sinal analítico. Para o ensaio em branco (B), que foi efetuado em meio de fluoresceína, também nenhuma fluorescência foi obtida, o que indicou que as moléculas de fluoresceína não adsorveram sobre a superfície do CD. Por fim, para o ensaio com sonda de HS-oligo-FLU, foi observado uma distribuição de fluorescência por toda a superfície do CD, sugerindo que o ensaio foi eficiente para a modificação do CD com monocamada tiolada.

O que se pode ressaltar é que pontos específicos, de maior intensidade fluorescente foram obtidos para o estudo, o que indica que pode estar havendo a formação das chamadas "ilhas", que podem se formar quando se efetuam estudos com monocamadas, por conta das forças de atração entre as moléculas modificadoras (Figura 35). Para evitar essa formação de ilhas, a solução trabalho empregada na qual o eletrodo é modificado pode conter uma porcentagem de álcool etílico, o que distribui de modo mais uniforme as moléculas pela superfície do eletrodo, como já observado em resultados anteriormente apresentados. Uma alternativa seria o uso dos chamados espaçadores, como o 11-mercaptop-1-undecanol (MCU), que também são moléculas tioladas, mas que tem por função ocupar os espaços entre o DNA tiolado, distribuindo melhor a monocamada de material genético. Estes, porém, também podem representar um aumento no grau de cobertura da superfície do CD (PEETERS et al., 2008).

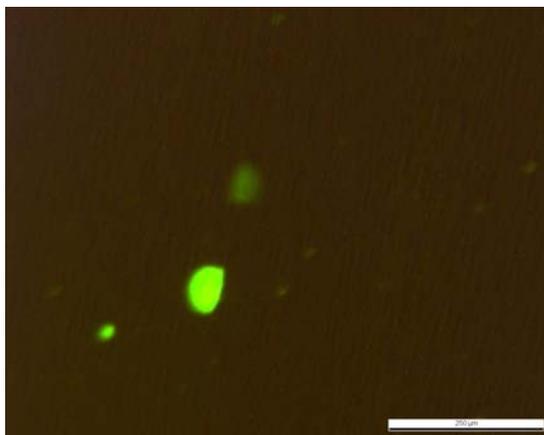


Figura 35. Sinal de fluorescência de sonda HS-oligo HCV-FLU sobre CD. Formação de aglomerados.

Comparando-se esta etapa de construção da monocamada, com a etapa anterior efetivada com MPA, conclui-se que ambas as metodologias são eficazes para a modificação do eletrodo de CD de ouro. A etapa efetuada com HS-DNA corrobora com uma imobilização de material genético de forma mais eficiente, no sentido em que cada molécula que modificar a superfície do eletrodo conta com uma molécula de oligonucleotídeo, o que não fica evidente para a modificação com MPA, visto que nem toda molécula de MPA estará necessariamente ligada a uma de DNA, por exemplo, com isto, um gasto menor de reagente pode ser alcançado com a modificação por sondas tioladas. Deve-se enfatizar que se utiliza uma única molécula no processo, evitando perdas de material e minimizando interferentes, pelo fato da metodologia ser efetuada em uma única etapa.

13.4 Estudo Eletroanalítico da Molécula de Guanosina.

A guanina é uma das duas bases purinas presentes na estrutura básica dos ácidos nucleicos, sendo, do ponto de vista eletroquímico, a que apresenta menor valor de potencial de redox dentre as quatro bases nitrogenadas que compõe o DNA (STEENKEN, 1989). Devido a este fato, acredita-se que ela seja a chave para o entendimento dos processos de oxidação do DNA, por vários tipos de agentes oxidantes e radicais livres e seu estudo pode fornecer informações importantes à cerca dos mecanismos responsáveis pelos danos causados na molécula, bem como na localização específica deste dano.

Uma das propostas iniciais de avaliação da confirmação do processo de hibridização sofrido pelo material genético imobilizado sobre a superfície do genossensor foi o monitoramento do sinal de oxidação da base nitrogenada guanina contida neste material. A intensidade de sinal de corrente relativa aos processos de oxidação da base guanina pode ser obtida de forma distinta para o DNA de fita simples em relação ao material de fita dupla (hibridizado), uma vez que estes materiais genéticos apresentariam também em quantidades diferentes de bases, levando assim, a sinais eletroanalíticos também distintos. Esta diferença entre as intensidades de corrente pode ser utilizada para confirmar se o processo de hibridização ocorreu ou não ocorreu sobre a superfície eletródica, indicando, conseqüentemente, um sinal positivo/negativo, que pode ser utilizado para construção de biossensores de diagnóstico. Para esta etapa de investigação também se fez uso da molécula de guanosina monofosfato.

13.4.1 Estudo da Guanosina em Solução

A Figura 36 apresenta a fórmula estrutural da guanosina. A oxidação eletroquímica da guanosina leva à formação da 8-hidroxiguanosina e tem sido efetuada em diferentes superfícies eletródicas, sendo a de carbono a mais utilizada, nas formas de carbono/grafite, grafite pirolítico, carbono vítreo e pasta de carbono. Os processos oxidativos da molécula de guanosina, como para a guanina, são altamente dependentes da natureza do agente oxidante, bem como do material que constitui o eletrodo.

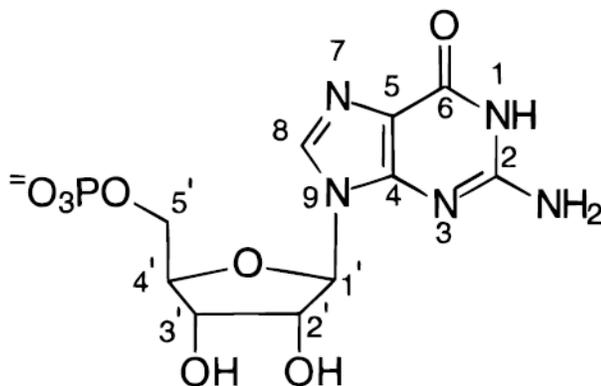


Figura 36. Fórmula estrutural do ânion molecular guanosina monofosfato.

A troca de carbono/grafite para eletrodos metálicos afeta os caminhos e a cinética de oxidação desta base nitrogenada, bem como os processos de adsorção nestas superfícies (FERAPONTOVA, 2004). Inicialmente, o CDtrodo foi limpo pelo protocolo estabelecido em etapas descritas anteriormente. Primeiro, objetivou-se uma avaliação do comportamento da guanosina em tampão fosfato. Como primeira etapa de avaliação foi efetuada uma varredura por voltametria cíclica, do CDtrodo limpo em solução de tampão fosfato pH 7,1, seguida da obtenção do voltamograma da guanosina em meio do mesmo eletrólito. Pela Figura 37 pode se observar os voltamogramas obtidos para o CDtrodo e para a guanosina. Constatou-se que o sinal de corrente relativo à oxidação da guanosina encontrou-se a valores próximos do potencial de + 1,0 V, como descrito na literatura. O pico apresentou-se de forma alargada, o que sugere complicações cinéticas no processo de oxidação da molécula.

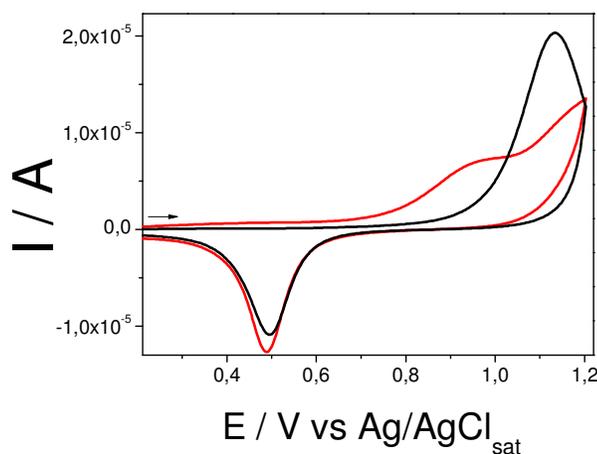


Figura 37. Voltametria cíclica para CDtrodo de ouro. (—) Tampão fosfato pH 7,1 e (—) guanosina monofosfato $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em pH 7,1.

Foi então avaliado o grau de adsorção da guanosina sobre a superfície de ouro, efetuando-se varredura cíclica com ferrocianeto de potássio, antes e após ciclagem em solução contendo guanosina. Como demonstrado na Figura 38, o comportamento eletroquímico do composto em estudo não foi alterado, apenas uma pequena variação no sinal de corrente catódica foi observada.

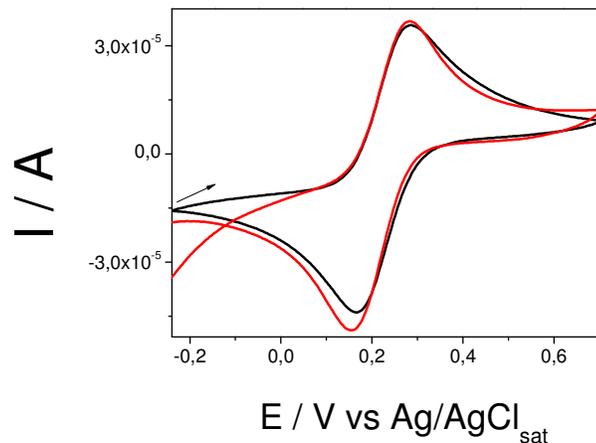


Figura 38. Voltametria cíclica em meio de tampão fosfato pH 7,2. Ferrocianeto de potássio $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$, (—) antes e (—) após ciclagem em solução de guanosina monofosfato.

Este resultado indica que os processos redox descritos pela molécula de guanosina, avaliados pela técnica de voltametria cíclica, não afetaram de forma considerável a superfície do eletrodo de ouro, no que diz respeito à inativação desta superfície, nas condições pré-determinadas.

Considerando-se o fato de que se trabalha com seqüências curtas de oligonucleotídeos imobilizadas sobre a superfície do genossensor eletroquímico, este material genético é constituído de um número reduzido de moléculas de guanina, o que infere na necessidade de uso de uma técnica eletroquímica sensível para obtenção de baixos sinais de corrente. Partindo desta premissa, escolheu-se a técnica de voltametria de pulso diferencial para dar continuidade à investigação dos processos oxidativos da molécula de guanosina. Os procedimentos iniciais foram tomados, como anteriormente descritos, sendo primeiramente obtido o voltamograma de pulso diferencial para o eletrólito, seguido do voltamograma para a guanosina em eletrólito suporte. A Figura 39 apresenta os resultados, sendo o pico de oxidação da molécula de guanosina foi observado em potencial de + 1,1 V. É importante enfatizar que este pico foi observado entre dois picos de oxidação de ouro no referido eletrólito (tampão fosfato pH 7,1).

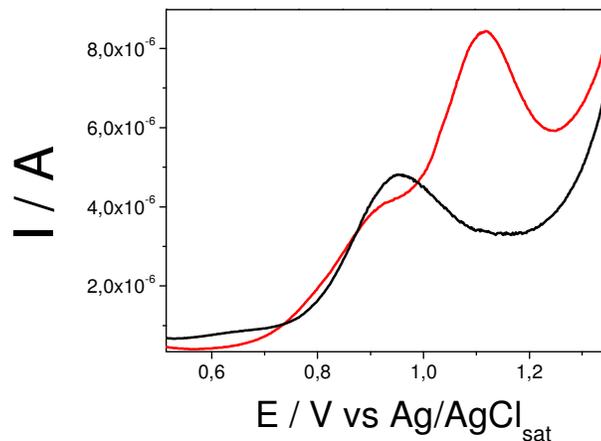


Figura 39. Voltametria de pulso diferencial em CDtrodo de ouro. (—) Tampão fosfato pH 7,1 e (—) guanosina 0,01 mol L⁻¹ em pH 7,1. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso = 50 mV.

Foi então construída uma curva analítica para a guanosina em pH 7,1. Observou-se uma excelente linearidade ($R=0,999$) entre o aumento da concentração e o aumento da corrente de pico anódica (Figura 40B). Um ensaio de repetitividade foi efetuado, com cinco replicatas, em nível baixo de concentração, descrito na curva analítica ($0,17 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). A média de sinal de corrente de pico obtida foi de $0,552 \mu\text{A}$, com desvio padrão de $0,015 \mu\text{A}$. A partir destes dados foram calculados os limites de detecção e de quantificação, sendo de $10,0 \times 10^{-9}$ e $30,4 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, para a seguinte equação: $I/\mu\text{A} = -0,0179 + 4,9317[\text{guanosina}/\text{mmol L}^{-1}]$.

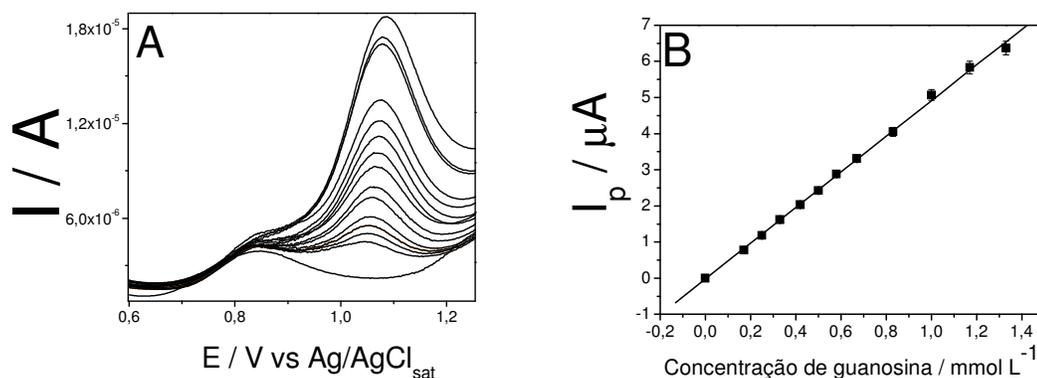


Figura 40. A) Curva analítica para a oxidação da guanosina sobre eletrodo de ouro. B) Região de linearidade.

Como teste para investigar a detecção da base guanina em solução foi efetuada a avaliação da detecção desta base contida na molécula de DNA de fita dupla. Para esta etapa, o DNA Calf Thymus (ct-DNA) foi adquirido, por ser um tipo de DNA de cadeia muito longa, descrito na literatura e de preço mais acessível. Para o preparo do ct-DNA, uma porção de aproximadamente 0,010 g foi pesada em micro tubo do tipo eppendorf, sendo então diluída com água deionizada, em overnight. A concentração foi reavaliada por espectrofotometria UV-Vis, pelo sinal de absorbância a comprimento de onda de 258 nm. O voltamograma de pulso diferencial em tampão fosfato foi inicialmente obtido e posteriormente o DNA foi adicionado à célula de trabalho na concentração final de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o voltamograma foi novamente obtido. Na Figura 41 estão apresentados os dois voltamogramas de pulso diferencial.

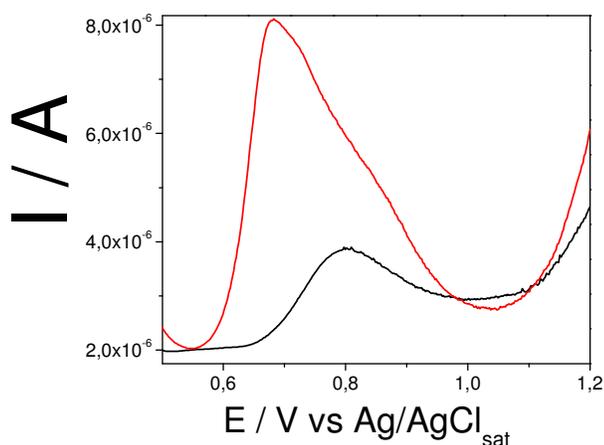


Figura 41. Voltamograma de pulso diferencial em CDtrodo de ouro. (—) Tampão fosfato pH 7,1 e (—) DNA de Calf Thymus $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, em pH 7,1. $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso = 50 mV.

Pode se observar que nenhum sinal de corrente de pico foi observado em valores de potencial próximos de +1,1 V, porém, um pico de oxidação foi registrado em potencial de + 0,680 V. Segundo a literatura, este pico pode ser relacionada à 8 oxo-guanina (7,8-di-hidro-8-oxoguanina ou 8-oxoG), que é um intermediário da oxidação da guanosina (posição C 8) em processos de lesão oxidativa de DNA. Enfatiza-se que a oxidação desta molécula ocorre mais facilmente que a da própria guanina (OLIVEIRA BRETT; PIEDADE; SERRANO, 2000). Como o estudo foi

efetuado com ensaios repetidos para o mesmo eletrodo, acredita-se que esta superfície tenha sido modificada com a guanina, por adsorção, que, pode ter sofrido processos de oxidação, porém, somente o produto gerado (8-oxoG) foi detectado. A partir da Figura 41 pode se evidenciar que este pico, que pode ser referente a 8-oxoG, está sobrepondo o primeiro pico relativo à formação de óxidos de ouro, indicando que a intensidade de corrente não está unicamente relacionada à oxidação do intermediário. A Figura 42 apresenta a estrutura da 8-oxoG

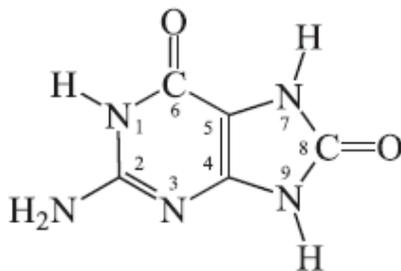


Figura 42. Fórmula estrutura da molécula de 8 oxoguanina.

O mesmo estudo foi então efetuado para o DNA de Calf Thymus degradado, ou seja, uma solução contendo quantidade de bases nitrogenadas livres em solução. Inicialmente o DNA de Calf Thymus foi pesado e seguidamente sofreu um ataque com solução 0,5 mol L⁻¹ de ácido perclórico, o que ocasiona a quebra das ligações do esqueleto açúcar-fosfato. A solução assim trabalhada foi neutralizada com NaOH 9 mol L⁻¹. Um sobrenadante escuro foi observado, sendo separado por centrifugação. Posteriormente o valor de pH foi ajustado. Para esta solução trabalho foi possível observar um pequeno sinal de pico de oxidação em potencial próximo de + 1,1 V, relativos à oxidação da molécula de guanina (Figura 43). A metodologia de degradação do DNA pode ter sido muito agressiva e ter implicado em uma solução muito degradada, então, o baixo sinal obtido pode ter sido devido a presença de pouco material genético para oxidar, o que pode justificar o baixo sinal. Estudos posteriores indicaram, porém, que os valores de corrente de pico e de potenciais de pico não foram repetitivos.

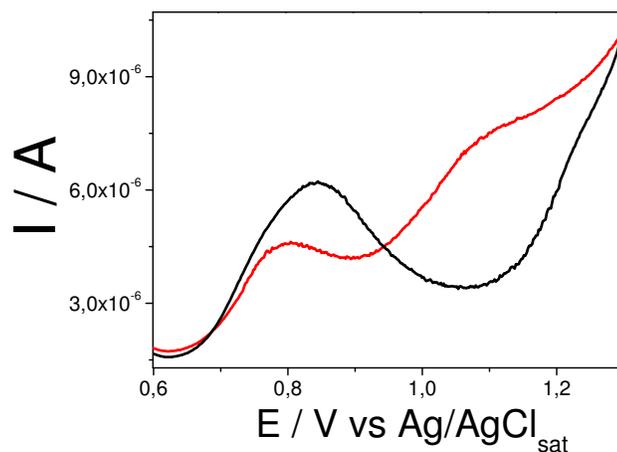


Figura 43. Voltamograma de pulso diferencial em CDtrodo de ouro. Tampão fosfato pH 7,1 (—) e DNA de Calf Thymus degradado, em pH 7,1 (—). $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$. Amplitude de pulso = 50 mV.

Devido ao baixo sinal obtido, foi efetuada, então, uma investigação da oxidação da guanósina em potencial fixo, pela técnica de amperometria a potencial fixo, visando encontrar um sinal distinguível entre a guanósina e o eletrólito. Aplicou-se um potencial de + 1,07 V, por 60 s, em célula contendo solução trabalho (tampão fosfato pH 7,1 ou guanósina em tampão fosfato). Os gráficos da Figura 44 demonstram que o sinal obtido para a guanósina, em + 1,07 V foi de diferente intensidade com relação ao sinal obtido para o eletrólito.

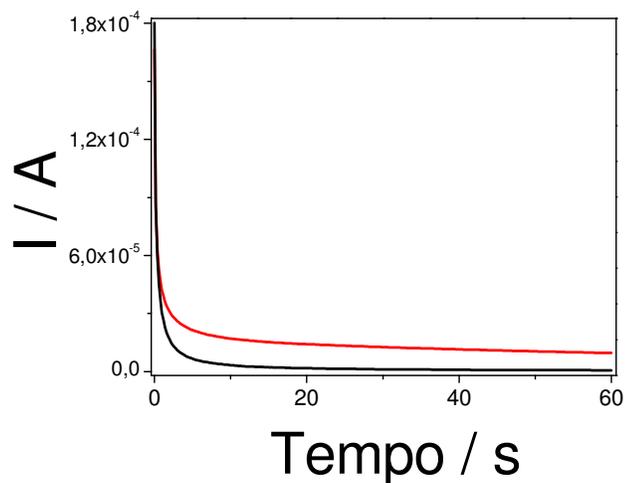


Figura 44. Cronoamperogramas. Sinal de corrente em função do tempo para (—) solução de tampão fosfato pH 7,1 e (—) solução de guanosina monofosfato $6,67 \text{ mmol L}^{-1}$. Potencial aplicado $E = + 1,07 \text{ V}$, tempo de aplicação de potencial, $t = 60 \text{ s}$.

A partir destes dados, foi obtida uma curva analítica referente à concentração de guanosina e o sinal de corrente, em potencial fixo. A curva apresentou linearidade com $R=0,997$, porém, com um alto sinal de background (Figura 45).

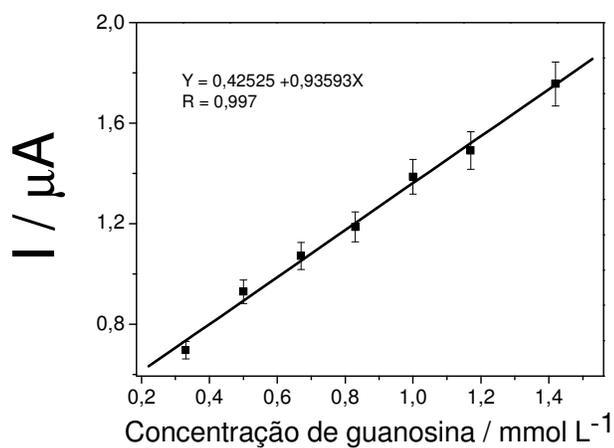


Figura 45. Curva analítica para a oxidação da guanosina sobre eletrodo de ouro, obtida por amperometria a potencial fixo.

Posteriormente, a técnica foi aplicada para detecção de sinal de DNA degradado (Figura 46). Um sinal distinto para o DNA foi obtido, porém, este mesmo sinal não foi reprodutivo e não se obteve linearidade para com o aumento da concentração da solução de DNA degradado, comportamento este já descrito anteriormente para a técnica de pulso diferencial.

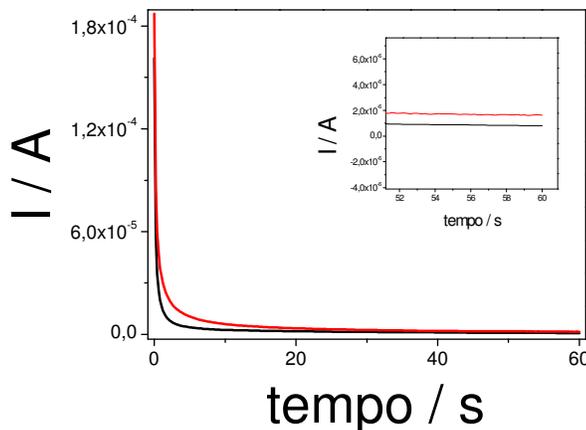


Figura 46. Cronoamperogramas. Sinal de corrente em função do tempo para (—) solução de tampão fosfato pH 7,1 e (—) DNA de Calf Thymus degradado, em pH 7,1. Potencial aplicado $E = + 1,07$ V, tempo de aplicação de potencial, $t = 60$ s.

Os estudos eletroanalíticos empregados nesta referida etapa de análise evidenciaram que, embora a guanosina apresente comportamento oxi-redutivo semelhante ao da guanina, a análise de seus processos oxidativos não foi suficiente para delimitar uma metodologia de monitoramento da base guanina contida na estrutura do DNA. Este fato pode ser explicado por conta da guanina livre em solução não apresentar os mesmos impedimentos estéricos e cinéticos da mesma base inserida na estrutura do DNA. Esta suposição corrobora com os dados aqui obtidos, como, os baixos sinais relativos às avaliações do DNA Calf Thymus, bem como a falta de repetitividade e linearidade encontrada nos dados analisados pelas metodologias eletroanalíticas aplicadas a este material genético, sobre superfície eletródica de ouro.

13.4.2 Comportamento Eletroquímico dos Compostos Indicadores

Os trabalhos de investigação do comportamento eletroquímico das moléculas passíveis de interagirem com o DNA nativo foram iniciados com os complexos de cobre. Soluções aquosas foram preparadas e os compostos foram avaliados pela técnica de voltametria cíclica, em meio de tampão fosfato pH 7,2. A Figura 47 apresenta os voltamogramas para os dois complexos de cobre em estudo.

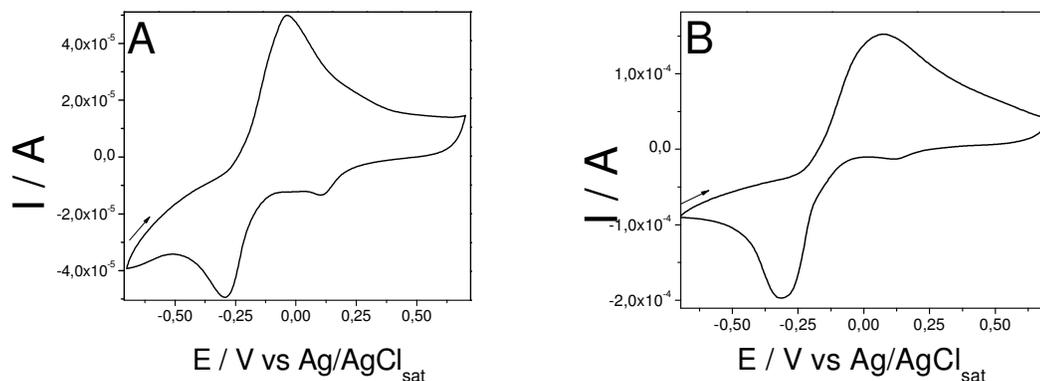


Figura 47. Voltamogramas cíclicos em CDtrodo de ouro: comportamento eletroquímico dos complexos (A) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ ($0,88 \text{ mmol L}^{-1}$) e (B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) em solução tampão fosfato pH 7,2.

Pode-se observar para os dois gráficos, comportamento voltamétrico semelhante para os dois compostos, apresentando um pico de oxidação definido, seguido de um possível "ombro". Para o composto $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$, denota-se um pico de oxidação em $-0,04 \text{ V}$ e dois picos de redução em $+0,11$ e $-0,30 \text{ V}$. Para o outro complexo de cobre estudado, um pico de oxidação em $+0,07 \text{ V}$ e dois de redução, em $+0,12$ e $-0,32 \text{ V}$. Observa-se para os picos de redução, uma menor intensidade para o primeiro pico de varredura reversa, enquanto o segundo apresentou-se melhor pronunciado. Este comportamento foi demonstrado para ambos os complexos. Os dois compostos apresentaram caráter adsorptivo sobre a superfície do eletrodo de ouro. Aplicando-se sucessivos ciclos, foi observado o aumento da intensidade de corrente a cada novo ciclo, porém, somente para o complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ é que foi observado deslocamento do potencial de pico. O aumento de corrente de pico se estabilizou após vários ciclos subseqüentes, o que pode ser indicativo de processos de rápida adsorção do complexo na superfície do

eletrodo, fator que pode evidenciar transferência de carga lenta. Para avaliação inicial deste processo de adsorção foi efetuado ensaio voltamétrico com $K_4Fe(CN)_6$ em meio de tampão fosfato. O sinal foi medido antes e após os processos oxidativos do complexo de cobre sobre a superfície de ouro e o procedimento de lavagem foi efetuado com água destilada. Para o complexo $Cu(NO_3)_2(en)_2$ (Figura 48) pode se observar que a intensidade de corrente relativa ao ferrocianeto de potássio diminuiu após os processos redox sofridos pelo eletrodo, com um novo par redox denotado a regiões de potenciais negativos. Este par redox sugere que o complexo foi adsorvido sobre a superfície do eletrodo de ouro e mesmo após processos de lavagem com água destilada, não pode ser removido.

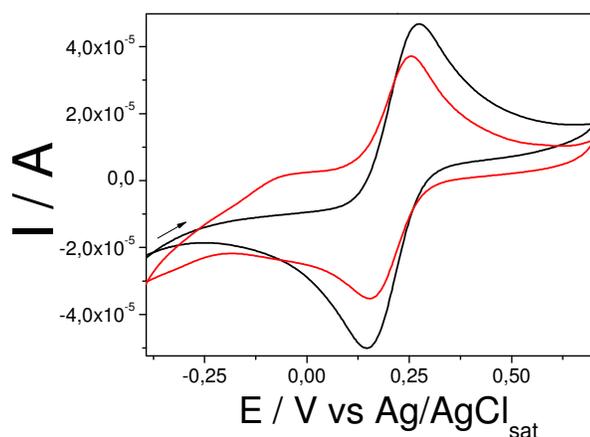


Figura 48. Voltametria cíclica para CDtrodo de ouro em meio de tampão fosfato pH 7,3. $K_4Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} , (—) antes e (—) após ciclagem com complexo $Cu(NO_3)_2(en)_2$.

Pela Figura 49, percebe-se que o complexo $Cu(NO_3)_2(NN)_2$ também adsorveu sobre a superfície do eletrodo, apresentando par redox pronunciado e alterando o comportamento dos processos redox do ferrocianeto, que, no caso, não apresentou par redox definido. Possivelmente, este complexo interage com a superfície do eletrodo de maneira mais forte que o complexo anteriormente descrito, modificando a superfície do eletrodo. YANG et al. (2001) estudando a interação do cobre em eletrodos de ouro modificados com monocamadas de L-cisteína, pela técnica de voltametria adsorvativa de redissolução, obteve pico anódico relativo à oxidação do cobre I a cobre II em potencial de 280 mV vs. Ag/AgCl. Os autores

evidenciaram também fortes processos de adsorção do cobre sobre o eletrodo modificado.

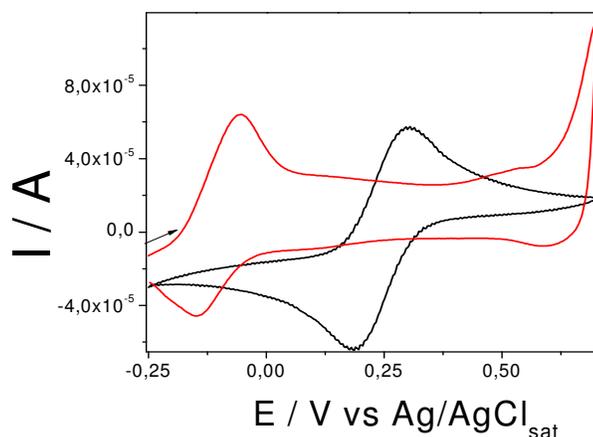


Figura 49. Voltametria cíclica para CDtrodo de ouro em meio de tampão fosfato pH 7,3. $K_4Fe(CN)_6$ 1 mmol L^{-1} , (—) antes e (—) após ciclagem com complexo $Cu(NO_3)_2(NN)_2$.

Seguidamente, foram iniciados os estudos dos comportamentos voltamétricos dos compostos corantes. O azul de meldola é um corante catiônico ($C_{18}H_{15}ClN_2O \cdot xZnCl_2$) de massa molar 310.78 g/mol . O azul de metileno é um corante catiônico solúvel em água ou em álcool, de fórmula molecular ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) e massa molar 319.85 g/mol . A sua forma oxidada, que possui coloração azul, é facilmente reduzida à forma incolor, chamada de azul de leucometileno. As fórmulas estruturais estão apresentadas na Figura 50.

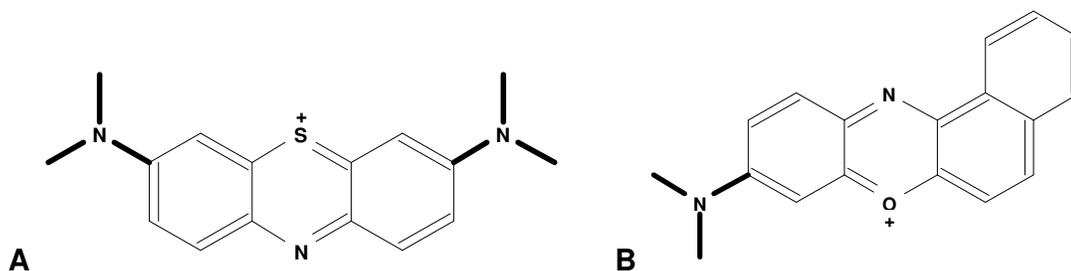


Figura 50. Fórmulas estruturais dos cátions A) azul de metileno e B) azul de meldola.

A Figura 51 apresenta os voltamogramas cíclicos para os compostos azul de meldola (A), que apresentou pico anódico em $-0,06 \text{ V}$, com sinal de pico catódico

em - 0,11 V, e para o azul de metileno (B), que apresentou pico anódico e catódico em - 0,15 e - 0,21 V, respectivamente. O azul de metileno apresentou melhor caráter reverssivo, com diferença entre os potenciais de pico foi de 61 mV e a razão de pico de aproximadamente 1.

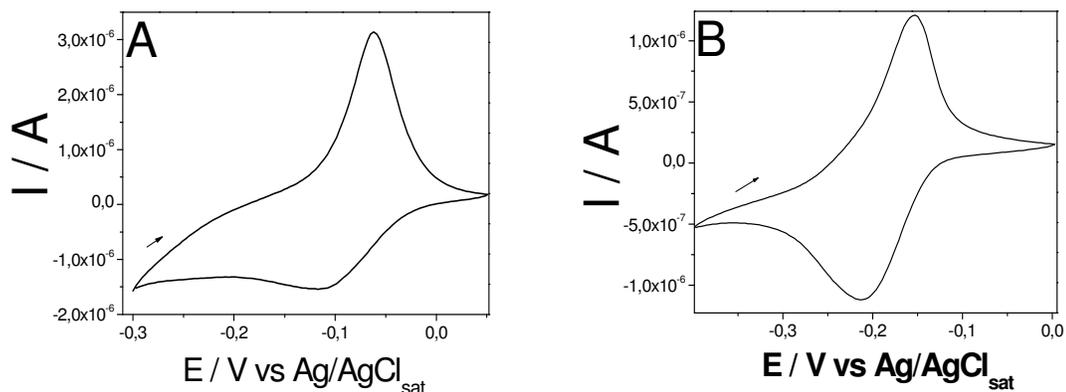


Figura 51. Voltamogramas cíclicos: comportamento dos corantes. A) azul de meldola, 25 mmol L⁻¹. B) azul de metileno 5 μmol L⁻¹.

A diferença de comportamento entre os picos do voltamograma do azul de meldola denota um comportamento adsorativo sobre a superfície do eletrodo, que foi confirmado pelo estudo de velocidade de varredura, no qual, acima de 80 mV s⁻¹, o sinal de corrente de pico obtido foi praticamente o mesmo. Esta adsorção parece envenenar a superfície de ouro, pois quando foram aplicados ciclos sucessivos, o sinal de corrente decaiu com o aumento do número de ciclos. O material adsorvido não foi totalmente removido por lavagem com água destilada. Ao serem aplicados ciclos sucessivos para a molécula de azul de metileno em solução trabalho, não foi observada variação no sinal de corrente para os respectivos voltamogramas.

Para avaliar o grau de interação do azul de metileno com o ouro do CD, foi efetuado estudo com K₄Fe(CN)₆, como descrito anteriormente para os compostos estudados, ou seja, antes e após o estudo com azul de metileno. A Figura 52 apresenta os voltamogramas referidos. Observa-se uma diminuição na intensidade de corrente após a medida efetuada depois da avaliação com o azul de metileno, com leve deslocamento de potenciais de pico catódico e anódico. Isto implica em perda de área eletródica, por suposta adsorção do composto. Esta adsorção foi facilmente removida com água destilada. Já para o azul de meldola, não foi

observado deslocamento de potencial de pico anódico, apenas diminuição da corrente de pico. Enfatizar que o azul de metileno apresentou caráter adsorativo muito baixo quando comparado com o azul de meldola, visto que a adsorção sofrida pelo eletrodo de ouro em presença deste somente foi retirada por auxílio de solução alcoólica (20%).

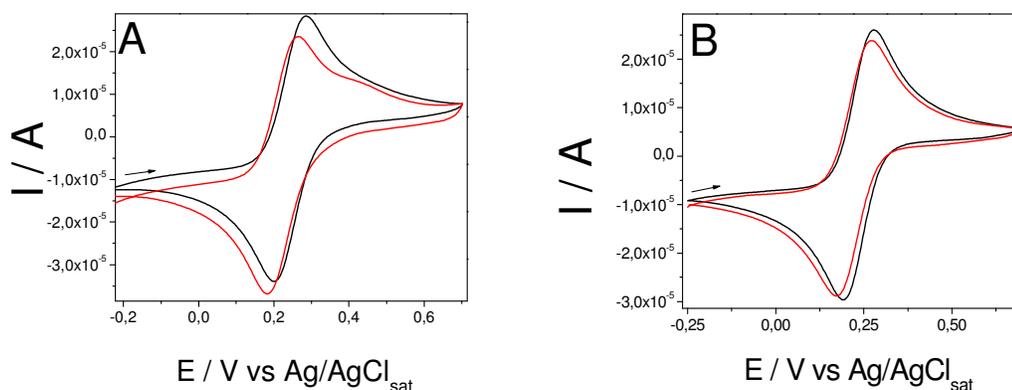


Figura 52. Voltamogramas cíclicos em CDtrodo de ouro. $K_4Fe(CN)_6$ 8 mmol L⁻¹, (—) antes e (—) após ciclagem com A) azul de metileno e B) azul de meldola. Meio de tampão fosfato pH 7,2.

No geral, todos os compostos aqui avaliados apresentaram picos de oxidação possíveis de serem monitorados em estudos eletroanalíticos, em baixos valores de potenciais. Para a construção de genossensores de mono uso, que é o propósito deste estudo, não se faz necessário, em primeira mão, a regeneração deste componente, ou seja, que o mesmo apresente caráter reversível. Os compostos apresentaram adsorções sobre o ouro, porém, este fator não se faz limitante no presente trabalho, a menos que os processos de adsorção se façam presentes pelos simples contato com a superfície de ouro, visto que, na etapa em que o sensor se encontra mergulhado em solução contendo o composto indicador de interesse, não se efetuam medidas amperométricas.

13.5 Etapa Eletroanalítica de Estudos DNA x Compostos Indicadores

Depois de estabelecidos os comportamentos voltamétricos dos complexos metálicos e corantes, buscou-se efetuar estudos eletroanalíticos que investigassem as interações entre estes compostos e o DNA. Esta etapa de trabalho foi iniciada

com o estudo dos corantes. Azul de metileno e azul de meldola foram avaliados via voltametria cíclica, em ausência e presença de DNA nativo na solução trabalho. De acordo com o a Figura 53, observou-se que os voltamogramas dos compostos em estudo foram alterados pela adição do material genético no meio.

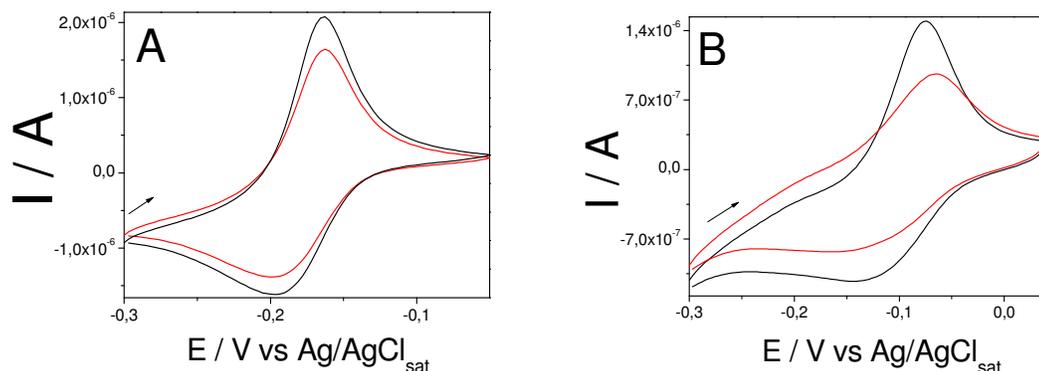


Figura 53 . Voltamogramas cíclicos. A) azul de metileno $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e B) azul de meldola 25 mmol L^{-1} em (—) ausência e (—) presença de DNA Calf Thymus $2,73 \text{ µg mL}^{-1}$. Tampão fosfato pH 7,3.

Para o azul de metileno, o comportamento voltamétrico apresentado foi aproximadamente o mesmo, porém com intensidade de corrente menor que a intensidade inicial, indicando que menor quantidade do corante esteve disponível para processos de oxidação, ou seja, que o DNA possivelmente interagiu com parte significativa do azul de metileno em solução. Para o azul de meldola, o voltamograma cíclico apresentou uma pequena alteração no comportamento, bem como decaimento do sinal de corrente. Posteriormente o mesmo ensaio foi efetuado para a adição de DNA em solução contendo complexos de cobre. De acordo com a Figura 54, o comportamento foi distinto do apresentado para os corantes. Para o gráfico da Figura 54A, apenas um leve incremento na corrente de pico catódica foi observado, porém, para a Figura 54B, observa-se um deslocamento de potencial de pico, tanto anódica quanto catódica, para o composto em estudo quando em presença de DNA em solução.

Estes dados enfatizam a idéia da interação dos compostos aqui estudados com o DNA de Calf Thymus, presumindo um possível comportamento semelhante para quando se efetuasse a etapa com material genético específico de hepatite C.

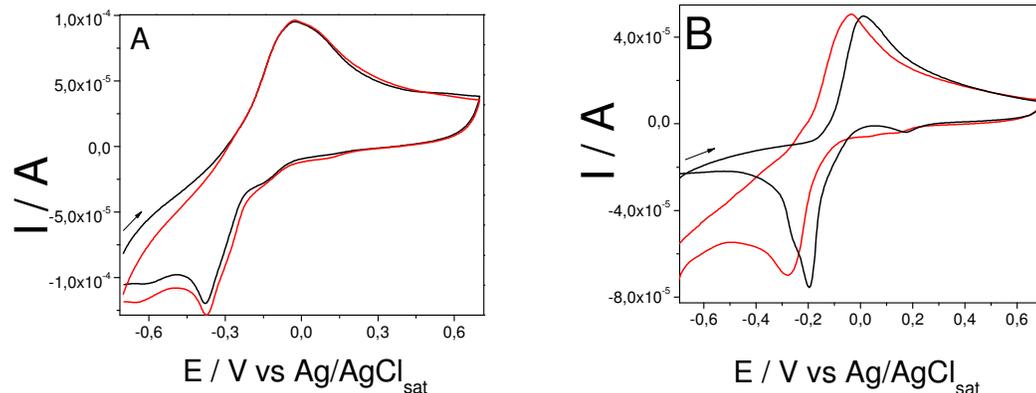


Figura 54. Voltametria cíclica em meio de tampão fosfato pH 7,2. Sinal dos complexos A) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$, e B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ em (—) ausência e (—) presença de Calf Thymus DNA ($2,86 \mu\text{g mL}^{-1}$). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

13.6 Caracterização Espectrofotométrica dos Compostos Indicadores Eletroanalíticos.

A partir dos dados obtidos inicialmente pelas técnicas voltamétricas de análise, partiu-se para uma avaliação analítica pela técnica de espectrofotometria UV-Vis, objetivando caracterizar os compostos estudados, bem como suas possíveis interações com o DNA. A Figura 55A apresenta o espectro do DNA nativo (duplo), em meio de tampão fosfato pH 7,0, na região de ultravioleta, indicando banda de absorção em 258 nm. Esta banda é relativa às bases nitrogenadas presentes na estrutura do DNA. O mesmo foi então avaliado segundo o grau de pureza, que pode ser obtido pela razão dos valores de absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. O valor encontrado para esta razão foi de 1,8 que é considerado um valor característico para DNA de fita dupla puro, sem contaminações por proteínas ou outros materiais (MANCHESTER, 1996). Em seguida foi traçada uma curva analítica em meio de tampão fosfato pH 7,2, a qual apresentou ótima linearidade de aumento da absorbância para com o aumento da concentração do DNA (Figura 55B).

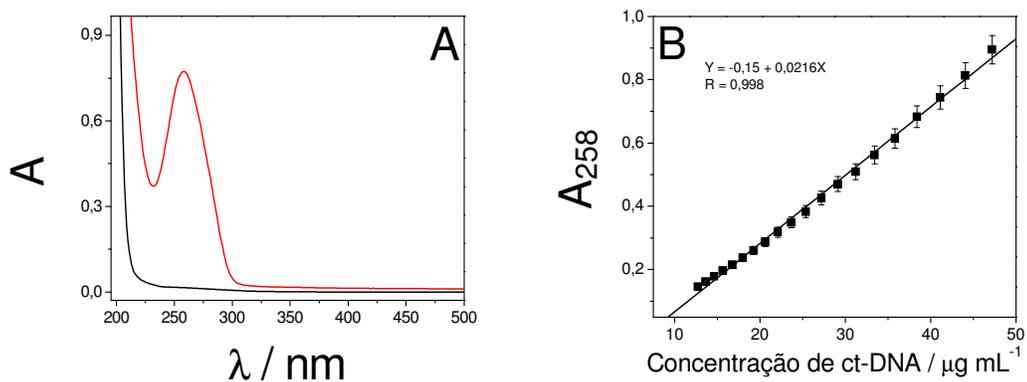


Figura 55. Espectro de absorção na região de ultravioleta. A) (—) DNA de Calf Thymus ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (—) tampão fosfato pH 7,3. B) Curva analítica para DNA em comprimento de onda = 258 nm. Caminho óptico = 1 cm.

Em seguida, os complexos metálicos foram solubilizados em água deionizada e os espectros de absorção foram obtidos. A Figura 56 apresenta os espectros para os mesmos. Os complexos $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ apresentaram bandas de absorção na região do visível em comprimentos de onda de 545 e 572 nm, respectivamente. Observou-se que essas bandas se apresentaram bastante largas, sendo a do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ a mais larga.

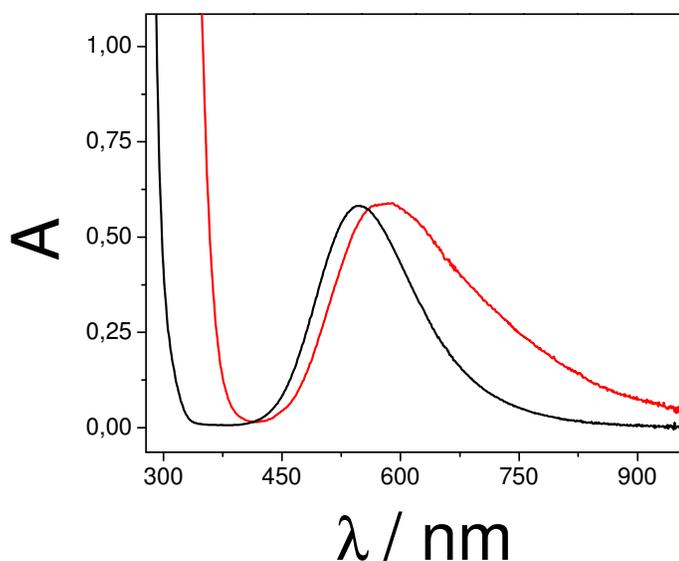


Figura 56. Espectro de absorção dos complexos $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ (—) e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ (—) em água destilada. Caminho óptico = 1 cm. Concentração = $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Foram então obtidas curvas analíticas para os dois compostos, como descrito na Figura 57. As mesmas variaram linearmente para com o aumento da concentração do complexo em estudo, apresentando excelente linearidade. As bandas denotadas encontraram-se distante da região de absorção do DNA nativo, avaliado anteriormente, o que indicou a possibilidade do monitoramento espectrofotométrico de processos de interação que possam existir entre o DNA e o composto.

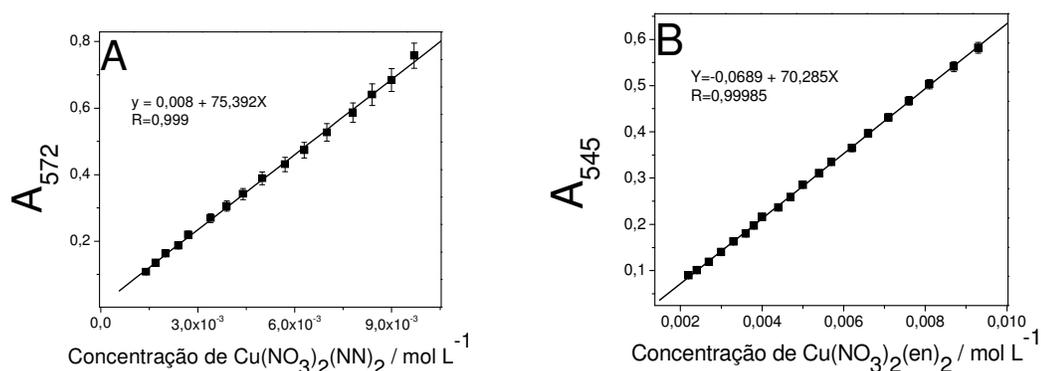


Figura 57. Curvas analíticas para os complexos: A) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ e B) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$.

Seguindo de acordo com as etapas anteriores, os corantes azul de metileno e azul de meldola foram avaliados pela técnica de espectrofotometria. A Figura 58A apresenta o espectro de absorção do azul de metileno na região de comprimento de onda de 200 a 800 nm. É possível destacar três bandas, sendo: em 246 e 292 nm, relativas aos anéis aromáticos contidos na molécula e 665 nm, relativa ao cromóforo. Todas as três bandas foram monitoradas, para as quais obtidas curvas analíticas específicas, as quais apresentaram-se com ótima linearidade para com o aumento da concentração do composto corante (Figura 58B). Uma pequena banda foi observada em comprimento de onda próximo de 610 nm que tem sido atribuída a uma transição vibrônica característica do composto.

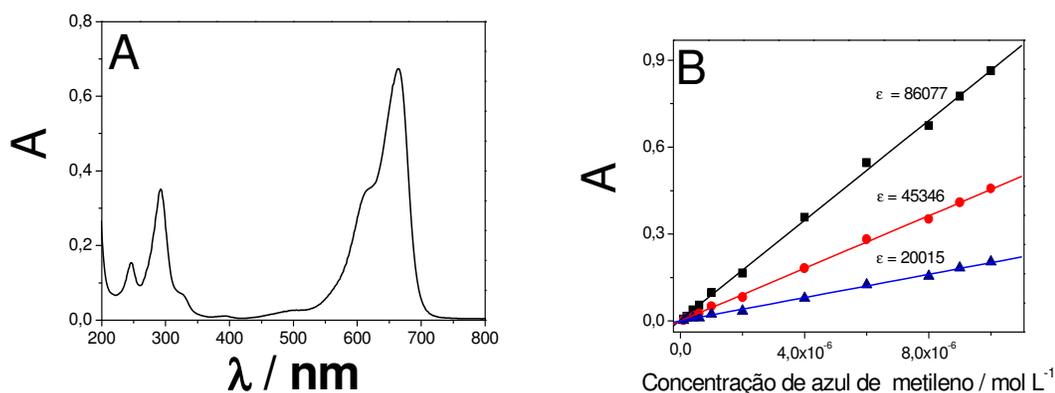


Figura 58. A) Espectro de absorvância do azul de metileno ($8 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Curvas analíticas para os picos de absorvção do azul de metileno em crescentes concentrações. (—) 665, (—) 292 e (—) 246 nm $R = 999$. Caminho óptico = 1 cm.

A Figura 59A é relativa ao espectro de absorvção do composto azul de meldola. Observa-se uma banda larga com máximo de absorvção em 570, um “ombro” em 430, bem como dois picos muito sobrepostos nas regiões de 320 e 267 nm. As curvas analíticas para os comprimentos de onda 267, 322 e 572 nm demonstraram excelente linearidade. (Figura 59B).

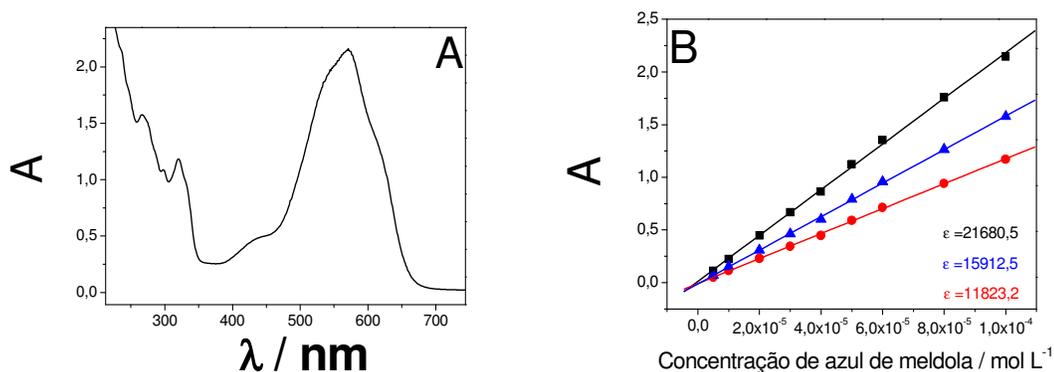


Figura 59. A) Espectro de absorvância do azul de meldola ($0,1 \text{ mmol L}^{-1}$). B) Curvas analíticas para as bandas de absorvção do azul de meldola. (—) 572, (—) 322 e (—) 267 nm. $R = 999$. Caminho óptico = 1 cm.

O azul de meldola e o complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ apresentaram bandas de absorvção na região de absorvção característica do DNA nativo. Os outros dois compostos (azul de metileno e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$), em concentrações baixas ($\mu\text{mol L}^{-1}$),

não apresentaram sinais de absorbância que interferissem no sinal do DNA, bem como suas bandas de absorção apresentaram-se mais bem definidas, sendo mais propícias, de acordo com essa primeira etapa de investigação, para avaliação das interações com o DNA.

13.7 Interação Composto x DNA

Uma vez obtidos e selecionados os perfis espectrofotométricos dos compostos em estudo, partiu-se para a etapa relativa aos possíveis processos de interação entre estes compostos e o DNA. A literatura relata que esta interação, quando acontece, pode afetar o comportamento dos sinais espectrofotométricos relativos aos compostos. Desta forma, os estudos de interação podem ser efetuados a partir do monitoramento destes compostos, juntos em solução, observando as variações de comportamento espectrofotométrico dos mesmos (LONG; BARTON, 1990).

13.7.1 Estudo de Interação com DNA Degradado.

O primeiro estudo foi efetivado avaliando-se o grau de interação entre as moléculas de interesse e o DNA degradado. O sinal analítico de absorção do DNA degradado foi avaliado em ausência e presença do composto de interesse. De acordo com a Figura 60A, não foi evidenciada interação significativa entre o DNA degradado e o complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$, pois o sinal de absorbância não variou com o aumento da concentração do complexo no meio.

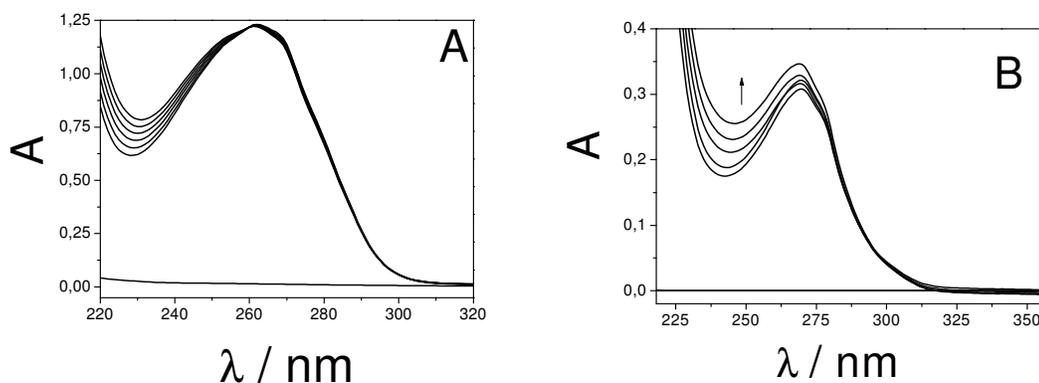


Figura 60. DNA degradado $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ + A) complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ ($8\text{-}39 \mu\text{mol L}^{-1}$) e B) azul de metileno ($0,6\text{-}4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$).

A Figura 60B apresenta o comportamento das bandas de absorção do DNA degradado em relação ao aumento da concentração do composto azul de metileno no meio. Uma afinidade pelo DNA degradado foi observada, indicada pelo aumento do sinal analítico em função do aumento da quantidade do composto de cobre no meio. Possivelmente por ligação do composto com a base guanina ou monômeros de DNA presentes em solução.

13.7.2 Estudo Espectrofotométrico com Guanosina.

O DNA, ao ser degradado, apresenta-se bastante fragmentado, porém, alguns pequenos pedaços de oligonucleotídeos ainda podem se associar e desta maneira, colaborar com o aumento de sinal analítico (JELEN; FOJTA; PALECEK, 1997). A guanina é a base nitrogenada dita como preferencial quando se trata de estabelecer um ponto de ligação na estrutura do DNA e algum composto (LI et al., 2006). Caso o azul de metileno ou o composto de cobre apresente afinidade por uma fita simples de DNA, pode ser que esta ligação esteja associada à base guanina, especificamente ao nitrogênio N7. Analisando a variação do sinal da guanina, pode-se inferir a respeito do ponto de ligação destes compostos na estrutura do DNA. Neste sentido, efetuou-se um estudo espectrofotométrico com auxílio da molécula de guanosina, que constitui um monômero da guanina no DNA. Inicialmente a guanosina foi estudada em tampão fosfato pH 7,2, como apresentado na Figura 61A. Observam-se duas bandas de absorção características, sendo uma em 252, que tem sido atribuída ao tautômero keto-N9H e outra em 275 nm, atribuída à contribuição tanto do keto-N9H quanto do keto-N7H (KUSHWAHA; KUMAR; MISHRA, 2004). Uma curva de analítica foi então traçada, demonstrando linearidade entre a absorbância e o aumento da concentração de guanosina (Figura 61B).

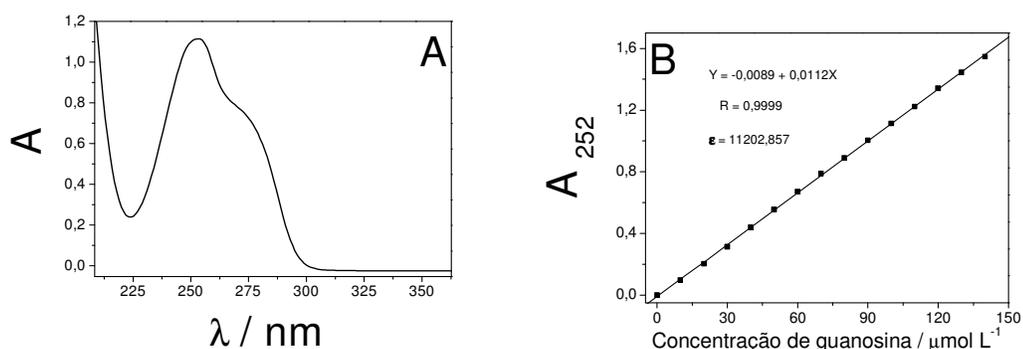


Figura 61. A) Espectro de absorção da guanosina (100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato pH 7,2. B) Curva analítica para a guanosina.

Posteriormente, a guanosina foi mantida em concentração fixa e o composto de interesse foi adicionado ao meio, em concentrações distintas e o pico da guanosina foi então monitorado. A Figura 62 apresenta a variação de absorbância referente à molécula da guanosina, em presença do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ e do azul de metileno, em concentrações variadas.

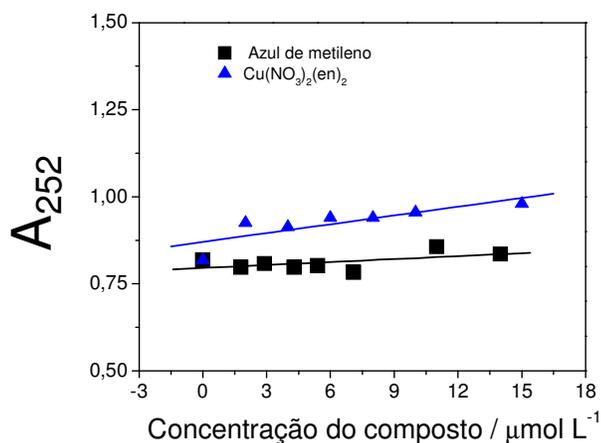


Figura 62. Monitoramento da absorbância da guanosina em função do aumento da concentração de (—) azul de metileno e de (—) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$.

Para os dois compostos, foram evidenciados discreto aumento no sinal de absorbância da guanosina com relação ao sinal de base, porém este sinal manteve um comportamento crescente, com valores de absorbância não muito distantes entre si. Em seguida efetuou-se um ensaio de monitoramento do sinal de absorção do azul de metileno fixo, em presença do aumento da concentração da guanosina. Na

Figura 63A está apresentado o espectro em estudo e a 63B o monitoramento das bandas de absorção.

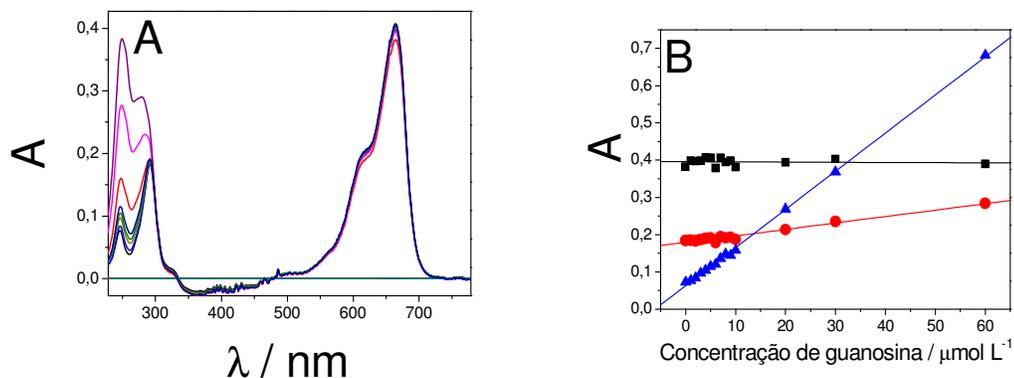


Figura 63. Espectro do azul de metileno ($6 \mu\text{mol L}^{-1}$) em função da adição de guanósina ($1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,20,30$ e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$). B) Monitoramento das bandas de absorvância do azul de metileno em (—) 665 , (—) 292 e (—) 246 nm.

O sinal de absorvância praticamente não se alterou, para os comprimentos de onda 665 e 292 nm e para o 246 nm o sinal demonstrou aumento linear com a adição da concentração da guanósina no meio, porém, como as bandas de absorção são muito próximas, este ganho de sinal foi considerado um somatório dos dois sinais, ou seja, do azul de metileno e da guanósina, não constando como indício de interação entre os compostos. O estudo foi também efetuado para o complexo de cobre em concentração fixa e o sinal de absorvância também não sofreu grandes variações. No geral este estudo fortaleceu a idéia de que os compostos aqui avaliados não apresentaram afinidades tão significativas para com a molécula de guanósina livre em solução.

13.7.3 Estudo do DNA Nativo.

Efetuosos os estudos para o material genético degradado e para o monômero de guanósina, partiu-se para avaliar o comportamento dos compostos frente ao DNA nativo (duplo). A uma solução contendo DNA foi adicionada uma quantidade específica do composto em estudo (azul de metileno ou $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$). A Figura 64 apresenta um gráfico em que se pode observar a variação de sinal de absorção do DNA nativo em presença destes compostos. Observa-se um

comportamento hipercrômico da banda de absorção do DNA, para os dois compostos em estudo, ou seja, um aumento de absorbância com a adição dos compostos no meio de interesse.

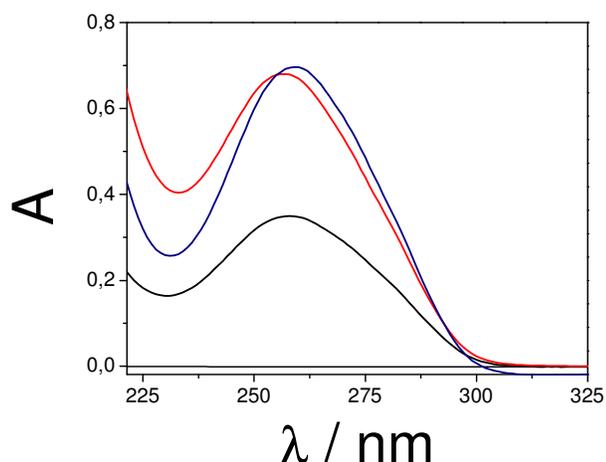


Figura 64. Bandas de absorção do DNA Calf Thymus nativo ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) em (—) ausência e presença dos compostos: (—) $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ ($32 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (—) azul de metileno ($7,1 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Observou-se também um leve deslocamento da banda do DNA para maiores valores de comprimento de onda. Estes comportamentos obtidos podem evidenciar uma possível interação entre as moléculas, visto que este hiper Cromismo pode ser relativo a uma maior disponibilidade de bases, fato este que pode ser sugerido quando uma molécula interage com a fita dupla de DNA, causando torções na sua estrutura, o que acarreta em aumento da absorção de luz.

Os estudo espectrofotométricos específicos de interação com DNA foram então iniciados com o composto azul de metileno. Para esta etapa, trabalhou-se com a concentração de DNA no meio, em termos de mol L^{-1} de monômeros, também conhecida como concentração de DNAfosfato. Este tipo de medida auxilia no entendimento de associação, visto que, pequenas moléculas que intercalam com DNA, possivelmente o fazem em proporções definidas, relacionadas com a quantidade de monômeros. Para conversão desta unidade de concentração, foi medida a absorbância da solução de DNA em 258 nm e este valor foi corrigido pelo coeficiente de extinção $6600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ZHAO; ZHU; CHEN, 1999). Primeiramente, adicionou-se DNA ($2,4 \text{ nmol L}^{-1}$) a uma solução contendo azul de

metileno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Nesta segunda etapa de investigação, monitoraram-se as bandas do azul de metileno. É possível observar que ocorreu um deslocamento da banda de absorção na região do visível, de 665 para 675 nm, bem como diminuição da intensidade de absorção (hipocromismo) (Figura 65A). A presença de DNA no meio afetou a inclinação da curva analítica, ou seja, modificou o valor de coeficiente de absorção, para o comprimento de onda 665 nm (Figura 65B).

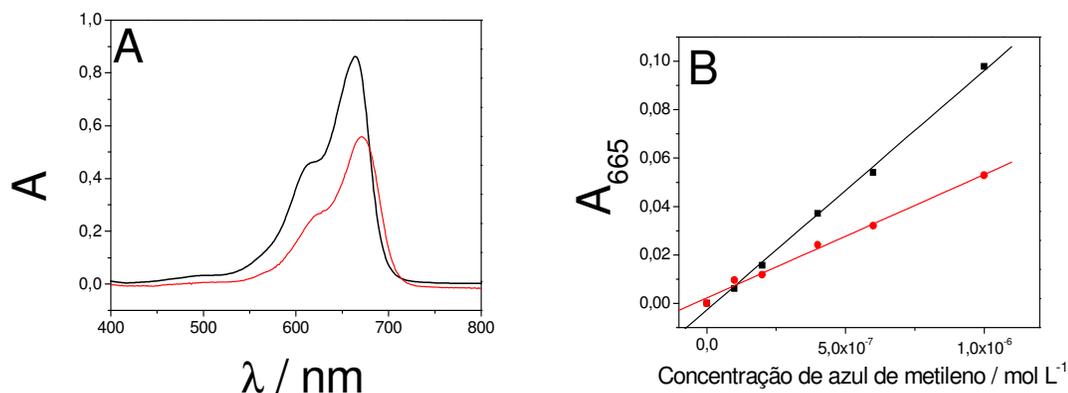


Figura 65. A) Espectro de absorbância do (—) azul de metileno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e do (—) azul de metileno ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) + DNA ($2,4 \text{ nmol L}^{-1}$). B) Curvas analíticas para os picos de absorção do (—) azul de metileno em crescentes concentrações e para o (—) azul de metileno em crescentes concentrações + DNA ($2,4 \text{ nmol L}^{-1}$).

Uma nova curva de analítica foi obtida para o azul de metileno em presença de DNA, agora em comprimento de onda de 675 nm, apresentando ótima linearidade (Figura 66). Este fato pode ser indicativo de que a interação entre os dois compostos seja efetuada de forma orientada, seguindo estequiometria definida.

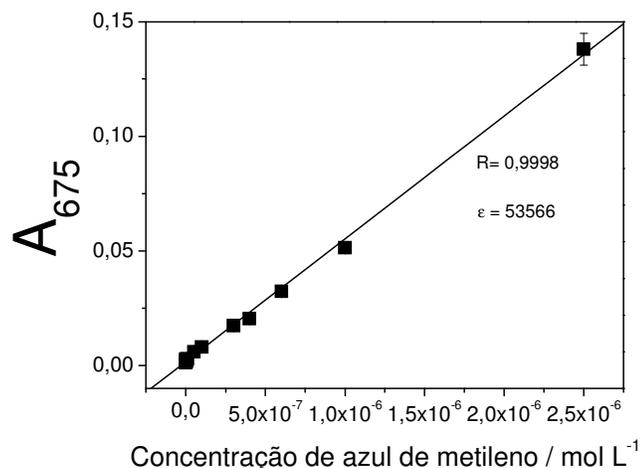


Figura 66. Curva analítica para azul de metileno em presença de DNA.

Partindo da evidência de interação entre o DNA e o azul de metileno e que esta relação poderia obedecer a uma estequiometria específica, buscou-se investigar esta proposta com relação ao sinal de absorção do DNA em presença de azul de metileno, o que possibilitaria uma investigação em concentrações baixas dos dois reagentes. A Figura 67A mostra o estudo de monitoramento do sinal de absorvância do DNA ($\lambda = 258 \text{ nm}$) em presença do corante, em uma faixa de concentração em que o azul de metileno não apresentou absorvância significativa. Observou-se um comportamento hipercrômico quando se adicionou o corante, na concentração de $5,5 \text{ pmol L}^{-1}$, comportamento este seguido até a concentração de $0,24 \text{ nmol L}^{-1}$, quando o sinal de absorvância decaiu levemente, seguido de aumento de sinal quando a relação molar foi de 1:1. Este sinal foi estável até concentração de 10 nmol L^{-1} .

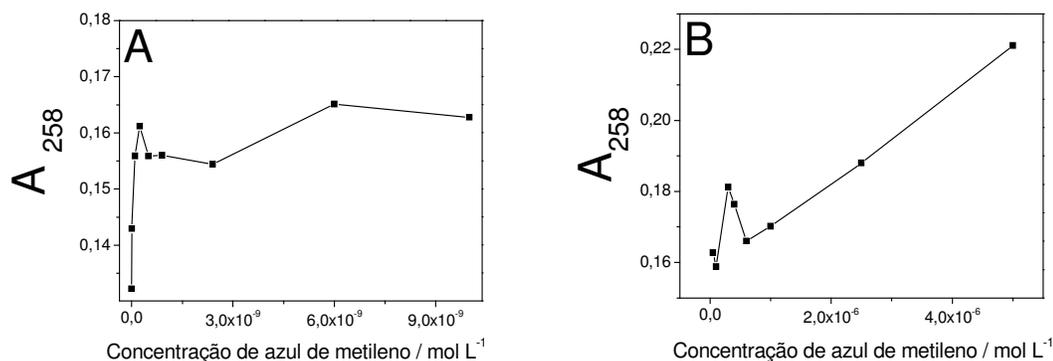


Figura 67. Relação entre o aumento da concentração de azul de metileno e a absorbância do DNA em 258 nm. A) Faixa de concentração sem sinal de absorção para o azul de metileno. B) Faixa de concentração com sinal de absorção para o azul de metileno.

A Figura 67B apresenta os dados da interação, na faixa de concentração em que o corante possui absorção significativa. A absorbância cresceu entre as concentrações de 50 nmol L⁻¹ e 0,3 μmol L⁻¹ adicionadas, decaindo até 0,6 μmol L⁻¹ e crescendo linearmente até 5,0 μmol L⁻¹. O monitoramento do sinal de absorbância em 675 nm foi efetuado paralelamente, apresentando ótima linearidade frente à concentração, garantindo que as oscilações nos sinais de absorbância não foram relativas a erros efetuados nas leituras. Essas variações e oscilações podem indicar diferentes formas de interação entre os compostos. Possivelmente, quando a concentração molar do corante é menor que a do DNA, o hiper Cromismo observado reflete um processo de interação por intercalação das moléculas com o DNA. Este processo de interação causa torções na estrutura do DNA, levando a uma maior exposição das bases e conseqüentemente a um aumento de absorbância. Quando a relação estequiométrica se aproxima de 1:1 este processo é saturado e acima desta concentração o corante interage com o DNA por adsorção, visto que os sítios de intercalação não estão mais disponíveis.

Para melhor entendimento desta proposta, aplicou-se o método espectrofotométrico da razão molar, como veículo de investigação da estequiometria do processo de interação (ZHAO; ZHU; CHEN, 1999). O método é baseado na fixação da concentração de um dos reagentes, enquanto varia-se a concentração do outro. Obtém-se então, um gráfico de absorbância pela razão molar entre os compostos e este gráfico fornece duas regiões distintas que se cruzam sob o ponto

que define a estequiometria da reação. Foram efetuados, tanto os estudos com o DNA fixo e a concentração do corante variando, quanto com o corante fixo e a concentração do DNA variando, avaliando-se os sinais analíticos para os respectivos picos de absorção. O monitoramento das bandas de absorção do azul de metileno fixo com concentração de DNA variando é apresentado na Figura 68.

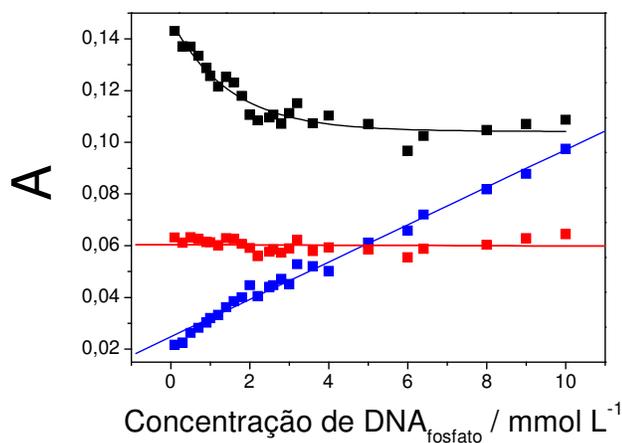


Figura 68. Monitoramento da absorvância das bandas do azul de metileno em função do aumento da concentração do DNA no meio. (—) 665, (—) 292 e (—) 246 nm.

Nota-se, para o comprimento de onda 665 nm uma queda significativa na absorção, até o ponto próximo da estequiometria 1:1, seguido de um comportamento com tendência estacionária. Já para a banda em 292 nm o sinal de absorvância praticamente não mudou com o aumento da concentração de DNAfosfato. Esta informação pode ser importante quando se propõem efetuar um estudo dos possíveis pontos de interação entre o azul de metileno e a molécula de DNA dupla. Possivelmente este ponto da molécula que não variou o sinal analítico, não contribua com a ligação com o DNA. A absorvância em 246 nm aumentou linearmente com o aumento da concentração de DNA, provavelmente pela influência do sinal de absorvância do DNA, que pode ter se somado com o sinal do azul de metileno, neste comprimento de onda. A Figura 69 apresenta os gráficos das razões molares para os ensaios, tanto do corante, quanto do DNA, em concentrações fixas. O método evidenciou a formação de complexos com estequiometrias muito próximas de 1:1.

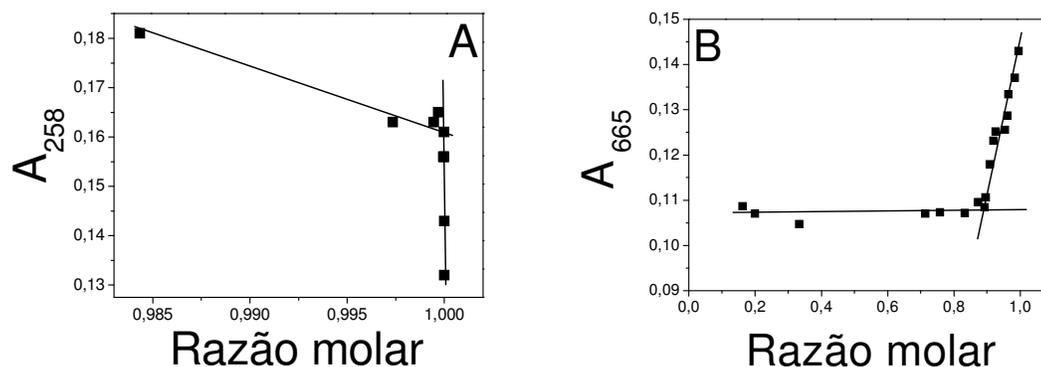


Figura 69. Gráfico do método da razão molar. Formação de complexo 1:1 entre o DNA e o azul de metileno. A) Monitoramento da absorção do DNA. B) Monitoramento da absorção do azul de metileno.

De posse destes dados foi efetuada a avaliação do grau de interação entre o DNA e o composto corante. Esta interação pode ser efetuada avaliando-se a constante de formação do composto. Este estudo foi efetuado de acordo com Zhao et al. (1999) A seguir, a Figura 70 apresenta o gráfico relativo ao cálculo desta constante. O valor obtido $K = 14,932 \times 10^5$) evidencia uma forte interação entre o azul de metileno e o DNA de Calf Thymus, valor este compatível com dados apresentados por Wang e Zhou (2007). Muitos estudos indicam que o azul de metileno pode se ligar ao DNA por intercalação, porém, parâmetros como a força iônica e a relação de concentração entre o composto e o material genético podem levar a um processo de interação não intercalativa (ZHAO; ZHU; CHEN, 1999).

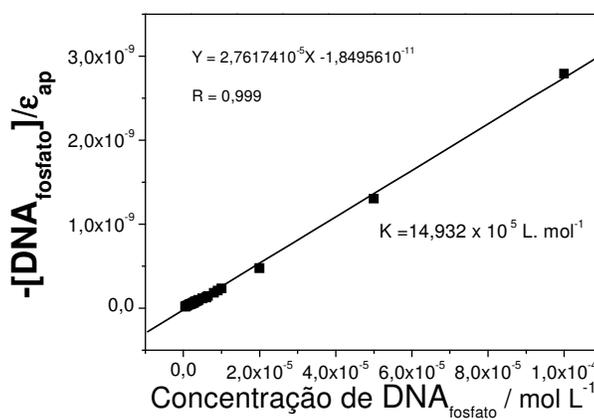


Figura 70. Gráfico para cálculo da constante de interação entre o azul de metileno e o DNA.

Posteriormente, foi efetuada a avaliação específica para a interação com o complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. Manteve-se a concentração de DNA fixa, aumentando-se a concentração do complexo de cobre, obtendo-se assim, uma relação de alta linearidade para com o aumento da absorbância do DNA nativo, de acordo com a Figura 71.

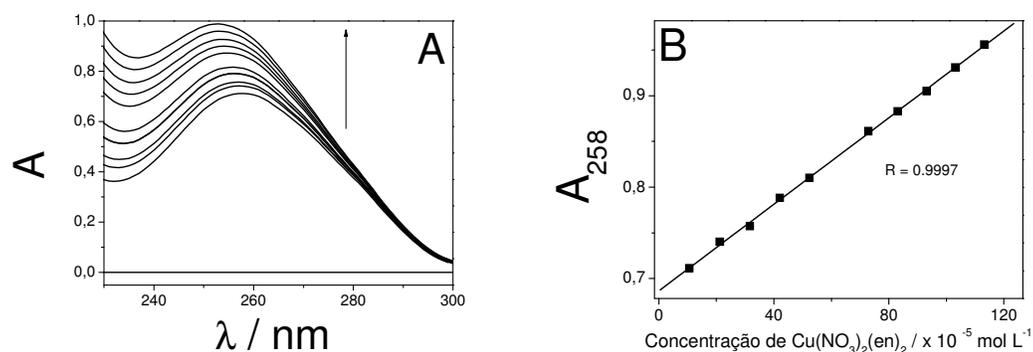


Figura 71. A) Variação da absorção do DNA nativo com relação ao aumento da concentração de complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. B) Região de linearidade. Caminho óptico = 1 cm.

Foi observado um pequeno deslocamento nas bandas de absorção, para valores menores que 258 nm. Este desvio pode ser indicativo de que a interação entre o complexo está expondo as bases purínicas, como a guanina, visto que estas bases nitrogenadas absorvem em comprimentos de onda um pouco abaixo de 260 nm, diferentemente das pirimidinas, que absorvem em valores ligeiramente acima deste. Esta informação é de extrema importância em estudos de lesões e danos de material genético.

As bases purínicas têm absorvidade molar maior que as pirimidínicas. Ou seja, a absorbância do DNA depende das suas subunidades, das bases que a compõem (MANDEL; MARMUR, 1968). LIU et al. (1999) evidenciaram uma interação entre complexos peptídicos de íons de cobre (II) e DNA observada a partir de dados espectrofotométricos. Foram observados hipercromismo, hipocromismo e batocromismo (deslocamento para a região do vermelho do comprimento de onda de absorção máxima) no sinal do DNA. Esses efeitos foram atribuídos ao fato de que complexos de cobre (II) podem se ligar ao DNA dupla fita de diferentes modos, através de ligação de hidrogênio, por forças de van der Waals ou coordenação entre os íons de cobre (II) dos complexos com as bases nitrogenadas do DNA. Sendo

assim, o composto de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ também foi avaliado pelo método da razão molar, indicando uma estequiometria próxima de 1:1. A Figura 72 apresenta o gráfico da constante de interação. A constante do complexo de cobre indicou uma forte interação com DNA duplo ($K = 10,1153 \times 10^6 \text{ mol L}^{-1}$).

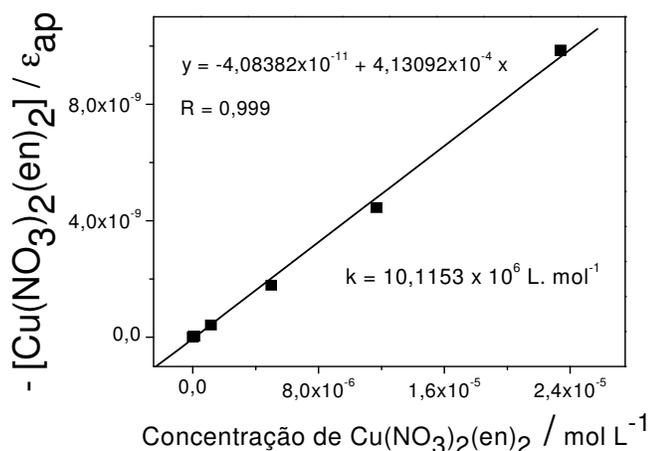


Figura 72. Gráfico da constante de formação do complexo formado entre o DNA e o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$.

14 CONSTRUÇÃO DO GENOSENSOR BASEADO EM INDICADORES ELETROATIVOS

14.1 Compostos Corantes

De acordo com os dados apresentados nas etapas anteriores de caracterização e interação eletroanalítica e espectrofotométrica dos compostos corantes em estudo, o azul de metileno se apresentou como o que melhor se adequava para iniciar a investigação eletroanalítica da interação com DNA, objetivando o seu uso na construção do genossensor. Para esta etapa inicial, a técnica de voltametria de pulso diferencial foi escolhida. Inicialmente, uma curva analítica foi construída para o azul de metileno em CDtrodo de ouro, em meio de tampão fosfato pH 7,2. Observa-se boa linearidade, como apresentado na Figura 73. O eletrodo de trabalho foi lavado entre cada medida para evitar a adsorção do azul de metileno sobre a superfície.

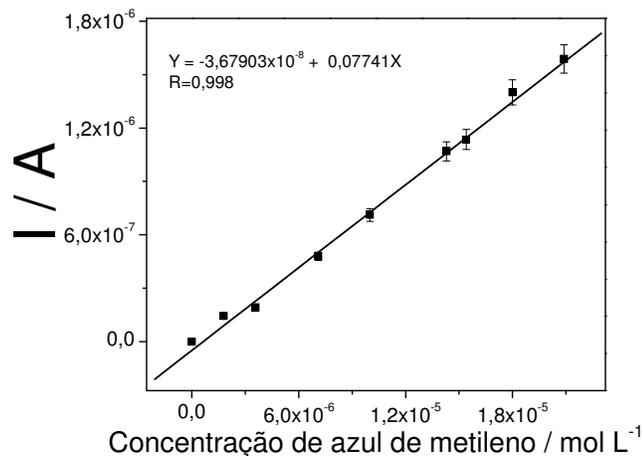


Figura 73. Curva analítica para o azul de metileno em tampão fosfato pH 7,2, obtida por voltametria de pulso diferencial. $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, amplitude de pulso = 50 mV.

Quando se trabalha com eletrodo modificado com oligonucleotídeos, em geral, este é colocado em solução contendo a seqüência genética a qual deve se ligar. Este contato deve ser efetuado por um tempo determinado, em que o material eletroativo indicador pode estar presente em solução, para efetuar interação com a fita dupla de DNA e assim sofrer processos oxi-redutivos que forneçam o sinal analítico desejado (CARPINI et al., 2004). Como o intuito desta etapa de trabalho foi estudar o azul de metileno como indicador eletroativo, foi efetuado um estudo de tempo para avaliação da adsorção do corante sobre a superfície de ouro, buscando determinar um tempo máximo em que este poderia ficar em contato com a superfície, sem adsorver sobre a mesma.

Foi inicialmente medido um voltamograma de pulso diferencial em solução tampão fosfato pH 7,2 (solução trabalho). Posteriormente o eletrodo foi lavado, sendo seguidamente mergulhado em solução contendo azul de metileno (solução de incubação) em concentração definida ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$), por tempo determinado, sendo então lavado com água destilada e um novo voltamograma foi traçado no mesmo eletrólito. Em uma segunda etapa, foi adicionado DNA Calf Thymus ($6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) à solução de incubação e o ensaio seguiu como descrito anteriormente. Foram estudados os tempos de 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 600 s de incubação, renovando-se as soluções de estudo a cada nova medida. A Figura 74 apresenta o gráfico de monitoramento do sinal de corrente de pico de oxidação do azul de

metileno em função do tempo de incubação do eletrodo. Observa-se que, há tempos de incubação superiores a 200 s, o azul de metileno adsorveu sobre a superfície eletródica de ouro e foi detectado durante a medida em solução trabalho. Para a segunda etapa de investigação, ou seja, o estudo efetuado com DNA nativo presente nas soluções de incubação, o sinal do azul de metileno foi detectado já em tempos superiores a 30 s.

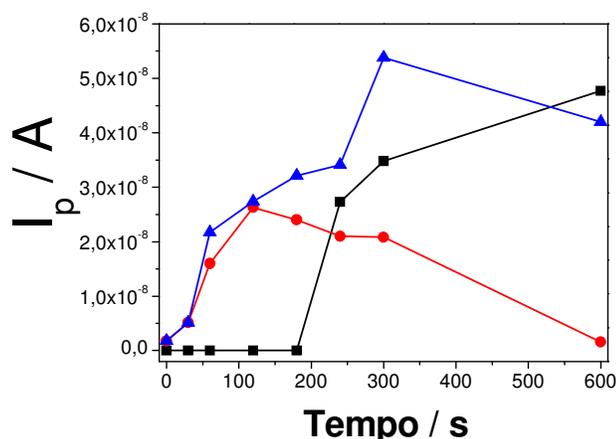


Figura 74. Sinal de corrente de pico de oxidação do azul de metileno em função do tempo de incubação. (—) Solução contendo azul de metileno ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$), (—) solução contendo azul de metileno e DNA ($6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$), com voltamogramas medidos após incubação em mesma solução e (—) solução contendo azul de metileno e DNA, com voltamogramas medidos após incubações em diferentes soluções.

Este fato possivelmente pode ter ocorrido pela alta capacidade que o corante possui de interagir com o DNA nativo, como demonstrado em etapas anteriores de investigação. Desta forma, o azul de metileno acumulou na estrutura do DNA, que por sua vez, sendo um poliânion, se adsorveu facilmente na superfície do eletrodo de ouro, levando consigo o corante, que então, sofreu os processos de oxidação, sendo detectado. Para tentar justificar esta proposta, foram efetuados vários ensaios de detecção do azul de metileno, após processos de incubação uma única solução de incubação. De acordo com a Figura 74, pode-se notar que a partir do tempo de 100 s, o sinal de oxidação do azul de metileno decaiu com o tempo, indicando que o material genético na solução estava sendo consumido e que o DNA nativo realmente foi o responsável pelo sinal do corante. Após estes estudos o tempo de 180 s foi selecionado como tempo de ensaio de incubação em que a molécula de azul de metileno poderia estar presente no meio de incubação, sem adsorver na superfície

do eletrodo e assim, sem apresentar sinais que poderiam interferir no sinal analítico pretendido, levando a falsos positivos.

O próximo passo foi selecionar uma metodologia de imobilização para o DNA de Calf Thymus sobre o eletrodo de ouro. Esta deveria ser fácil e rápida, visto que o objetivo era avaliar o azul de metileno como indicador de DNA de fita dupla sobre o eletrodo. Escolheu-se a imobilização por adsorção a potencial controlado, que se baseia na aplicação de um potencial de + 0,5 V ao eletrodo de trabalho em solução contendo DNA, por um tempo determinado. Com este potencial aplicado, o esqueleto açúcar-fosfato, negativamente carregado é facilmente adsorvido sobre o ouro.

Os tempos de 5 e 15 minutos foram investigados para aplicação do potencial. O eletrodo foi modificado com solução $18 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA nativo. O ensaio foi avaliado frente aos processos oxidativos de solução contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, antes e após a modificação do eletrodo. O gráfico da Figura 75 apresenta os voltamogramas relativos ao tempo de 15 min, no qual observa-se que o eletrodo foi modificado, tendo os valores de corrente diminuídos, bem como aumento da diferença de potencial de pico com o tempo de aplicação do potencial. O tempo de 15 min foi selecionado para a imobilização do DNA de Calf Thymus.

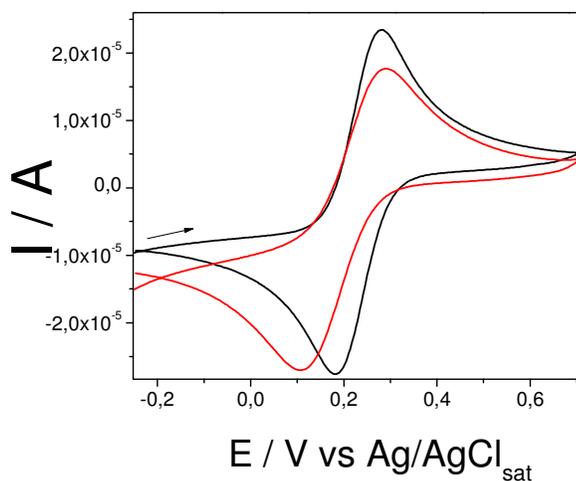


Figura 75. Voltamogramas cíclicos de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato. (—) CDtrodo, (—) CDtrodo/DNA 15 min de aplicação de potencial + 0,5 V em solução de Calf Thymus DNA $18 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Após os processos de imobilização efetuados, partiu-se para avaliar o azul de metileno como indicador eletroquímico. Um sinal inicial em solução tampão foi medido para o biossensor, por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial. Em seguida, este foi colocado em solução de incubação contendo azul de metileno ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$) pelo tempo de 180 s. Posteriormente, o eletrodo modificado foi lavado com água destilada e um segundo sinal foi tomado na solução trabalho (eletrólito). De acordo com o voltamograma cíclico apresentado na Figura 76, o sinal de corrente de pico relativo a oxidação do azul de metileno foi obtido em potencial de $-0,241 \text{ V}$, indicando que o corante foi detectado sobre o eletrodo modificado com DNA, por possível interação com o mesmo, visto que, no tempo pré-estabelecido, o azul de metileno não interage de forma significativa com a superfície de ouro. Esta ausência de interação enfatiza a vantagem de não ser necessário o bloqueio da superfície do eletrodo com relação ao indicador eletroanalítico.

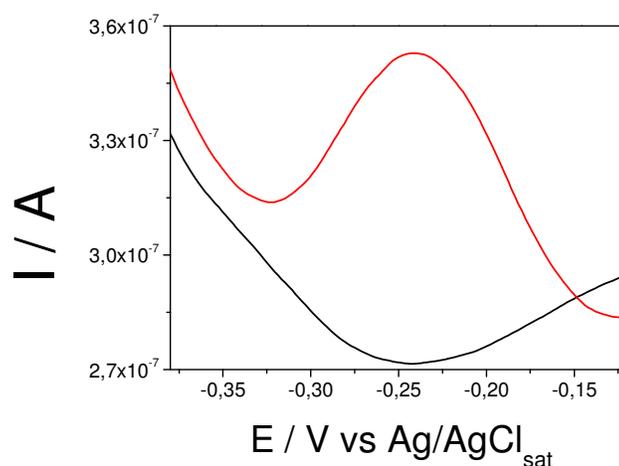


Figura 76. Voltamogramas de pulso diferencial em (—) tampão fosfato. (—) Oxidação do azul de metileno em sensor modificado com DNA, após 180 s, em solução de incubação.

De acordo com os dados da Figura 33, página 89, a modificação com monocamada de oligotiolado forneceu duas condições específicas de cobertura do CDtrodo, então, eletrodos foram modificados com as duas condições apresentadas anteriormente, sendo CD1, modificado com $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HS-DNA HCV 1 em tempo de 30 min e CD2, $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de HS-DNA HCV 1 em tempo de 90 min.

Estes eletrodos foram então utilizados para efetuar os estudos em amostras de soro sanguíneo de vírus da hepatite C, obtidas a partir de rotina laboratorial do núcleo de atendimento a comunidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara. As amostras foram amplificadas pela técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). Inicialmente o genossensor foi avaliado em solução tampão fosfato pH 7,2, via voltametria de pulso diferencial. Em seguida foi colocado em solução de hibridização, por 30 min. Esta solução continha amostra soropositiva de um genótipo específico, diluída 1:4 em tampão de hibridização apropriado (kit comercial para detecção de hepatite C, AMPLICOR®, versão 2.0, Roche). Os parâmetros de tempo e diluição para o procedimento de hibridização foram estabelecidos em estudos anteriores, pelo referido grupo de pesquisa em eletroanalítica do IQ-UNESP, no qual foi desenvolvida esta tese de doutorado.

Após o processo de hibridização, o eletrodo foi lavado (agitação em tampão, 3 min) e posteriormente colocado em solução de incubação por 3 min, contendo azul de metileno ($7 \mu\text{mol L}^{-1}$). Outra etapa de lavagem foi efetuada e o sensor foi então novamente avaliado, por pulso diferencial, em solução trabalho. A Figura 77A apresenta o sinal de corrente de pico ajustado em função do tipo de ensaio efetuado e a Figura 77B, o gráfico de voltametria de pulso diferencial relativos aos sinais analíticos para os ensaios C e F discutidos na Figura 77A.

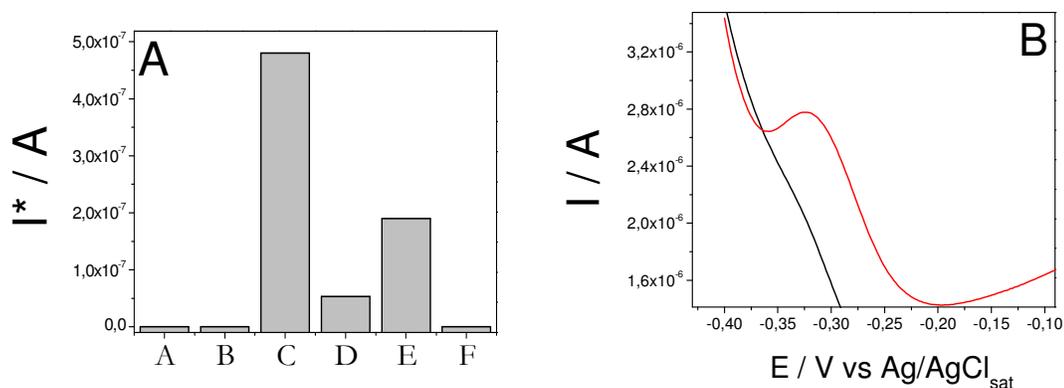


Figura 77. A) Sinal de corrente de oxidação do azul de metileno sobre eletrodo de ouro. (A)- CD sem modificação. (B)- CD1/HS-DNA HCV 1. (C)- CD1/HS-DNA HCV 1 + amostra positiva HCV 1. (D)- CD2/HS-DNA HCV 1. (E)- CD2/HS-DNA HCV 1 + amostra positiva HCV 1. (F)- D1/HS-DNA HCV 1 + amostra positiva HCV 2b. **B)** Voltametria de pulso diferencial. Genossensor + (—) amostras soropositiva e (—) negativa de HCV.

O ensaio com CD limpo, sem modificação (A) não apresentou corrente de pico pronunciada, ratificando o fato de que o azul de metileno não adsorve sobre o ouro, no tempo de 3 min de incubação. O ensaio (B) mostrou que o corante também não apresentou afinidade significativa para com a fita simples de DNA, que também não apresentou sinal analítico positivo. O sinal de oxidação do azul de metileno foi detectado no eletrodo do ensaio (C), ou seja, aquele em que o processo de hibridização foi efetuado em presença de amostra soropositiva de HCV 1. O sinal de corrente de pico foi bem diferenciado dos demais, indicando que as condições do CD1 ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, 30 min) são bastante propícias para a construção do genossensor. No ensaio (D), um baixo sinal analítico foi observado para o eletrodo modificado com $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, 90 min, antes mesmo do processo de hibridização, o que evidencia que o azul de metileno interagiu com o material genético, possivelmente por conta de uma grande quantidade de oligonucleotídeo sobre a superfície de ouro.

Quando se efetuou o processo de hibridização para este eletrodo (E), um sinal analítico de corrente de pico foi observado, em intensidade maior que o encontrado no ensaio (D). Isto significa que a diferença entre estes valores mostra que a detecção de amostras soropositivas, nas condições do CD2 ($1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, 90 min) pode ser efetuada. Porém, o sinal foi de menor intensidade quando comparado com as condições apresentadas para o CD1, possivelmente pelo fato já citado do excesso de material genético, que pode ter dificultado o processo de hibridização, visto que a fita complementar de DNA necessita de espaço suficiente para interagir com a fita imobilizada. Uma vez que a superfície do eletrodo continha “excesso” de material, uma baixa quantidade de fita complementar hibridizou, o que foi indicado pelo menor sinal de oxidação relativo ao azul de metileno sobre ouro. Neste aspecto, as condições apresentadas no CD1 foram definidas como apropriadas para a construção do genossensor. Como ensaio final desta etapa de trabalho (F), este genossensor assim definido foi avaliado frente a uma amostra soropositiva referente a outro genótipo da hepatite C, no caso, uma amostra do genótipo 2b. Como apresentado na Figura 77, não foi evidenciado sinal analítico positivo para o ensaio (F), ou seja, o genossensor assim construído foi capaz de diferenciar entre duas amostras soropositivas de vírus da hepatite C de diferentes genótipos.

É interessante ressaltar que o corante azul de metileno tem sido associado à detecção de processos de hibridização pela diminuição do sinal eletroanalítico do mesmo, porém estudos em que o aumento de sinal do composto ocorre também tem sido reportados. Esta diferença de comportamento esta associada às condições de trabalho, como força iônica e razão molar entre o corante e o DNA trabalhado (ERDEM et al., 2002; GU et al., 2002; ZHU et al., 2008).

14.2 Complexos de Cobre.

De acordo com os dados obtidos para o genossensor que fez uso de azul de metileno como composto indicador do processo de hibridização, objetivou-se também, fazer uso da técnica de voltametria de pulso diferencial para o monitoramento de corrente de pico do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. O composto foi primeiramente estudado em tampão fosfato, em varredura anódica. Em uma primeira avaliação, observou-se que, quando se trabalhou com baixas concentrações do complexo, apenas um pico de oxidação foi detectado em potencial de + 0,145 V, sendo que, com o aumento da concentração deste composto em solução, um pico de oxidação em - 0,105 V também foi detectado, chegando a valores de corrente mais elevados, até mesmo que o pico positivo, quando concentrações dez vezes maiores que as iniciais foram analisadas (Figura 78). Possivelmente, estes dois picos possuem uma dependência mútua, o que interfere na corrente de picos dos mesmos quando se trabalha com variação de concentração no meio eletródico.

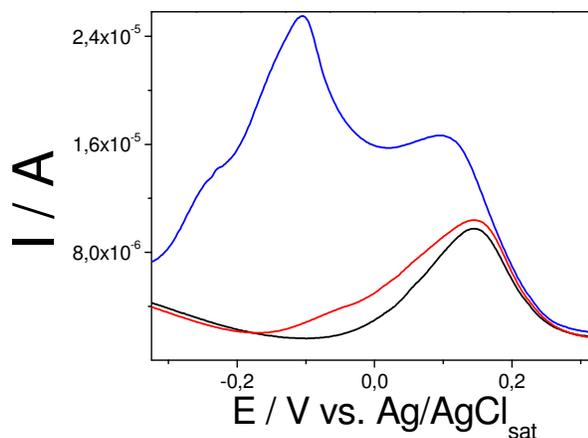


Figura 78. Voltametria de pulso diferencial em eletrodo de ouro, composto $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ (—) 0,4; (—) 0,8 e (—) 4,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em meio de tampão fosfato pH7,2.

De acordo com os dados anteriores, o composto de cobre apresentou caráter adsorptivo sobre o eletrodo de ouro. Para melhor entendimento destes processos, um novo voltamograma foi obtido, porém, com solução contendo somente o eletrólito. De acordo com a Figura 79, observa-se claramente um pico de oxidação em potencial de + 0,14 e outro de pequena intensidade em + 0,34 V, relativos ao complexo de cobre, que se adsorveu sobre a superfície do ouro, sendo detectado no meio de trabalho que não continha o complexo em solução. Não foi observado nenhum pico de oxidação na região de potencial em torno de - 0,100 V. Estes dados indicam que a aplicação da varredura de potencial favoreceu a adsorção do complexo sobre a superfície do eletrodo de ouro.

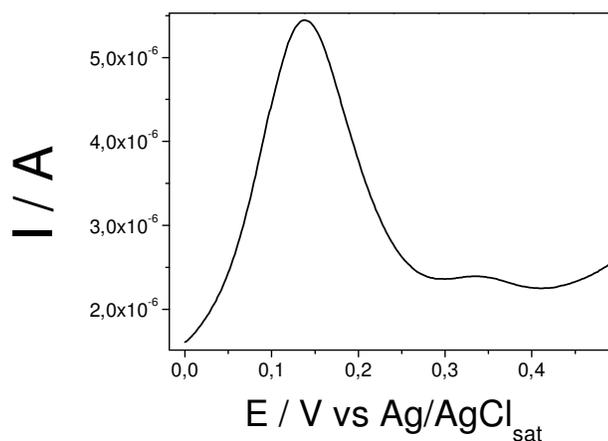


Figura 79. Voltamograma de pulso diferencial obtido em eletrodo de ouro em meio de tampão fosfato pH 7,2, após estudo com composto $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$.

Foram então efetuados ensaios de lavagem da superfície, buscando retirar o material adsorvido. Foram propostos os ensaios seguintes: lavagem com água destilada e lavagem com solução alcoólica (1:1). A lavagem com água destilada não foi eficiente, eliminando em torno de 25% do material adsorvido. Para a lavagem com solução alcoólica, observou-se que a simples rinsagem sobre a superfície do eletrodo foi mais eficiente que a lavagem com água, retirando em torno de 60% de material adsorvido. Partindo destes dados, avaliou-se a lavagem com solução alcoólica por meio de agitação, em tempo pré-estabelecido. Os tempos de 5, 10 e 20 min de agitação foram avaliados, sendo o tempo de 10 min o mais eficiente, retirando em torno de 98% do material adsorvido sobre o ouro, visto que o tempo de

5 min retirou em torno de 83% deste material e no tempo de 20 min não se obteve resultado distinto do tempo de 10 min (Figura 80). A metodologia efetuada retirou o excesso de material adsorvido sobre a superfície do eletrodo de ouro, disponibilizando o eletrodo para reutilização em outras etapas de trabalho.

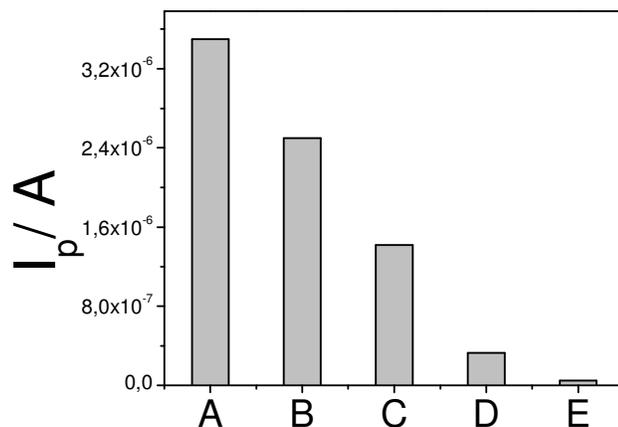


Figura 80. Valores de corrente de pico em função dos ensaios de lavagem da superfície de ouro adsorvida com complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. A) Sem lavagem, B) rinsagem com água, C) rinsagem com solução água/etanol (1:1), D) agitação com solução água/etanol (1:1) por 5 minutos, E) agitação com solução água/etanol (1:1) por 10 minutos.

A segunda etapa do estudo de adsorção foi avaliar o grau de adsorção por simples contato do eletrodo com solução contendo indicador eletroativo, sem aplicação de potencial. O parâmetro investigado foi o tempo de contato do CDtrodo com a solução. Foram estudados os tempos de: 0, 10, 30 e 60 min de incubação em soluções contendo distintas concentrações de complexo. O eletrodo foi lavado rapidamente com água destilada antes da medida, para retirada de excesso de material. Pela Figura 81, observa-se que, já no tempo zero de incubação, que constou de um rápido mergulho do eletrodo na solução trabalho, o sinal de corrente de pico relativo ao complexo foi detectado, para todas as concentrações trabalhadas. Para os demais tempos, notou-se um aumento do sinal de corrente para com o aumento do tempo de incubação. Com relação as concentrações trabalhadas, pode se dizer que o sinal analítico detectado foi muito próximo para os valores de 1,15 e 2,30 $\mu\text{mol L}^{-1}$, diferenciando apenas para a concentração de 4,60 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

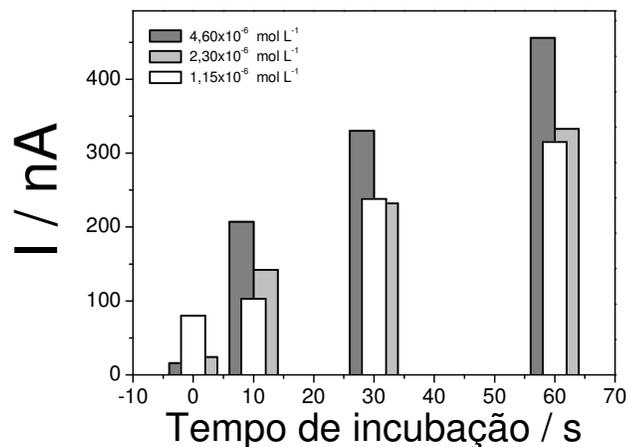


Figura 81. Valores de corrente de pico em função do tempo de incubação e da concentração do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ em solução.

Os dados aqui apresentados refletem um alto grau de adsorção do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ sobre a superfície de ouro do eletrodo. Como a proposta da construção do genossensor implicou em fazer uso de um indicador eletroanalítico que tivesse interação, de maneira distinta, entre o eletrodo modificado com fita simples e o modificado com fita dupla, esperava-se que os valores do sinal analítico monitorado fossem bastante distintos entre si, que pudessem evidenciar a formação da dupla fita e assim, comprovar o sinal positivo de diagnóstico. Esta afinidade do complexo para a superfície eletródica poderia interferir drasticamente no sinal analítico requerido. A partir desta premissa, foi requerido um estudo de bloqueio da superfície de ouro.

14.3 Estudo de Bloqueio.

A etapa de bloqueio da superfície eletródica constitui uma etapa muito empregada em ensaios imunológicos e tem sido bem adaptada à construção de biossensores em geral. O objetivo tem sido efetuar o bloqueio da superfície para que adsorções inespecíficas não ocorram no estudo proposto, pois estas podem levar a sinais analíticos que refletem dados errôneos na análise efetuada, até mesmo a falsos positivos, por exemplo. Este bloqueio não representa uma inativação da superfície, pois, as moléculas utilizadas para este fim (eletricamente inativas nas condições do estudo) são geralmente moléculas grandes, mas que por sua vez,

espaços estão disponibilizados entre as mesmas para que a transferência eletrônica ocorra satisfatoriamente. Para esta etapa de trabalho, dois tipos específicos de agentes de bloqueio foram avaliados: o esperma de salmão e a albumina de soro bovino.

14.3.1 Avaliação do Bloqueio com Esperma de Salmão.

O esperma de salmão tem sido utilizado para minimizar os sinais de background em processos de hibridização de sondas de DNA. O protocolo do fabricante do composto indica a faixa de concentração entre 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a ser trabalhada. As soluções de bloqueio foram preparadas nas seguintes concentrações: 10, 20, 30, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sobre o CDtrodo foi gotejado 10 μL da solução e deixado em repouso por 30 min, a temperatura ambiente, em placa de Petri. Posteriormente, foi lavado por mergulho em solução tampão fosfato pH 7,2 e colocado em solução de incubação, contendo o complexo de cobre ($1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$). Em seguida, foi novamente lavado como descrito e o sinal analítico foi medido pela técnica de voltametria de pulso diferencial, em meio de tampão fosfato em tempo de 10 s de incubação. A Figura 82 apresenta o gráfico das voltametrias de pulso diferencial para os ensaios de bloqueio empregando as soluções de concentrações de 30 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

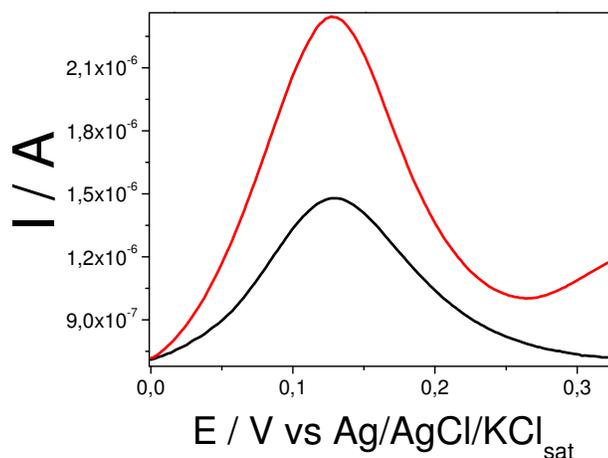


Figura 82. Voltametria de pulso diferencial em meio de tampão fosfato pH 7,2. Sinal de oxidação do complexo adsorvido sobre ouro após bloqueio com esperma de salmão. (—) 30 e (—) 10 $\mu\text{g/mL}$.

No geral, o estudo evidenciou que, ao invés do bloqueio de sinal, um ganho substancial no sinal de corrente foi obtido (Figura 83). Este fato pode indicar que exista uma interação forte entre o complexo de cobre e o esperma de salmão. Apesar deste material ser útil na etapa de hibridização, para evitar adsorção de seqüências inespecíficas na superfície do eletrodo, não se tornou eficiente no caso aqui estudado, com monitoramento efetuado por este complexo, pois o mesmo interage de forma significativa com o agente de bloqueio. O esperma de salmão seria mais bem empregado em estudos que fazem uso de oligonucleotídeos marcados com enzimas.

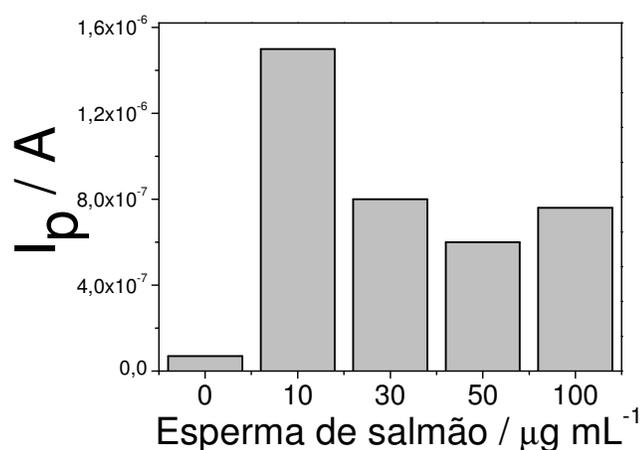


Figura 83. Corrente de pico do complexo de cobre em função da concentração de esperma de salmão utilizado no bloqueio da superfície de ouro.

14.3.2 Avaliação do Bloqueio com BSA

A molécula de albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína muito utilizada como agente de bloqueio de superfícies em estudos de biossensores, sendo então selecionada para o teste de bloqueio com o complexo de cobre em estudo (PIVIDORI, 2002). O bloqueio foi efetuado por aplicação de 10 μL de solução bloqueante (BSA) sobre a superfície do eletrodo, a temperatura ambiente, permanecendo por 30 min em placa de Petri. Posteriormente o eletrodo foi lavado com tampão fosfato, por mergulho em solução tampão. Em seguida foram efetuados os ensaios de incubação. Trabalharam-se os tempos de 0, 10, 30 e 60 seg, bem como as concentrações da solução de bloqueio de 0,1; 0,5 e 1% de albumina de

soro bovino. A concentração da solução do indicador (complexo) foi de $2,3 \mu\text{molL}^{-1}$. Os testes de avaliação de bloqueio da superfície de ouro foram efetuados com voltametria de pulso diferencial, avaliando-se o sinal de corrente de pico de oxidação do complexo adsorvido no eletrodo após incubação.

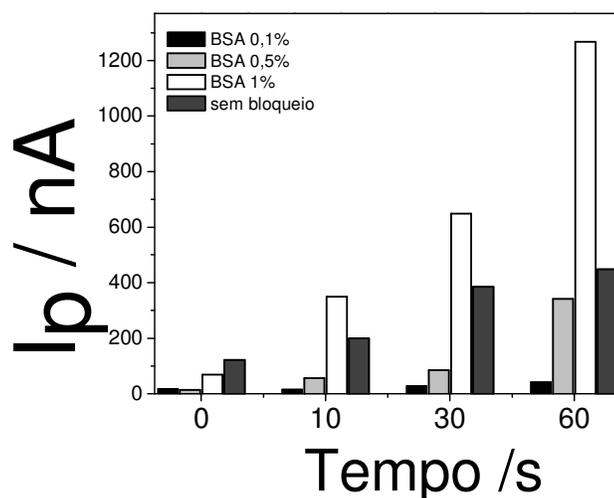


Figura 84. Valores de corrente de pico de oxidação do complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ adsorvido sobre a superfície de ouro em função da concentração de bloqueio e do tempo de incubação.

Pela Figura 84 observa-se um bom bloqueio da superfície de ouro, à baixas concentrações de BSA, diminuindo o valor do sinal de corrente. O aumento da concentração da solução de bloqueio acarretou em um aumento do sinal de corrente de pico, como observado para os tempos a partir de 10 s de ensaio, em que o sinal de corrente relativo ao bloqueio foi maior que o sinal de base do próprio complexo adsorvido sobre a superfície não modificada do CDtrodo, o que evidenciou a possibilidade da interação do complexo de cobre com a molécula de albumina, como foi descrito para o esperma de salmão.

Para contornar esta evidencia, a proposta seguinte foi avaliar o sinal de corrente do eletrodo modificado com a monocamada de tiol-DNA, bloqueado com BSA. Visto que a própria modificação com oligonucleotídeo recobriu uma faixa acima de 35% da área ativa da superfície do eletrodo de ouro, o bloqueio efetuado sobre esta superfície já modificada poderia acarretar em um bloqueio mais eficiente do que quando se tentou bloquear uma área não modificada com a monocamada. O eletrodo foi primeiramente modificado com solução de oligotiol $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, por 30

min a temperatura ambiente. Para este ensaio foi utilizado também o detergente tween 20, surfactante que tem sido utilizado, em imunoenaios, como auxiliador da BSA em ensaios de bloqueio, estabilizando a albumina. O detergente foi adicionado na concentração de 0,05% a uma solução 0,5% de BSA. Posteriormente, o ensaio de bloqueio seguiu como descrito em etapas anteriores e a incubação foi efetuada em solução de complexo de $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$, por 10 s de tempo. A concentração do complexo foi diminuída objetivando um baixo sinal analítico mensurável. As lavagens foram efetuadas por mergulho em solução tampão, após cada etapa de modificação, bloqueio e incubação. A Figura 85 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial relativos ao CDtrodo, CDtrodo/HS-DNA e CDtrodo/HS-DNA/BSA-tween.

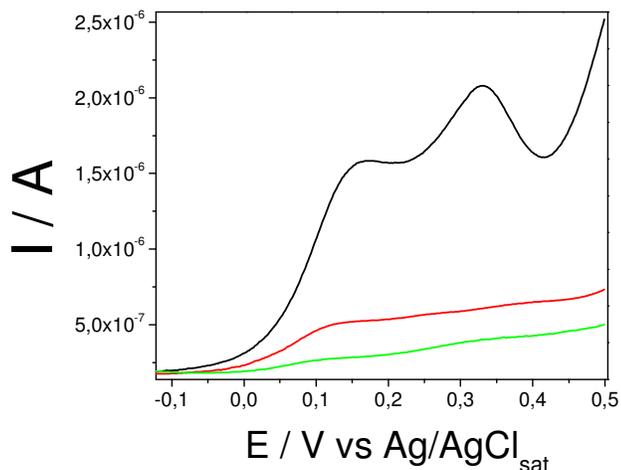


Figura 85. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato pH 7,1 após ensaio de incubação com complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tempo de incubação = 10s. (—) CDtrodo, (—) CDtrodo/HS-DNA e (—) CDtrodo/HS-DNA/BSA-tween.

Para o voltamograma sem bloqueio, observou-se a formação de dois picos de oxidação possivelmente devido ao complexo de cobre. Para a modificação com a monocamada, foi mostrado que a mesma auxiliou no bloqueio da superfície, como esperado. Este fato enfatiza que a quantidade recoberta pela monocamada pode ser maior que 35%. Após utilizar o BSA-tween, observou-se que o bloqueio se mostrou eficiente, de modo a evitar os processos de adsorção do complexo pelo contato com o CD. Destes dados, conclui-se que o bloqueio com BSA foi mais eficiente que o bloqueio com esperma de salmão, por isto foi selecionado para os estudos posteriores.

15 APLICAÇÃO

Depois de otimizadas as construções básicas do genossensor, o passo seguinte foi avaliar a sua aplicação em sequências padrões de oligonucleotídeos (sequências sintéticas). Foram adquiridas duas sequências, sendo uma específica complementar do genótipo de HCV 1 e outra não complementar. A proposta então foi avaliar uma faixa de trabalho para a concentração de sonda complementar. Primeiramente o eletrodo foi modificado e bloqueado com as condições otimizadas, sendo a modificação: 10 μL de solução 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de HS-DNA adicionados ao eletrodo, por 30 min e o bloqueio foi constituído de adição de 10 μL de solução contendo 0,5% de BSA e 0,05% de tween, sendo bloqueio efetuado por tempo de 30 min. As lavagens foram efetuadas por mergulho em solução tampão pH 7,1, a cada etapa de modificação. O eletrodo foi então mergulhado em tubo eppendorf, contendo 1000 μL de solução de oligonucleotídeo alvo, em concentrações definidas e o procedimento de hibridização foi efetuado a temperatura ambiente, por 30 min, em tampão de hibridização. A solução BSA-tween foi mantida na etapa de hibridização, objetivando compensar as perdas de bloqueio por lixiviação. Efetuou-se a lavagem do eletrodo e o mesmo foi mergulhado em solução de incubação contendo complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ na concentração 1,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por tempo de 10s, sendo posteriormente efetuada a medida voltamétrica. Inicialmente, os seguintes valores de concentração foram investigados: 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10 e 25 nmol L^{-1} . Para estes ensaios, nenhum pico foi pronunciado. Posteriormente, buscou-se avaliar os valores de 50, 100, 125, 150, 175 e 200 nmol L . Observa-se pela Figura 86 os voltamogramas para os referidos ensaios. Observou-se que apenas o pico em + 0,4 V foi pronunciado no estudo.

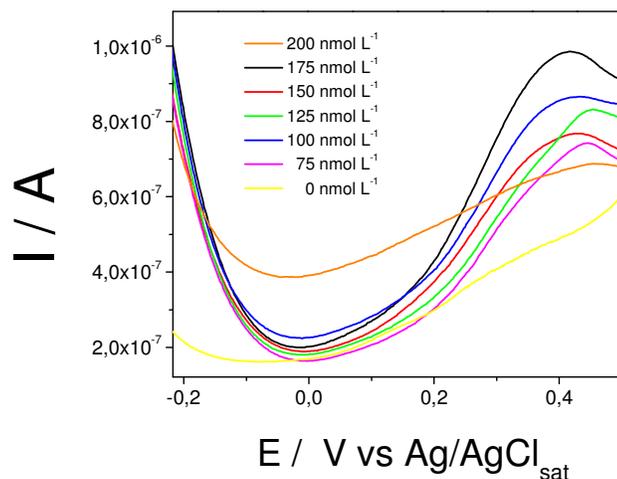


Figura 86. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato. Avaliação da concentração de sequencia complementar no ensaio de hibridização do eletrodo modificado com sonda de HCV 1.

No gráfico da Figura 87 estão apresentados os valores de corrente de pico para os ensaios efetuados. A concentração de 175 nmol L^{-1} forneceu o maior valor de corrente de pico obtido e os demais valores de concentração apresentaram valores semelhantes.

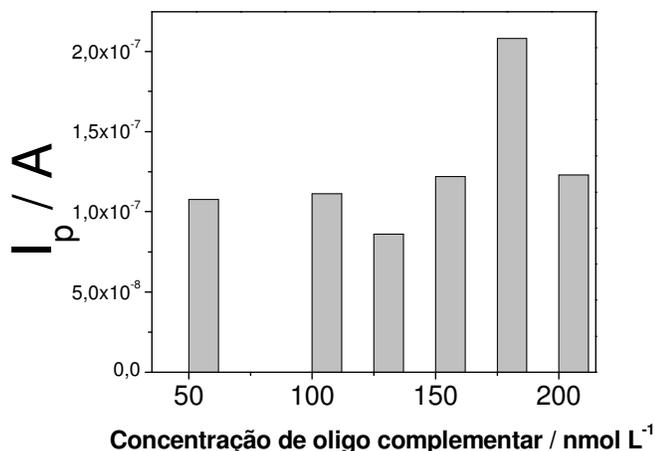


Figura 87. Valores de corrente de pico em função da concentração da sequencia complementar de HCV 1.

A partir destes dados buscou-se avaliar o sinal referente ao genossensor em presença de sonda não complementar, avaliando-se a influencia da mesma na detecção analítica. Foram estudadas concentrações entre 100 e 200 nmol L⁻¹. Observa-se pelo gráfico da Figura 88 um aumento de corrente de pico para com o aumento da sequencia não complementar de HCV. Este aumento também evidenciou um alargamento do pico de oxidação.

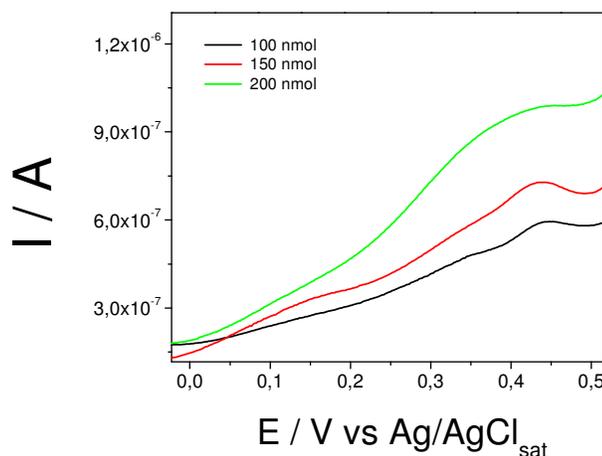


Figura 88. Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato. Avaliação da concentração de sonda não complementar de HCV no ensaio de hibridização.

Quando se avaliaram as intensidades de corrente de pico para os ensaios de sequencia complementar e não complementar, pode-se observar que, quando se trabalhou com as concentrações de 100 nmol L⁻¹, a diferença entre os valores foi mais pronunciada, que para 150 e 175 nmol L⁻¹. Já para 200 nmol L⁻¹, obtiveram-se praticamente os mesmos resultados para corrente de pico (Figura 89). A diferença de sinal analítico entre a seqüência complementar e a não complementar foi superior a 50%, para o ensaio em 100 nmol L⁻¹, sendo este, considerado um valor discrepante, que pode ser utilizado como sinal de base para confirmação do processo de hibridização via avaliação de oligonucleotídeos.

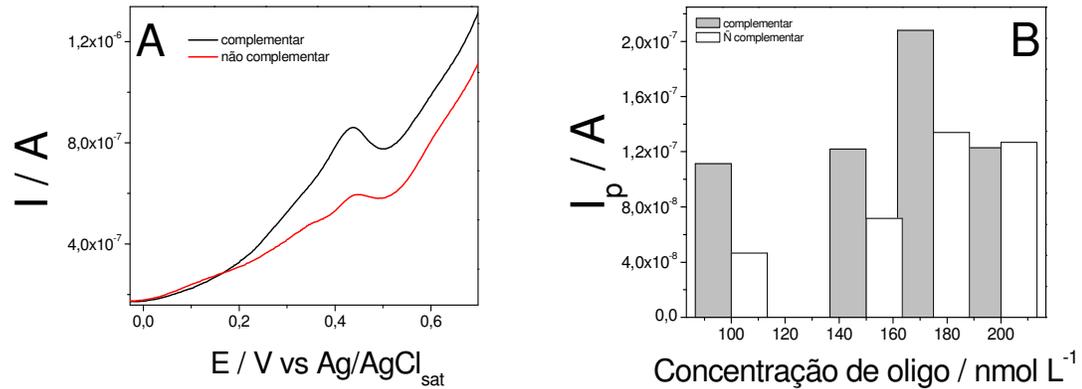


Figura 89. A) Voltametria de pulso diferencial em tampão fosfato. Avaliação do sinal entre a sequência complementar e a não complementar, no ensaio de hibridização. B) valores de corrente de pico para as seqüências complementares e a não complementares.

Desta forma, pode se enfatizar que o genossensor foi mais eficiente para a detecção de oligonucleotídeos específicos do vírus da hepatite C do genótipo 1, nas seguintes condições otimizadas:

- i) Modificação: 10 μL de solução 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de oligonucleotídeo tiolado HCV 1, por 30 min, a temperatura ambiente;
- ii) Bloqueio: com solução contendo albumina de soro bovino 0,5%/tween 0,05%, por 30 min, a temperatura ambiente;
- iii) Oligo complementar: em faixa de concentração de 100 a 175 nmol L^{-1} .
- iv) Incubação: indicador eletroativo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$, na concentração 1,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, por tempo de 10s.
- v) Medida: voltametria de pulso diferencial em meio de tampão fosfato pH 7,2.

Como complementação do trabalho foram efetuados estudos de detecção de amostras reais obtidas pela Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Foram amostras amplificadas (PCR) de soro sanguíneo de pacientes, contendo avaliações negativas e positivas para a virose hepatite do tipo C. Para tanto, inicialmente, foram avaliadas cinco amostras controle (amostras negativas para a virose). Os CDtrodos foram modificados nas condições otimizadas, sendo então, colocados em solução de hibridização por 30 min. A amostra foi inserida neste meio em proporção de diluição

de 1:4. Posteriormente foi efetuada a etapa de incubação com complexo de cobre e o sinal foi medido posteriormente. A Figura 90 apresenta um voltamograma de pulso diferencial para uma destas amostras.

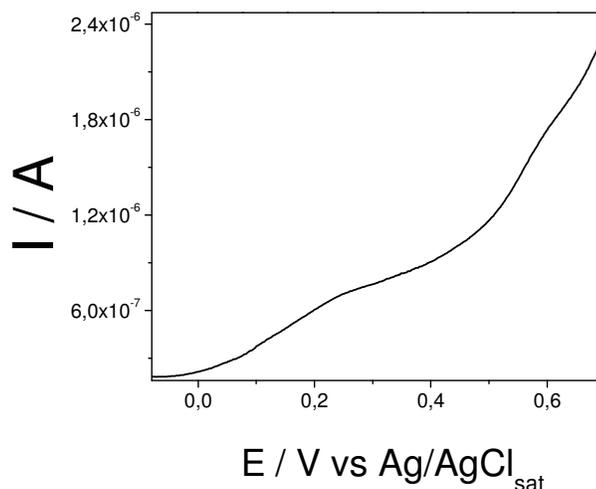


Figura 90. Voltametria de pulso diferencial com CDtrodo de ouro, em meio de tampão fosfato e amostra negativa de HCV, após 10 s de incubação com $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Percebe-se que um baixo sinal de pico foi observado para esta amostra, o que também foi observado para as demais avaliadas. O gráfico de barras seguinte apresenta os valores de corrente de pico para estes ensaios descritos para as amostras controles (Figura 91). A média dos valores de corrente foi de 50 nA, com desvio padrão de 25%. Os valores de sinal analítico obtidos podem estar refletindo um somatório entre os baixos sinais de adsorção do complexo sobre o ouro (que não se encontra 100% bloqueado) e os valores de intensidade de corrente relativos a possíveis interações entre o indicador eletroativo e substâncias contidas no soro sanguíneo, que podem ter interagido com o eletrodo modificado. O soro é formado a partir de plasma de sangue, em que são retirados os fatores de coagulação. Este plasma é o componente líquido do sangue, que contém em torno de 92% de água, 7% de proteínas, além de outras substâncias em menores quantidades, que podem ser nutrientes, hormônios, enzimas e gases dissolvidos (1%) (ISSAQ; XIAO; VEENSTRA, 2007).

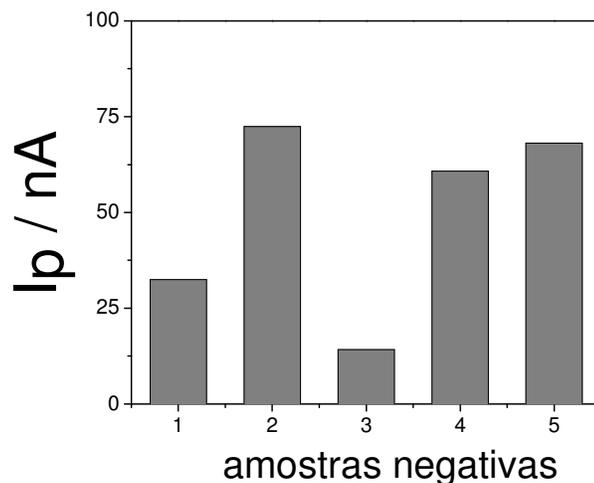


Figura 91. Valores da intensidade de corrente de pico com relação aos ensaios com amostras negativas (HCV) de soro sanguíneo.

Seguidamente, três amostras positivas para virose HCV foram avaliadas pelo genossensor. Uma amostra do genótipo 1a, uma amostra do genótipo 1b e uma do genótipo 3b. A Figura 92 apresenta o gráfico para uma amostra negativa e a amostra do genótipo 1b, onde se observaram distintos sinais para os mesmos.

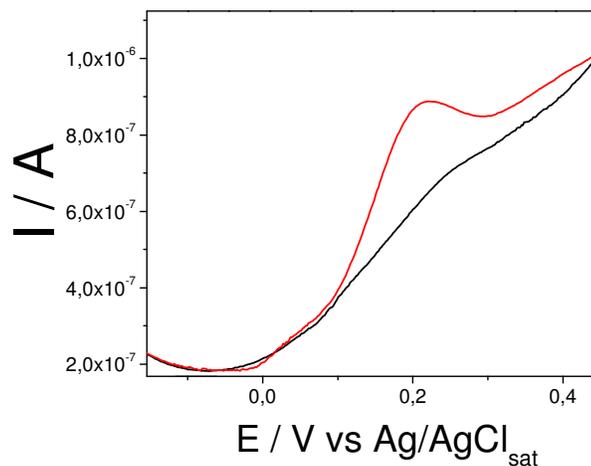


Figura 92. Voltametria de pulso diferencial em meio de tampão fosfato após incubação com solução de complexo de cobre $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ $1,15 \mu\text{mol L}^{-1}$. (—) amostra negativa e (—) amostra de genótipo 1b.

A Figura 93 apresenta um gráfico que resume os valores de corrente de pico para os distintos ensaios com as amostras negativas e positivas. Observou-se que os sinais analíticos para as amostras contendo genótipo do tipo 1 foram distinguíveis dos sinais para os ensaios de controle. A amostra contendo genótipo do tipo 3b forneceu sinal analítico na faixa de valores do ensaio de controle, indicando, então que o genossensor foi eficiente para detectar em amostras de soro sanguíneo o DNA relativo ao vírus da hepatite C, distinguindo entre genótipos específicos da viremia.

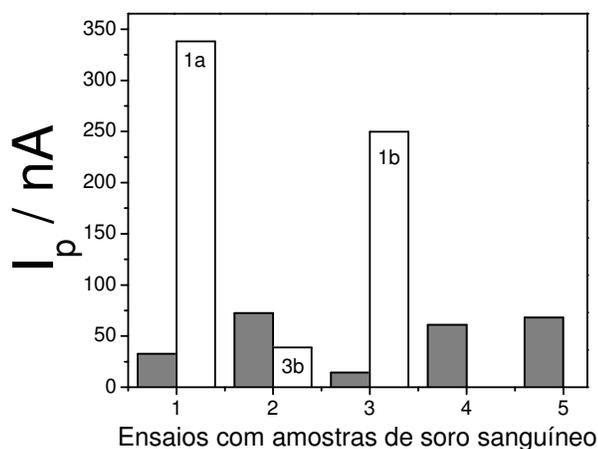


Figura 93. Valores da intensidade de corrente de pico em função de amostras positivas e negativas de HCV em soro sanguíneo.

A diferença entre os valores de corrente de pico para amostras positivas e negativas foi muito mais pronunciada quando se compara com os valores para sequências sintéticas. Este dado pode ser explicado, provavelmente pelo fato das sequências amplificadas contidas no soro sanguíneo serem bem maiores que as de oligonucleotídeos comerciais, implicando em uma maior interação entre o composto indicador eletroanalítico e o material genético. Esta proposta implica na evidência de que o complexo $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ pode estar interagindo de distintas maneiras com o DNA em estudo.

16 CONCLUSÕES

A construção do CDtrodo com fita de galvanoplastia foi de fácil preparo, aumentando a versatilidade do uso destes sensores que podem ser aplicados em estudos em meio contendo álcool, por exemplo. As técnicas eletroanalíticas e microscópicas foram fundamentais para a caracterização deste CDtrodo modificado.

A monocamada de ácido mercaptopropiônico apresentou pico de oxidação em potenciais próximos da região proposta para avaliação do sinal de oxidação da guanina. A cobertura de MPA foi estimada em valores acima de 30% sobre a superfície de ouro do CD, sendo suficiente para os procedimentos de imobilização propostos. O estudo relativo à ligação estreptavidina biotina tem demonstrado que os CDtrodos podem ser plataformas viáveis para modificações com monocamadas auto montadas, bem como para a construção de biossensores baseados em enzimas imobilizadas. A eficiente imobilização orientada da enzima HRP indica que o sistema poderia ser empregado para a construção de genossensores eletroquímicos, via imobilização orientada de oligonucleotídeos específicos previamente modificados com biotina. A monocamada construída com DNA tiolado foi de fácil preparo e caracterização, levando a um eficiente valor de cobertura de superfície (acima de 30%). A técnica de microscopia de fluorescência foi eficiente para o monitoramento da distribuição espacial da monocamada sobre a superfície de ouro e evidenciou a formação de aglomerados. A monocamada de DNA tiolado foi escolhida para os processos de imobilização do material genético.

Os compostos azul de metileno, azul de meldola, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{NN})_2$ apresentaram picos de oxidação em baixos potenciais quando comparados aos valores relativos a oxidação do DNA. Fortes processos de adsorção sobre o eletrodo foram evidenciados para os compostos estudados, exceto para o azul de metileno. A metodologia espectrofotométrica utilizada no presente estudo foi fundamental para propostas de entendimento da interação entre os compostos estudados e o DNA de Calf Thymus, indicando fortes processos de interação entre este material genético e os compostos azul de metileno e $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$. Acredita-se que o azul de metileno tenha interagido com o DNA de duas maneiras distintas, sendo por intercalação ou por atração eletrostática, dependendo da razão molar entre este e o DNA imobilizado. Já para o complexo é possível que este tenha interagido com o DNA de distintas maneiras.

O estudo com molécula de guanosina foi efetuado buscando o entendimento dos processos ocorrentes com a guanina. Embora a guanosina tenha sido detectada pela técnica de voltametria de pulso diferencial, o sinal da guanina não foi satisfatório quando se avaliou o material genético nativo, provavelmente por conta dos impedimentos estruturais que a mesma apresenta, estando presente na estrutura do DNA. Desta forma, o monitoramento do processo de hibridização via oxidação direta do DNA foi descartado para este estudo.

O azul de metileno e o $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2(\text{en})_2$ foram avaliados como indicadores eletroativos para o genossensor. O estudo de bloqueio da superfície do CDtrodo demonstrou que a solução de BSA/tween foi eficiente para evitar a interação do complexo de cobre com a superfície de ouro, minimizando as regiões disponíveis para esta interação. Para o azul de metileno este bloqueio não se fez necessário, visto que no tempo de incubação otimizado para o estudo, o azul de metileno não adsorveu sobre o eletrodo. Os genossensores baseados na confirmação do processo de hibridização via indicadores eletroanalíticos foram capazes de distinguir entre diferentes genótipos de vírus da hepatite C, em amostras soro sanguíneo amplificadas, demonstrando a versatilidade do CDtrodo na construção de biossensores do tipo mono uso.

17 PROPOSTAS

Para trabalhos futuros, as seguintes propostas são sugeridas:

- I) Testar a real viabilidade do CDtrodo de fita em meio misto.
- II) Avaliar os possíveis processos de transferência eletrônica direta da enzima HRP sobre a monocamada de ácido mercaptopropiônico;
- III) Efetuar estudos de espectrofotometria de fluorescência e dicroísmo circular para melhor entendimento da interação entre o DNA e as moléculas estudadas.
- IV) Estudar o uso de espaçadores para a construção de monocamadas de DNA tiolado com melhor distribuição espacial;
- V) Aplicar a metodologia desenvolvida para um número maior de amostras de soro sanguíneo, determinando o valor de cut off e avaliando outros genótipos.

REFERÊNCIAS

ABAD-VALLE, P.; FERNÁNDEZ-ABEDUL, M. T.; GARCÍA, A. C. Genosensor on gold films with enzymatic electrochemical detection of a SARS virus sequence. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n.11, p. 2251-2260, May 2005.

ADAMS, R. L. P.; SKNOWLER, J. T.; LEADER, D. P. **Biochemistry of the nucleic acids**. 11th ed. London: Chapman & Hall, 1992.

AGUI, L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRON, J. M. Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, n. 1-2, p. 11-47, Aug. 2008.

AKAHANE, Y.; KOJIMA, M.; SUGAI, Y.; SAKAMOTO, M.; MIYAZAKI, Y.; TANAKA, T.; TSUDA, F.; MISHIRO, S.; OKAMOTO, H.; MIYAKAWA, Y.; MAYUMI, M. Hepatitis C virus infection in spouses of patients with type C chronic liver disease. **Annals of Internal Medicine**, v. 120, n. 9, p. 748-52, May 1994.

AKRAM, M.; STUART, M. C.; WONG, D. K. Y. Direct application strategy to immobilize a thioctic acid self-assembled monolayer on gold electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, n. 2, p. 243-251, Feb. 2004.

ALTER, M. J. Epidemiology of Hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 62s-65s, Dec. 1997.

ANGNES, L.; RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H. Gold electrodes from recordable CDs. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5503-5506, Sept. 2000.

ARAUJO, E. S. A.; COURTOUKE, C.; BARONE, A. A. Hepatitis C treatment: shorter and better? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 118-124, fev. 2007.

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. Recent advances in cholesterol biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 7, p.1083-1100, Feb. 2008.

BALDESSAR, M. Z.; BETTIOL, J.; FOPPA, F.; OLIVEIRA, L. H. C. Hepatitis C risk factor for patients submitted to dialysis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 12-15, fev. 2007.

BAN, C.; CHUNG, S.; PARK, D. S.; SHIM, Y-B. Detection of protein–DNA interaction with a DNA probe: distinction between single-strand and double-strand DNA–protein interaction. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 13, p. 1-8, July 2004.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and Applications**. New York: Wiley, 2001.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BERNEY, H.; WEST, J.; HAEFELE, E.; ALDERMAN, J.; LANE, W.; COLLINS, J. K. A DNA diagnostic biosensor: development, characterization and performance. **Sensors and Actuators B**, v. 68, n. 1-3, p. 100-108, Aug. 2000.

BIEBRICHER, A.; PAUL, A.; TINNEFELD, A. P.; GÖLZHÄUSER, A.; SAUER, M. Controlled three-dimensional immobilization of biomolecules on chemically patterned surfaces. **Journal of Biotechnology**, v. 112, n. 1-2, p. 97-107, Aug. 2004.

BISHOP, M. J.; RAWLINGS, C. J. **DNA and protein sequence analysis**: a practical approach. Oxford: IRL Press, 1997.

BLUM, L. J.; COULET, P. R. **Biosensors**: principles and applications. New York: Marcel Dekker, 1991.

BOAL, A. K.; BARTON, J. K. Electrochemical detection of lesions in DNA. **Bioconjugate Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 312-321, Mar. 2005.

BOISDÉ, G.; HARMER, A. **Chemical and biochemical sensing with optical fibers and waveguides**. Boston: Artech House, 1996.

BRABEC, V. DNA sensor for the determination of antitumor platinum compounds. **Electrochimica Acta**, v. 45, n. 18, p. 2929-2932, June 2000.

BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A.; EMER, L. F. Diagnóstico da Hepatite C na prática médica: revisão de literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, n. 3, p. 161-168, Mar. 2001.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry**: principles, methods, and applications. Oxford: Oxford University Press, 1994.

BRIONES, C.; MATOE-MARTÍ, E.; GÓMEZ-NAVARRO, C.; PARRO, V.; ROMÁN, E.; MARTÍ-GAGO, J. A. Structural and functional characterization of self-assembled monolayers of peptide nucleic acids and its interaction with complementary DNA. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 228, n. 2, p. 131-136, Feb. 2005.

BUCK, R. P.; HATFIELD, W. E.; UMAÑA, M.; BOWDEN, E. F. **Biosensors technology**: fundamentals and applications. New York: Marcel Dekker, 1990.

BUDNIKOV, G. K.; LABUDA, J. Chemically modified electrodes as amperometric sensors in electroanalysis. **Russian Chemical Reviews**, v. 61, n. 8, p. 816-829, Aug. 1992.

BUSCH, M. P. Insights into the epidemiology, natural history and pathogenesis of hepatitis C virus infection from studies of infected donors and blood product recipients. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 8, n. 8, p. 200-206, June 2001.

CAMPIOTTO, S.; PINHO, J. R. R.; CARRILHO, F. J.; SILVA, L. C. da; SOUTO, F. J. D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L. M. M. B.; COELHO, H. S. M.; SILVA, A. O. FONSECA, J. C.; ROSA, H.; LACET, C. M. C.; BERNARDINI, A. P. Geographic

distribution of hepatitis C virus genotypes in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 1, p. 41-49, Jan. 2005.

CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; MONTEMAYOR, C. Characterization of alkanethiol-self-assembled monolayers-modified gold electrodes by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 586, n. 1, p. 112-12, Jan. 2006.

CANTALOUBE, J. F.; CHARREL, R. N.; ATTOUI, H.; BIAGINI, P.; MICCO, P.; LAMBALLARIE, X. Evaluation of four PCR systems amplifying different genomic regions for molecular diagnosis of GB virus C infections. **Journal of Virological Methods**, v. 64, n. 2, p. 131- 135, Mar. 1997.

CARPINI, G.; LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M. Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 2, p. 167-175, Sept. 2004.

CARTER, M. T.; RODRIGUEZ, M.; BARD, A. L. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. tris-chelated complexes of cobalt (III) and Iron (II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. **Journal of American Chemical Society**, v. 111, n. 24, p. 8901-8911, Nov. 1989.

CARVALHAL, R. F. **Desenvolvimento de sensor biomimético empregando monocamadas auto-organizadas de tióis sobre eletrodo de ouro**. 2005. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

CASS, A. E. G. **Biosensors: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1990.

CASSUTO, N. G.; SIFER, C.; FELDMENN, G.; BOURET, D.; MORET, F.; BENIFLA, J. L.; PORCHER, R.; NAOURI, M.; NEURAZ, A.; ALVAREZ, S.; PONCELET, C.; MADELANAT, P. DEVAUX, A. A. modified RT-PCR technique to screen for viral RNA in the semen of hepatitis C virus-positive men. **Human Reproduction**, v. 17 n. 12, p. 3151-3156, Dec. 2002.

CASTAÑEDA, M. T.; MERKOÇI, A.; PUMERA, M.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensors for biomedical applications based on gold nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9-10, p. 1961-1967, Apr. 2007.

CASTILLO, J.; GÁSPÁR, S.; LETH, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I.; SOUKHAREV, V.; DORNEANU, S. A.; RYABOV, A. D.; CSÖREGI, E. Biosensors for life quality: design, development and applications. **Sensors and Actuators B**, v. 102, n. 2, p. 179-194, Sept. 2004.

CASTRO, F. J.; SAULEDA, S.; ESTEBAN, J. I.; VILADOMIU, L.; MARTELL, M.; DRAGON, E.; ESTEBANA, R.; GUARDIÀ, J. Evaluation of hepatitis C virus RNA RT:PCR qualitative and quantitative second generation assays. **Journal of Virological Methods**, v. 91, n. 1, p. 51-58, Jan. 2001.

CÉSPEDES, F.; MARTÍNEZ-FÀBREGAS, E.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 296-304, Aug.1996.

CHAH, S.; YI, J.; PETTIT, C. M.; ROY, D.; FENDLER, J. H. Ionization and reprotonation of self-assembled mercaptopropionic acid monolayers investigation by surface plasmon resonance measurements. **Langmuir**, v. 18, n. 2, p. 314-318, Jan. 2002.

CHARPENTIER, J. In the frame of globalization and sustainability, process intensification, a path to the future of chemical and process engineering (molecules into money). **Chemical Engineering Journal**, v.134, n. 1-3, p. 84-92. Nov. 2007.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441-456, June 2002.

CHOO, Q. L.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY, D. W.; HOUGHTON, M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood born non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p.359-362, Apr. 1989.

CODES, L.; FREITAS, L. A. R.; SANTOS JESUS, R.; VITVITSKI, L.; SILVA, L. K.; TREPO, C.; REIS, M. G.; PARANÁ, R. Comparative study of Hepatitis C virus genotypes 1 and 3 in Salvador, Bahia. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 6, p. 409-417, dez. 2003.

COLOWICK., S. P.; KAPLAN, N. O. **Methods in enzymology**. San Diego: Academic Press, 1955. v 1.

CONTE, V. P. Hepatite crônica por vírus C: parte 1. considerações gerais. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 37, n. 3, p. 187-193, Sept. 2000a.

CONTE, V. P. Hepatite crônica por vírus C: parte 2. tratamento. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 37, n. 4, p. 235-242, Out. 2000b.

CRESPILHO, F. N.; REZENDE, M. O. O. Eletrodos de pasta de carbono modificados com ácidos húmicos: estudo e determinação de metais em meio aquoso. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 964-969, nov. 2004.

CUNNINGHAM, A. J. **Introduction to bioanalytical sensors**. New York: Wiley, 1998.

DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ. P.; LOBO-CASTAÑÓN, J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. **Electroanalysis**, v. 16, n. 15, p.1193-1203, Aug. 2004.

DELVIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. New York: Wiley, 1992.

DIAMOND, D. **Principles of chemical and biological sensors**. New York: Wiley, 1998.

DONG, S.; LI, J. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 42, n. 1, p. 7-13, Apr. 1997.

DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p.1192 -1199, Oct. 2003.

DUNFORD, H. B. **Heme peroxidases**. New York: Wiley, 1999.

EDELMAN, P. G.; WANG, J. **Biosensors & chemical sensors**. Washington: ACS, 1992.

EGGINS, B. R. **Chemical sensors and biosensors**. New York: Wiley, 2002.

ERDEM, A.; KERMAN, K.; MERIC, B.; AKARCA, U. S.; OZSOZ, M. Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. **Analytical Chimica Acta**, v. 422, n. 2, p. 139-149, Nov. 2000.

ERDEM, A.; PIVIDORI, M. I.; LERMO, L.; BONANNI, A.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. **Sensors and Actuators B**, v.114, n. 2, p. 591-598, Apr. 2006.

ERENSOY, S. Diagnose of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, n. 2, p. 271-281, May 2001.

ESHKENAZI, I.; MALTZ, E.; ZION, B.; RISHPON, J. A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1939-1945, Sept. 2000.

FAGUNDES, G. D.; BONAZZA, V.; CERETTA, L. B. BACK; A. J.; BETTIOL; J. Detection of the Hepatitis C virus in a population of adults. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 16, n. 3, p. 396-400, maio 2008.

FERAPONTOVA, E. E. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 49, n. 11, p. 1751-1759, Apr. 2004.

FERAPONTOVA, E. E.; DOMINGUEZ, E. Direct electrochemical oxidation of DNA on polycrystalline gold electrodes. **Electroanalysis**, v. 15, n. 7, p. 629-634, May 2003.

FERREIRA, C. T.; SILVEIRA, T. R. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia e da prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 473-487, dez. 2004.

FINI, C.; FLORIDI, A.; FINELLI, V. N.; WITTMAN-LIEBOLD, B. **Laboratory methodology in biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

FOJTA, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. Review. **Electroanalysis**, v. 14, n. 21, p.1494-1500, Nov. 2002.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L.T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, maio 2003.

FUJIHIRA, M.; RUSLING, J. F.; RUBINSTEIN, I. Modified electrodes. In: **Encyclopedia of electrochemistry**. New York: Wiley, 2007. v. 10.

GARCIA, F. B.; GOMIDE, G. P. M.; PEREIRA, G. A.; MORAES-SOUZA, H. Importância dos testes sorológicos de triagem e confirmatórios na detecção de doadores de sangue infectados pelo vírus da hepatite C. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 3, p. 218-222, set. 2008.

GERMER, J. J.; RYS, P. N.; THORVILSON, J. N.; PERSING, D. H. Determination of hepatitis C virus genotype by direct sequence analyses of products generated with the amplicor HCV test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2625-2630, Aug. 1999.

GONÇALVES, P. L.; CUNHA, C. B. C.; BUSEK, S. C. U.; OLIVEIRA, G. C.; RODRIGUES, R. R.; PEREIRA, F. Detection of hepatitis C virus RNA in saliva samples from patients with seric anti-HCV antibodies. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 28-34, fev. 2005.

GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. The application of alkanethiol self-assembled monolayers to enzyme electrodes. **Trends Analytical Chemistry**, v. 18, n. 8, p. 525-533, Aug. 1999.

GOODING, J. J.; PRAIG, V. G.; HALL, A. H. Pt-catalyzed enzyme electrodes immobilized on gold using self-assembled layers. **Analytical Chemistry**, v. 70, n.11, p. 2396-2402, June 1998.

GOODING, J. J.; EROKHIN, P.; LOSIC, D.; YANG, W.; POLICARPIO, V.; LIU, J.; HO, F. M.; SITUMORANG, M.; HIBBERT, D. B.; SHAPTER, J. G. Parameters important in fabricating enzyme electrodes using self-assembled monolayers of alkanethiols. **Analytical Science**, v. 17, n. 1, p. 3-8, Mar. 2001.

GOPEL, W.; HESSE, J.; ZEMEL, J. N. **Sensors: a comprehensive survey**. New York: VHC, 1989. v 1.

GOREN, M.; GALLEY, N.; LENNOX, R. B. Adsorption of alkylthiol-capped gold nanoparticles onto alkylthiol self-assembled monolayers: an spr study. **Langmuir**, v. 22, n. 4, p. 1048-1054, Feb. 2006.

GRETCH, D. R. Diagnostic tests for Hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 444-475, Sept. 1997.

GU, J. Y.; LU, X. J.; JU, H. X. DNA sensor for recognition of native yeast DNA sequence with methylene blue as an electrochemical hybridization indicator. **Electroanalysis**, v. 14, n. 13, p. 949-954, July 2002.

HAHN, S.; MERGENTHALER, S.; ZIMMERMANN, B.; HOLZGREVE, W. Nucleic acid based biosensors: the desires of the user. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 2, p. 151-154, Oct. 2005.

HE, L.; TOH, C. S. Recent advances in analytical chemistry: a material approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, n. 1, p. 1-15, Jan. 2006.

HEPATITIS C INFORMATION CENTRAL. **Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.hepatitis-central.com/>>. Acesso em: 21 mar. 2009.

HERBST, M. H.; MACEDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986-992, nov. 2004

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. 2nd ed. New York: Academic Press. 1996.

HUANG, X. J.; CHOI, Y. K. Chemical sensors based on nanostructured materials. **Sensors and Actuators B**, v.122, n. 2, p. 659-671, Mar. 2007.

IHMELS, H.; OTTO, D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA: general principles and recent developments. **Topics in Current Chemistry**, v. 258, n. 1, p. 161-204, 2005.

IHMELS, H.; FAULHABER, K.; VEDALDI, D.; DALL'ACQUA, F.; VIOLA, G. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded dna. part 2: the annelated quinolinium ion as a structural motif in dna intercalators. **Photochemistry and Photobiology**, v. 81, n. 5, p. 1107-1115, Sept. 2005.

IKEBUKURU, K.; KOHIKI, Y.; SODE, K. Amperometric DNA sensor using the pyrroquinoline quinone glucose dehydrogenase-avidin conjugate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 11-12, p. 1075-1080, Dec. 2002.

ITO, T.; THYAGARAJAN, S.; KARLIN, K. D.; ROKITA, S. E. Recognition of guanines at a double helix-coil junction in DNA by a trinuclear copper complex. **Chemical Communications**, n. 38, p. 4812-4814, Oct. 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Project:** Chemistry in a changing world-new perspectives concerning the IUPAC family. Disponível em:<<http://www.iupac.org/web/ins/2006-030-1-022>>. Acesso em: 21 fev. 2009.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Analytical aspects of chemically modified electrodes: classification, critical evaluation and recommendations. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 6, p. 1301-1318, Aug. 1998.

ISSAQ, H. J.; XIAO, Z.; VEENSTRA, T. D. Serum and plasma proteomics. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 8, p. 3601-3620, July 2007.

JANATA, J. **Principles of chemical sensors**. New York: Plenum Press, 1989.

JANATA, J.; JOSOWICZ, M.; DEVANEY, M. Chemical Sensors. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 2, p. 207-228, Feb. 1994.

JELEN, F.; FOJTA, M.; PALECEK, E. Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 427, n. 1-2, p. 49-56, Apr. 1997.

JIANG, J. G. A.; GRIFFITH, A.; McNEIL, C. J.; COOPER, J. M. Characterization the formation of a bioelectrochemical interface at a self-assembled monolayers using X-ray photoelectron spectroscopy. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 42, n. 1, p. 15-23, Apr. 1997.

JORDANIA ACREDITATION SYSTEM. **Policy on traceability in chemical measurements**. Accreditation unit. p. 2-7, 2007. Disponível em: <http://www.jism.gov.jo/english/CONFORMITY%20ASSESSMENT/accreditation/New%20new/Accreditation%20Rules%20&%20Policies/AU%20policies/Policy%20on%20Traceability%20in%20Chemical%20Measurements%20JAS-P15%20rev_a.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2009.

KATZ, E.; WILLNER, I. Biomolecule functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. **Chemical Physics Chemical**, v. 5, n. 8, p.1084-1104, Aug. 2004.

KELLER, U. E. S. **Chemical sensors and biosensors for medical and biological applications**. New York: Wiley, 1998.

KERMAN, K.; MORITA, Y.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Label-free electrochemical detection of DNA hybridization on gold electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 5, n. 10, p. 887-891, Aug. 2003.

KURAMITZ, H.; MATSUDA, M.; SUGAWARA, K.; TANAKA, S. Electrochemical evaluation of the interaction between avidin and biotin at biotinylated polypyrrole electrode using a redox marker. **Electroanalysis**, v. 15, n. 4, p. 225-229, Apr. 2003.

KUSHWAHA, P. S.; KUMAR, A.; MISHRA, P. C. Electronic transitions of guanine tautomers, their stacked dimers, trimers and sodium complexes. **Spectrochimica Acta A**, v. 60, n. 3, p. 719-728, 2004.

LABUDA, J.; BUCKOVA, M.; VANICKOVA, M.; MATTUSCH, J.; WENRICH, R. Voltammetric detection of the DNA interaction with cooper complex compounds and damage to DNA. **Electroanalysis**, v. 11, n. 2, 101-107, Feb. 1999.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p.417- 424, maio 1999.

LERMO, A.; ZACCO, E.; BARAK, J.; DELWICHE, M.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. Towards Q-PCR of pathogenic bacteria with improved

electrochemical double-tagged genosensing detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1805-1811, July 2008.

LERMO, A.; CAMPOY, S.; BARBÉ, J.; HERNÁNDEZ, S.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. *In situ* DNA amplification with magnetic primers for the electrochemical detection of food pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 9-10, p. 2010-2017, Apr. 2007.

LE POGAM, S.; DUBOIS, F.; CHRISTEN, R.; RABY, C.; CAVICCHINI, A.; GOUDEAU, A. Comparison of DNA enzyme Immunoassay and line probe assay (inno-LiPA HCV I and II) for hepatitis C virus genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1461-1462, May 1998.

LI, C.; THOSTENSON, E. T.; CHOU, T. Sensors and actuators based on carbon nanotubes and their composites: a review. **Composites Science and Technology**, v. 68, n. 6, p. 1227-1249, 2008.

LI, J.; CHENG, G. M.; DONG, S. Direct electron transfer to cytochrome c oxidase in self-assembled monolayers on gold electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 417, n. 1-2, p. 97-104, Nov.1996.

LIU, C.; ZHOU, J.; LI, Q.; WANG, L.; LIAO, Z.; XU, H. DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 233-240, June 1999.

LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHAN, Q.; JI, L. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, n. 1, p. 269-276, June 2002.

LOK, A. S. F.; GUNARATNAM, N. T. Diagnosis of Hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 48s-46s, Dec. 1997.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. 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, nov. 2006.

LU, X.; ZHANG, M.; KANG, J.; WANG, X.; ZHOU, L.; HONGDE, L. Electrochemical studies of kanamycin immobilization on self-assembled monolayer and interaction with DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 4, p. 582-588, Apr. 2004.

LU, X.; ZHU, K.; ZHANG, M.; LIU, H.; KANG, J. Voltammetric studies of the interaction of transition-metal complexes with DNA. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 52, n. 3, p. 189-200, Aug. 2002.

LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; TURNER, A. P. F.; MASCINI, M. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducer for DNA hybridization sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 6, p. 515-530, Jan. 2004.

MANDEL, M.; MARMUR, J. Use of ultraviolet absorbance temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In: GROSSMAN, L.; MOLDAVE, K. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1968. v. 12, p.195-206.

MARQUES, L. P. J.; CAVACO, I.; PINHEIRO, J. P.; RIBEIRO, V.; FERREIRA, G. N. M. Electrochemical DNA sensor for detection of single nucleotide polymorphisms. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 41, n. 4, p. 475-481. Apr. 2003.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Estudo da interação entre complexo de cobre e oligonucleotídeo de HCV imobilizado em CDtrodo de ouro. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: ABQ, 2007. 1 CD-ROM.

MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R.; ANDREESCU, S.; MARTY, J. L. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*: Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 4, p. 824-83, Nov. 2004.

MARTÍNEZ, R.; CHACON-GARCIA, L. The search of DNA-intercalators as antitumoral drugs: what it worked and what did not work. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 127-151, Feb. 2005.

MASCINI, M.; DEL CARLO, M.; MINUNNI, M.; CHEN, B.; COMPAGNONE, D. Identification of mammalian species using genosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 2, p. 163-169, Oct. 2005.

MATTHEWS, J. D.; BINI, E. J. Epidemiology, diagnostic, and treatment of chronic hepatitis C. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 17, n. 4, p. 229-238, Aug. 2004.

MATHEWSON, P. R.; FINLEY, J. W. **Biosensors design and application**. Washington: ACS, 1992.

MENA, M. L.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; PINGARRÓN, J. M. A comparison of different strategies for the construction of amperometric enzyme biosensors using gold nanoparticle-modified electrodes. **Analytical Biochemistry**, v. 336, n. 1, p. 20-27, Jan. 2005.

MENDES, R. K.; FREIRE, R. S.; FONSECA, C. P.; NEVES, S.; KUBOTA, L. T. Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 849-855, nov. 2004.

MERIC, B.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; KARA, P.; ERENDOY, S.; AKARCA, U. S.; MASCINI, M.; OZSOZ, M. Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue. **Talanta**, v. 56, n. 5, p. 837-846, Apr. 2002.

MERKOCÇI, A.; ALDAVERT, M.; MARÍN, S.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 341-349, Apr. 2005.

MIKKELSEN, S. R. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. **Electroanalysis**, v. 8, n. 1, p.15-19, Jan.1996.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical chemistry**. New York: Wiley, 2004.

MULCHANDANI, A.; SADIK, O. A. **Chemical sensors for environmental monitoring**. Washington: ACS, 1999.

MUÑOZ, R. A. A.; MATOS, R. C.; ANGNES, L. Gold electrode from compact discs modified with platinum for amperometric determination of ascorbic acid in pharmaceutical formulations. **Talanta**, v. 55, n. 4, p. 855-860, Oct. 200a.

MUÑOZ, R. A. A.; MATOS, R. C.; ANGNES, L. Amperometric determination of dipyrone in pharmaceutical formulations using a flow cell containing gold electrodes from recordable compact discs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 90, n.12, p. 1972-1977, Dec. 2001b.

MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p.177-184, Apr. 2006.

NALWA, H. S. **Nanostructured materials and nanotechnology**. New York: Academic Press, 2002.

NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; SIERRALTA, A.; FERNANDEZ-MESTRE, M.; ARRIECHE, P. S. D.; MARCHAN, E. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 401-408, Apr. 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. SãoPaulo: Savier, 2006.

OLIVEIRA BRETT, A. M.; SERRANO, S. H. P. The electrochemical oxidation of DNA. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 6, n. 1, p. 97-100, Jan. 1995.

OLIVEIRA BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A. P.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical oxidation of 8-Oxoguanine. **Electroanalysis**, v. 12, n. 12, p. 969-973, Mar. 2000.

PADDLE, B. M. Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 11, n. 11, p. 1079-1113, Jan. 1996.

PALANTI, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M. Electrochemical DNA probes. **Analytical Letters**, v. 29, n. 13, p. 2309-2331, Oct. 1996.

PALECEK, E. Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. **Talanta**, v. 56, n. 4, p. 806-819, Oct. 2002.

PALECEK, E.; FOJTA, M. Detecting DNA hybridization and damage. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 74a-83a, Feb. 2001.

PAPAXANTHOS-ROCHE, A.; TRIMOULET, P.; COMMERNGES-DUCOS, M.; HOCKÉ, C.; FLEURY, H. J. A.; MAYER, G. PCR-detection hepatitis C virus RNA associated with human zone-intact oocytes collected from infected women for ART. **Human Reproduction**, v. 19, n. 5, p.1175-1175, May 2004.

PASSAGLIA, L. M. P. Mutação e mecanismo de reparação de DNA. In: ZAHA, A. (Ed.). **Biologia molecular básica**. 3. ed. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 96-115, Feb. 2002.

PEETERS, S.; STAKENBORG, T.; REEKMANS, G.; LAUREYN, W.; LAGAE, L.; VAN AERSCHOT, A.; VAN RANST, M. Impact of spacers on the hybridization efficiency of mixed self-assembled DNA/alkanethiol films. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 1, p. 72-77, Sept. 2008.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de Eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Química Nova**, v. 25, n. 6a, p. 1012-1021, nov. 2002.

PEREIRA, F. C.; BERGAMO, E. P.; ZANONI, M. V. B.; MORETO, L. M.; UGO, P. Aplicações de nanoeletrodos como sensores na química analítica. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1054-1060, set. 2006.

PETERS, F. T.; DRUMMER, O. H.; MUSSHOF, F. Validation of new methods. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2-3, p. 216-224, Jan. 2007.

PIVIDORI, M. I. **Nuevos genosensores amperométricos**: diseño y construcción. 2002. 505 f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) - Universidade Autônoma de Barcelona, Belaterra, 2002.

PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducers surfaces and detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 291-303, Aug. 2000.

PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Dot-blot amperometric genosensor for detecting a novel determinant of lactamase resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Analyst**, v. 126, n. 9, p. 1551-1557, Sept. 2001.

PIVIDORI, M. I.; LERMO, A.; ZACCO, E.; HERNÁNDEZ, S.; FABIANO, S.; ALEGRET, S. Bioaffinity platforms based on carbon-polymer biocomposites for electrochemical biosensing. **Thin Solid Films**, v. 516, n. 2-4, p. 284-292, Dec. 2007.

PIWONSKI, I.; GROBELNY, J.; CICHOMSKI, M.; CELICHOWSKI, G.; ROGOWSKI, J. Investigation of 3-mercaptopropylmethoxysilane self-assembled monolayers on Au(111) surface. **Applied Surface Science**, v. 242, n. 1-2, p.147-153, Mar. 2005.

PRADO, K.; PATZINA, R.; BERGAMASCHI, D.; FOCACCIA, R. Histological response study of chronic viral hepatitis C patients treated with interferon alone or combined with ribavirin. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 5, p. 362-367. out. 2008.

PRATT, C. W.; CORNELLY, K. **Essencial biochemistry**. New York: Wiley, 2004.

PUMERA, M.; SANCHEZ, S.; ICHINOSE, I.; TANG, J. Electrochemical nanobiosensors. **Sensors and Actuators B**, v. 123, n. 2, p. 1195-1205, May 2007.

RAPLAY, R. **Nucleic acid protocols handbook**. New Jersey: Human Press, 1999.

RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Imunossensor amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 316-320, mar. 2002.

RICCARDI, C. S.; DALMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; YAMANAKA, H. Construção e aplicação de biossensor amperométrico para detecção e genotipagem do vírus da hepatite C In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, 19., 2004, Teresópolis. **Anais...** Teresópolis: SIBEE, 2004. 1 CD-ROM.

RICCARDI, C. S.; DAHMOUCHE, K.; SANTILLI, C. V.; COSTA, P. I., YAMANAKA, H. Immobilization of streptavidin in sol-gel films: application on the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, n. 3, p. 637-643, Oct. 2006.

RICCARDI, C. S.; KRANZ, C.; KOWALIK, J.; YAMANAKA, H.; MIZAIKOFF, B.; JOSOWICZ, M. Label-free DNA detection of hepatitis C virus based on modified conducting polypyrrole films at microelectrodes and AFM-tip integrated electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 237-245, Jan. 2008.

RICHTER, E. M.; PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L. Square-wave quantification of lead in rainwater with disposable gold electrodes without removal of dissolved oxygen. **Electroanalysis**, v. 15, n. 23-24, p.1871-1877, Dec. 2003.

RICHTER, E. M.; AUGELLI, M., A.; MAGAROTTO, S.; ANGNES, L. Compact disks, a new source for gold electrodes. Application to the quantification of copper by PSA. **Electroanalysis**, v. 13, n. 8-9, p. 760-764, May 2001.

RICHTER, E. M.; AUGELLI, M. A.; KUME, G. H.; MIOSHI, R. N.; ANGNES, L. Gold electrodes from recordable CDs for mercury quantification by flow injection analysis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, n. 5, p. 444-448, Mar. 2000.

RICHTER, E. M.; JESUS, D. P.; NEVES, C. A.; LAGO, C. L.; ANGNES, L. Aplicações eletroanalíticas com eletrodos de prata confeccionados a partir de CDs graváveis. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 839-843, nov. 2003.

ROBYT, J. F.; WHITE, B. J. **Biochemical techniques**: theory and practice. Long Grove: Waveland Press, 1987.

- ROGERS, K. R. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, v. 568, n. 1-2, p. 222-231, May 2006.
- ROGERS, K. R.; MULCHANDANI, A.; ZHOU, W. **Biosensors and chemical sensors technology**: process monitoring and control. Washington: ACS, 1995.
- SADANA, A. **Engineering biosensors**: kinetics and design applications. New York: Academic Press, 2002.
- SAKAO, Y.; NAKAMURA, F.; UENO, N.; HARA, M. Hybridization of oligonucleotide by using DNA self-assembled monolayer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 40, n. 3-5, p.149-152, Feb. 2005.
- SANTOS, D. H.; GARCIA, M. B. G.; GARCIA, A. C. Genosensor based on a platinum (II) complex as electrocatalytic label. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 2868-2874, Oct. 2005.
- SANTOS, S. A. T.; MIKAWA, A. Y.; YAMANAKA, H.; SILVA, F. H.; COSTA, P. I. Synthesis of poly siloxane-poly (propylene oxide) hybrid discs as solid phase in anti-HCV detection using a recombinant core protein. **Talanta**, v. 75, n. 2, p. 461-465, Apr. 2008.
- SHELLER, F.; SCHMID, R. D. **Biosensors**: fundamentals, technologies and applications. New York: VHC, 1992.
- SCHUETZLE, D.; HAMMERLE, R. **Fundamentals and applications of chemical sensors**. Washington: ACS, 1986.
- SEEFF, L. B. Natural history of Hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 215-285, Dec.1997.
- SECKO, D. **Culturing Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/article/display/24827/>>. Acesso em: 21 mar. 2009.
- SEIYAMA, T. **Chemical sensors technology**. New York: Elsevier, 1989. v 2.
- SENARATNE, W.; ANDRUZZI, L.; OBER, C. K. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2427-2448, Sept. 2005.
- SILVA, G. F.; NISHIMURA, N. F.; COELHO, K. I. R.; SOARES, E. C. Grading and staging chronic hepatitis C and its relation to genotypes and epidemiological factors in brazilian blood donors. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 142-149, abr. 2005.
- SINGH, S. Sensors: an effective approach for the detection of explosives. **Journal of Hazardous Materials**, v. 144, n. 1-2, p. 15-28, June 2007.
- SIMMONDS, P.; ALBERTI, A.; ALTER, H. J.; BONINO, F.; BRADLEY, D. W.; BRECHOT, C.; BROUWER, J. T.; CHAN, S. W.; CHAYAMA, K.; CHEN, D. S.;

CHOO, Q.L.; COLOMBO, M.; CUYPERS, H.T.M.; DATE, T.; DUSHEIKO, G. M.; ESTEBAN, J. I.; FAY, O.; HADZIYANNIS, S. J.; HAN, J.; HATZAKIS, A.; HOLMES, E. C.; HOTTA, H.; HOUGHTON, M.; IRVINE, B.; KOHARA, M.; KOLBERG, J. A.; KUO, G.; LAU, J. Y. N.; LELIE, P. N.; MAERTENS, G.; McOMISH, F.; MIYAMURA, T.; MIZOKAMI, M.; NOMOTO, A.; PRINCE, A. M.; REESINK, H. W.; RICE, C.; ROGGENDORF, M.; SCHALM, S. W.; SHIKATA, T.; SHIMOTOHNO, K.; STUYVER, L.; TREPO, C.; WEINER, A.; YAP, P. L.; URDEA, M. S. A proposed system for the nomenclature of Hepatitis C virus genomes. **Hepatology**, v. 19, n. 5, p. 1321-1324, May 1994.

SOLE, S.; MERKOCÇI, A.; ALEGRET, S. New materials for electrochemical sensing III. beads. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 102-110, Feb. 2001.

STEENKEN, S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 3, p. 503-520, May 1989.

STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; ABOUL ENEIN, H. Y. **Electrochemical sensors in bioanalysis**. New York: Marcel Dekker, 2001.

STRAUSS, E. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 1, p. 69-82, jan. 2001.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4th ed. New York: Freeman, 1995.

TAYLOR, P. D. P.; PAPADAKIS, I.; VAN NEVEL, L.; NICHOLL, C.; DE BIÈ, P. Quality of chemical measurements: international evaluation program reveals true situation. **Chemistry International**, v. 23, n 1, Jan. 2001. Disponível em: <<http://old.iupac.org/publications/ci/2001/january/chemical-measurements.html>>. Acesso em: 15 fev. 2009.

TEIXEIRA, R.; MARTINS FILHO, O. A.; OLIVEIRA, G. C. **Hepatite C**: aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. Belo Horizonte: Coopmed, 2005.

TENGAN, F. M.; ELUF NETO, J.; CAVALHEIRO, N. P.; BARONE, A. A. Sexual transmission of Hepatitis C virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 3, p. 133-137, maio 2001.

THOMPSON, R. B. **Fluorescence sensors and biosensors**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

THORP, H. H. Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 3, p. 117-121, Mar.1998.

TIMMER, B.; OLTHUIS, W.; VAN DEN BERG, A. Ammonia sensors and their application: a review. **Sensors and Actuators B**, v. 107, n. 2, p. 666-667, June 2005.

TROJANOWICZ, M. Analytical applications of carbon nanotubes: a review. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 480-489, May 2006.

ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of Hepatitis C virus using fractional factorial designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 782-787, jul. 2008.

ULIANA, C. V. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para detecção do vírus da Hepatite C**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

ULLMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 1, p. 1533-1554, Feb. 1996.

USMANI, A. M.; AKMAL, N. **Diagnostic biosensors polymers**. New York: ACS, 1994.

VELIKY, I. A.; McLEAN, R. J. C. **Immobilized biosystems**: theory and practical applications. London: Blackie Academic & Professional, 1994.

YAMANAKA, H.; P.; RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I. Estudos sobre biossensores piezoelétricos para detecção do vírus da Hepatite C. In: ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA, 12., 2003, São Luís. **Anais...** São Luís: ENQA, 2003. 1 CD-ROM.

YAMANAKA, H.; SKLÁDAL, P.; RICCARDI, C. S.; COSTA, P. I. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of Hepatitis C virus. **Journal of Virological Methods**, v. 117, n. 2, p. 145-151, May 2004.

YAMAUCHI, S. **Chemical sensors technology**. New York: Elsevier, 1992. v 4.

YANG, W.; GOODING, J. J.; HIBBERT, D. B. Characterization of gold electrodes modified with self-assembled monolayers of L-cysteine for the adsorptive stripping analysis of copper. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 516, n. 1-2, p.10-16, Dec. 2001.

YANG, M.; McGOVEN, M. E.; THOMPSON, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. **Analytica Chimica Acta**, v. 346, n. 3, p. 259-275, July 1997.

YE, Y. K.; ZHAO, J. H.; YAN, F.; ZHU, Y. L.; JU, H. X. Electrochemical behavior and detection of Hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 11, p. 1501-1508, Oct. 2003.

YU, F. T. S.; YIN, S. **Fiber optic sensors**. New York: Marcel Dekker, 2002.

YU, H. Z. Self-assembly on Recordable CDs. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 19, p. 4743-4747, Oct. 2001.

WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, n. 1, p. 63-71, Sept. 2002.

WANG, J.; POLSKY, R.; MERKOCI, A.; TURNER, K. L. Electroactive Beads for ultrasensitive DNA detection. **Langmuir**, v. 19, n. 23, p. 989-991, Nov. 2003.

WANG, Y.; ZHOU, A. Spectroscopic studies on the binding of methylene blue with DNA by means of cyclodextrin supramolecular systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 190, n. 1, p. 121-127, July 2007.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, n. 4355, p. 737, Apr. 1953.

WILLIAMS, E.; PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; FOSTER, R. J. ALEGRET; S. Rapid electrochemical genosensor assay using a streptavidin carbon-polymer biocomposite electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 3, p. 165-175, Nov. 2003.

WIRTZ, R.; WALTI, C.; TOSCH, P.; PEPPER, M. Influence of the Thiol Position on the Attachment and Subsequent Hybridization of Thiolated DNA on Gold Surfaces. **Langmuir**, v. 20, n. 5, p. 1527-1530, Mar. 2004.

WISE, D. L. **Bioinstrumentation and biosensors**. New York: Marcel Dekker, 1990.

WISE, D. L. **Biosensors with fiberoptics**. New Jersey: Humana Press, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Department of communicable diseases surveillance and response. Hepatitis B**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 21 mar. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Department of communicable diseases surveillance and response. Hepatitis C**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 21 mar. 2009.

ZACCO, E.; GALVE, R.; MARCO, M. P.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. Electrochemical biosensing of pesticide residues based on affinity biocomposite platforms. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1707-1715, Mar. 2007.

ZHAO, G. C.; ZHU, J. J.; CHEN, H. Y. C. Spectroscopic studies of the interactive model of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin. **Spectrochimica Acta: Part A**, v. 55, n. 5, p. 1109-1117, May 1999.

ZHU, L.; ZHAO, R.; WANG, K.; XIANG, H.; SHANG, Z.; SUN, W. Electrochemical behaviors of methylene blue on DNA modified electrode and its application to the detection of PCR product from NOS sequence. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 5649-5660, Sept. 2008.

APÊNDICE – Artigo publicado referente ao estágio de doutorado sanduíche na Universidade Autônoma de Barcelona-UAB.

Double-Tagging Polymerase Chain Reaction with a Thiolated Primer and Electrochemical Genosensing based on Gold Nanocomposite Sensor for Food Safety

Paulo R. Brasil de Oliveira Marques,[†] Anabel Lermo,[‡] Susana Campoy,[§] Hideko Yamanaka,[†] Jordi Barbé,[§] Salvador Alegret,[‡] and M. Isabel Pividori^{*†}

Grup de Sensors i Biosensors, Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain, Unitat de Microbiologia, Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain, and UNESP, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Laboratório de Eletroanalítica, Campus de Araraquara, São Paulo, Brazil

A novel material for electrochemical biosensing based on rigid conducting gold nanocomposite (nano-AuGEC) is presented. Islands of chemisorbing material (gold nanoparticles) surrounded by nonreactive, rigid, and conducting graphite epoxy composite are thus achieved to avoid the stringent control of surface coverage parameters required during immobilization of thiolated oligos in continuous gold surfaces. The spatial resolution of the immobilized thiolated DNA was easily controlled by merely varying the percentage of gold nanoparticles in the composition of the composite. As low as 9 fmol (60 pM) of synthetic DNA were detected in hybridization experiments when using a thiolated probe. Moreover, for the first time a double tagging PCR strategy was performed with a thiolated primer for the detection of *Salmonella* sp., one of the most important foodborne pathogens affecting food safety. This assay was performed by double-labeling the amplicon during the PCR with a -DIG and -SH set of labeled primers. The thiolated end allows the immobilization of the amplicon on the nano-AuGEC electrode, while digoxigenin allows the electrochemical detection with the antiDIG-HRP reporter in the femtomole range. Rigid conducting gold nanocomposite represents a good material for the improved and oriented immobilization of biomolecules with excellent transducing properties for the construction of a wide range of electrochemical biosensors such as immunosensors, genosensors, and enzymesensors.

The oriented and improved immobilization of single-stranded DNA to solid substrates, followed by hybridization, has gained importance over the past decade, due to its use as a genomic

detection tool in DNA arrays,¹ DNA biosensors,² and self-assembled molecular electronic circuits.³ In some cases, immobilization on a conducting metal surface is necessary. Because of the strong affinity of thiols to metal surfaces, sulfur chemistry is widely employed when attaching DNA, especially to continuous gold films⁴ or, instead, to gold nanoparticles-modified electrodes, to increase the electroactive surface.⁵ Furthermore, the use of gold nanoparticles as a label for biosensing devices is also gaining importance.⁶ The standard way for thiolating a strand of DNA is to attach a HS(CH₂)₆- linker molecule to either the 3' or the 5' end phosphate group. Although the linker keeps the DNA away from the gold surface and makes the binding event sterically more favorable, it also acts as an electrical insulator between the conducting surface and the DNA molecule.³ Although van der Waals attraction drives the assembly and ordering in typical SAMs (self-assembled monolayers), DNA immobilization is subject to strong electrostatic repulsion.⁷ As a result, in hybridization experiments, although a spacer arm being used,

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: isabel.pividori@uab.es.

[†] UNESP, Universidade Estadual Paulista.

[‡] Departament de Química, Universitat Autònoma de Barcelona.

[§] Departament de Genètica i de Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona.

- (1) (a) Schena, M. *DNA Microarrays: A Practical Approach*; Oxford University Press: Oxford, U.K., 1999. (b) Polsky, R.; Harper, J. C.; Wheeler, D. R.; Brozik, S. M. *Electroanalysis* 2008, 20, 671–679.
- (2) Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Turner, A. P. F.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 19, 515–530.
- (3) Wirtz, R.; Walti, C.; Tosch, P.; Pepper, M. *Langmuir* 2004, 20, 1527–1530.
- (4) (a) Pang, D. W.; Abruña, H. D. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3162–3169. (b) Kerman, K.; Ozkan, D.; Kara, P.; Meric, B.; Gooding, J. J.; Ozsoz, M. *Anal. Chim. Acta* 2002, 462, 39–47. (c) Mannelli, I.; Mimuni, M.; Tombelli, S.; Wang, R. H.; Spiriti, M. M.; Mascini, M. *Bioelectrochemistry* 2005, 66, 129–138. (d) Steichen, M.; Buess-Herman, C. *Electrochem. Commun.* 2005, 7, 416–420.
- (5) (a) Cai, H.; Xu, C.; He, P.; Fang, Y. *J. Electroanal. Chem.* 2001, 510, 78–85. (b) Wang, M.; Sun, C.; Wang, L.; Ji, X.; Bai, Y.; Li, T.; Li, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 33, 1117–1125. (c) Jin, B.; Ji, X.; Nakamura, T. *Electrochim. Acta* 2004, 50, 1049–1055. (d) Fu, Y.; Yuan, R.; Xu, L.; Chai, Y.; Zhong, X.; Tang, D. *Biochem. Eng. J.* 2005, 23, 37–44. (e) Liu, S.-F.; Li, Y.-F.; Li, J.-R.; Jiang, L. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 789–795. (f) Yang, J.; Yang, T.; Feng, Y.; Jiao, K. *Anal. Biochem.* 2007, 365, 24–30. (g) Kang, J.; Li, X.; Wu, G.; Wang, Z.; Lu, X. *Anal. Biochem.* 2007, 364, 165–170.
- (6) (a) González-García, M. B.; Fernández-Sánchez, C.; Costa-García, A. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 315–321. (b) Dequaire, M.; Degrand, C.; Limoges, B. *Anal. Chem.* 2000, 72, 5521–5528. (c) Wang, J.; Polsky, R.; Xu, D. *Langmuir* 2001, 17, 5739–5741. (d) Erdem, A. *Talanta* 2007, 74, 318–325. (e) Valentini, F.; Palleschi, G. *Anal. Lett.* 2008, 41, 479–520.
- (7) Petrovykh, D. Y.; Pérez-Dieste, V.; Opdahl, A.; Kimura-Suda, H.; Sullivan, J. M.; Tarlov, M. J.; Himpel, F. J.; Whitman, L. J. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 2–3.

tightly packed and negatively charged SAM are obtained, which impedes hybridization with the cDNA probe due to both steric as well as electrostatic effects.⁸

As such, a stringent control of the surface coverage of DNA is an important factor in maximizing hybridization efficiency,⁹ which can be performed by using auxiliary reagents such as lateral spacer thiols and mixed monolayers to obtain bioactive gaps.¹⁰ In order to avoid the stringent control of surface coverage parameters during immobilization of thiolated oligos on continuous gold films, the use of gold nanoparticles in a graphite-epoxy composite (nano-AuGEC) is presented in this paper. The aim of this work is to obtain islands of chemisorbing material (gold nanoparticles) surrounded by rigid, nonchemisorbing, conducting, graphite-epoxy composite. With this arrangement in the electrochemical transducer, the resulting less-packed surface provides improved hybridization features with a complementary probe minimizing steric and electrostatic repulsion. In order to prove the utility of this material, electrochemical genosensing of synthetic DNA sequences was performed with a thiolated probe and a digoxigenin complementary oligonucleotide and using antiDIG-HRP as an electrochemical label.

Moreover, for the first time, a double tagging PCR strategy was designed with a thiolated primer for the detection of *Salmonella* sp. The rapid electrochemical verification of the amplicon coming from the pathogenic genome of *Salmonella* was performed by double-labeling the amplicon during the PCR with a set of two labeled primers, one of them with digoxigenin and the other one with thiol moieties. The thiolated end allows the immobilization of the amplicon on the nano-AuGEC electrode and digoxigenin, for the electrochemical detection, by attaching an AntiDIG antibody modified with HRP enzyme. Rigid conducting gold nanocomposite represents a simple method for the oriented immobilization of biomolecules. The microscopic and electrochemical characterization of this material is presented in this paper, as well as its utility in electrochemical genosensing for food safety.

EXPERIMENTAL SECTION

Instrumentation. Temperature-controlled incubations were done in a temperature-controlled mixer Eppendorf Thermomixer 5436. The PCR reaction was carried out in an Eppendorf Mastercycler Personal thermocycler. The Leica MZ FLIII fluorescence stereomicroscope (Leica, Heidelberg, Germany) and the Jeol JSM-6300 scanning electron microscope (Jeol LTD, Tokio, Japan) coupled with an EDX detector which allows a characteristic X-ray spectrum (Oxford instruments, Bucks, England) were used to study the distribution of the gold nanoparticles on the electrode surface.

- (8) Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 4481–4483.
(9) (a) Hianik, T.; Gajdos, V.; Krivanek, R.; Oretskaya, T.; Meteliev, V.; Volkov, E.; Vadgama, P. *Bioelectrochemistry* **2001**, *53*, 199–204. (b) Keighley, S. D.; Li, P.; Estrela, P.; Migliorato, P. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1291–1297.
(10) (a) Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8916–8920. (b) Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Sajiya, S. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9787–9792. (c) Zhao, Y.-D.; Pang, D.-W.; Hu, S.; Wang, Z.-L.; Cheng, J.-K.; Dai, H.-P. *Talanta* **1999**, *49*, 751–756. (d) Petrovykh, D. Y.; Kimura-Suda, H.; Whitman, L. J.; Tarlov, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5219–5226. (e) Carpinì, G.; Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* **2004**, *20*, 167–175. (f) Loaiza, O. A.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. *Talanta* **2007**, *73*, 838–844.

Amperometric measurements were performed with an LC-4C amperometric controller (BAS Bioanalytical Systems Inc.). Voltammetric characterization was carried out using an Autolab PGSTAT Eco-chemie (The Netherlands). A three-electrode setup was used comprising a platinum auxiliary electrode (Crison 52-67 1, Spain), a double junction Ag/AgCl reference electrode (Orion 900200) with 0.1 mol L⁻¹ KCl as the external reference solution, and a working electrode (the GEC or nanoAu-GEC electrodes).

Chemicals and Biochemicals. Composite electrodes were prepared using 50 μm particle size graphite powder (Merck, U.K.) and Epotek H77 epoxy resin and hardener (both from Epoxy Technology). The gold nanoparticles (nanopowder, <100 nm particle size, product no. 636347) came from Aldrich. All oligonucleotide stock solutions were prepared with sterilized and double distilled water and stored at -20 °C until required.

The synthetic oligo sequences (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH) for the evaluation of hybridization on the nanoAu-GEC electrodes were (i) thiolated capture probe, 5'-SH-CTG GAG ATT TGG GCG TGC-3'; (ii) digoxigenin probe, 5'-DIG GCA CGC CCA AAT CTC CAG-3'; (iii) noncomplementary digoxigenin probe, 5'-DIG GAC CTC TAA ACC CGC ACG-3'; (iv) double-tagged oligo for microscopy study, 5'-SH-CGC TCA ATG CCT GGA GAT-FL-3'.

Two primers, 23 and 21 bp long, were designed for PCR amplification of the *tnpA* gene encoded in the *Salmonella* specific *IS200* mobile element (Gene Bank accession AF025380), in order to achieve an amplicon doubly labeled with thiol and digoxigenin at the 5' and 3' ends, respectively, using a thiolated and digoxigenin primer.

The upper thiolated primer (SH-*IS200* up, 5'-SH-ATG GGG GAC GAA AAG AGC TTA GC-3') is located just in the translation start codon (ATG) of the *tnpA* gene in the *IS200* element. The lower DIG primer (5'-DIG-CTC CAG AAG CAT GTG AAT ATG-3') is located from the +179 to +200 bp position regarding the *tnpA* translation start codon (ATG). The amplification of DNA carrying the *IS200* element can be expected to yield a doubly labeled and single-labeled fragment of 201 bp.

The synthetic oligos were all purchased from TIB-MOLBIOL (Berlin, Germany). The PCR amplification procedures were performed using Biotools Taq DNA polymerase (Madrid, Spain), with the buffer supplied by the manufacturer as well as the deoxynucleotides triphosphate set from Thermo Fisher Scientific (Waltham).

All other reagents, such as bovine serum albumin (BSA), sodium dodecyl sulfate (SDS), Tween 20, hydroquinone, potassium hexacyanoferrate(II), hydrogen peroxide, ethidium bromide, agarose, and proteinase K, were of the highest available grade. The enzymatic conjugate antiDIG-HRP (AntiDigoxigenin-POD Fab fragments, catalog no. 1214667) used as an enzyme label was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany).

Aqueous solutions were prepared with double distilled water. The solutions, and their composition, were standard saline citrate (20× SSC) (3.0 mol L⁻¹ NaCl, 0.3 mol L⁻¹ trisodium citrate, pH 7.0); hybridization solution (5× SSC) Tris buffer (0.1 mol L⁻¹ Tris, 0.15 mol L⁻¹ NaCl, pH 7.5); blocking Tris buffer (2% w/v BSA, 0.1% w/v Tween 20, 5 mmol L⁻¹ EDTA, in 0.1 mol L⁻¹ Tris, 0.15 mol L⁻¹ NaCl, pH 7.5).

Construction of the NanoAu-GEC Electrodes. For GEC electrodes, graphite powder and epoxy resin in a 1:4 (w/w) ratio were thoroughly hand mixed to ensure the uniform dispersion of the graphite powder throughout the polymer. For nanoAu-GEC electrodes, the following ratios of gold nanoparticles, graphite powder, and epoxy resin were prepared: 0.075:0.925:4 (w/w) for nanoAu(7.5%)-GEC; 0.250:0.750:4 (w/w) for nanoAu(25%)-GEC; 0.500:0.500:4 (w/w) for nanoAu(50%)-GEC, 0.750:0.250:4 (w/w) for nanoAu(75%)-GEC; and finally, 1:0:4 (w/w) for nanoAu(100%)-EC. Thereby the designation of the electrodes is based on the ratio of gold nanoparticles toward graphite particles. In all cases, the resulting paste was placed in a PVC cylindrical sleeve body (6 mm i.d.), which has an electrical contact to a depth of 3 mm.

After filling the electrode body gap completely with the soft paste, the electrode was tightly packed. The composite material was cured at 80 °C during 1 week. In all cases, prior to each use, the surface of the electrode was wet with double distilled water and then polished, first with abrasive paper and then with alumina paper (polishing strips 301044-001, Orion) to give a smooth mirror finish with a fresh renewable surface.

Double-Tagging PCR of the IS200 Element Specific for Salmonella with a Thiolated Primer. The PCR was performed in 100 μL of reaction mixture containing the PCR template (approximately 100 ng of purified *Salmonella enterica serovar Typhimurium* genomic DNA). Each reaction contains 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each deoxynucleotide triphosphate (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of each labeled primer (thiolated IS200 up and DIG-IS200 down), and 5 U of Taq DNA polymerase.

The reaction was carried out using the manufacturer supplied buffer. The amplification mixture was exposed to an initial denaturation step at 95 °C for 2 min followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, and a last elongation step at 72 °C for 7 min. As a negative control, the same reaction mixture but without the genomic template was done. The double-labeled amplicon was analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels in a buffer of 0.4 mol L^{-1} Tris-acetate, 1 mmol L^{-1} EDTA pH 8.0, containing 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide, and the HinfI digested Phi174 DNA was used as a DNA size marker. The DNA bands in the gels were visualized by UV transillumination, and they were photographed (Figure 6A). As the primers were labeled with thiol and digoxigenin, the amplicon was expected to be labeled by both thiol and digoxigenin at each terminus, respectively.

Microscopic Characterization of NanoAu-GEC Electrodes. The scanning electron microscopy (SEM) technique coupled with the EDX detector was able to provide the characteristic X-ray spectrum used to evaluate the distribution of gold on the surface of the different nanoAu-GEC electrodes. The same acceleration voltage (20 kV) was used, but different resolutions (1 and 100 μm) were used.

Moreover, the exposure of the gold binding sites of the nanoAu-GEC electrodes toward thiolated DNA was studied using fluorescence microscopy. In this case, the nanoAu-GEC electrodes with different composition were submitted to the double-tagged oligo. The SH moiety on the 5' end of the oligo was expected to be bound to the gold binding site of the electrodes, while the

fluorescein on the 3' end was responsible for the fluorescence signal.

The immobilization was performed in 5 \times SSC with 200 pmol of double-tagged oligo at a final volume of 140 μL for 2 h at 42 °C. Two washing steps were then performed with 140 μL 5 \times SSC for 10 min at 42 °C. Each step was performed in Eppendorf tubes with gentle shaking in the thermomixer.

Electrochemical Characterization of Bare and DNA-Modified NanoAu-GEC Electrodes. Different compositions of gold nanoparticles in nanoAu-GEC electrodes were electrochemically evaluated: nanoAu(0%)-GEC (control GEC electrode), nanoAu(7.5%)-GEC, nanoAu(25%)-GEC, nanoAu(50%)-GEC, nanoAu(75%)-GEC, and finally nanoAu(100%)-EC. Cyclic voltammetry was carried out by scanning at a rate of 100 mV s^{-1} over a range of -0.75 and $+1.25$ V (vs Ag/AgCl) in a 20 mL electrochemical cell at room temperature. The electrolyte was 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer, pH 7.4, containing 0.1 mol L^{-1} KCl. For this study, the redox marker was hydroquinone (1.81 mmol L^{-1}) because it was also used as a mediator for the HRP enzyme in the further genosensing approaches. Electrolyte solutions were purged with high-purity nitrogen prior to experiments.

Additionally, in order to evaluate the reproducibility in the construction and in the surface treatment, eight nanoAu(7.5%)-GEC electrodes were constructed and electrochemically tested. In each case, the surface of the electrodes was polished before each use. Additionally, other surface treatments such as (i) acid and electrochemical activation treatment with 0.1 mol L^{-1} H_2SO_4 and 10 cycles at a $\nu = 100$ mV s^{-1} from -0.75 to $+1.25$ V (vs Ag/AgCl) and (ii) ultrasonic treatment for 5 min in water were also evaluated.

Finally, in order to evaluate the surface density of DNA immobilized on the electrode, cyclic voltammetry of bare and DNA-modified nanoAu-GEC and GEC electrodes were performed with two redox markers with different charge (1 mmol L^{-1} potassium hexacyanoferrate(II) and 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone). For this study, the electrodes were modified with 200 pmol of thiolated probe, and the cyclic voltammetry measurements were performed before and after the modification, as explained above.

Hybridization on the NanoAu-GEC Electrode and Surface Coverage Studies. In this case, the protocol consists briefly on the following steps, performed by dipping the electrodes in 2 mL Eppendorf tubes in the thermomixer, as shown in Figure 1E: (i) immobilization of the thiolated oligo on the nanoAu-GEC electrode, (ii) hybridization with a DIG-labeled (complementary and non-complementary probe), (iii) enzymatic labeling using antiDIG-HRP, and (iv) amperometric determination based on the enzyme activity.

The immobilization was achieved by dipping the nanoAu-GEC electrode in the 2 mL Eppendorf tube with 140 μL of the thiolated probe solution (200 pmol) in 5 \times SSC for 30 min at 42°. C. Two washing steps were then performed in the Eppendorf tubes for 10 min at 42 °C in 140 μL of 5 \times SSC solution. The "hybridization step" was performed with 140 μL of DIG-labeled probe solution in 5 \times SSC for 30 min at 42 °C (Figure 1, B1). The same assay was also performed with a noncomplementary DIG-labeled probe as a negative control. After that, the "enzymatic labeling step" was

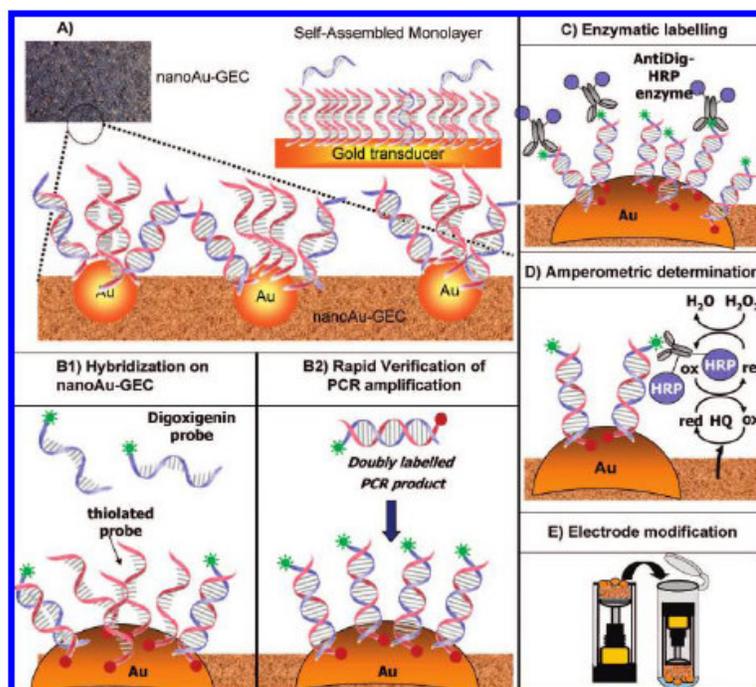


Figure 1. Schematic representation of (A) nanoAu-GEC material showing the isolated gold nanoparticles able to produce "bioactive chemisorbing islands" instead of SAMs on a continuous layer of gold. (B1) Hybridization assay on the nanoAu-GEC electrode. (B2) Rapid electrochemical verification of thiolated and double-tagged amplicons on the nanoAu-GEC electrode (further details of the double-tagging PCR using thiolated primers are shown in Figure 1, B2 in the Supporting Information). Parts C–E are common steps (electrode modification, enzymatic labeling, and amperometric determination) for both parts B1 and B2.

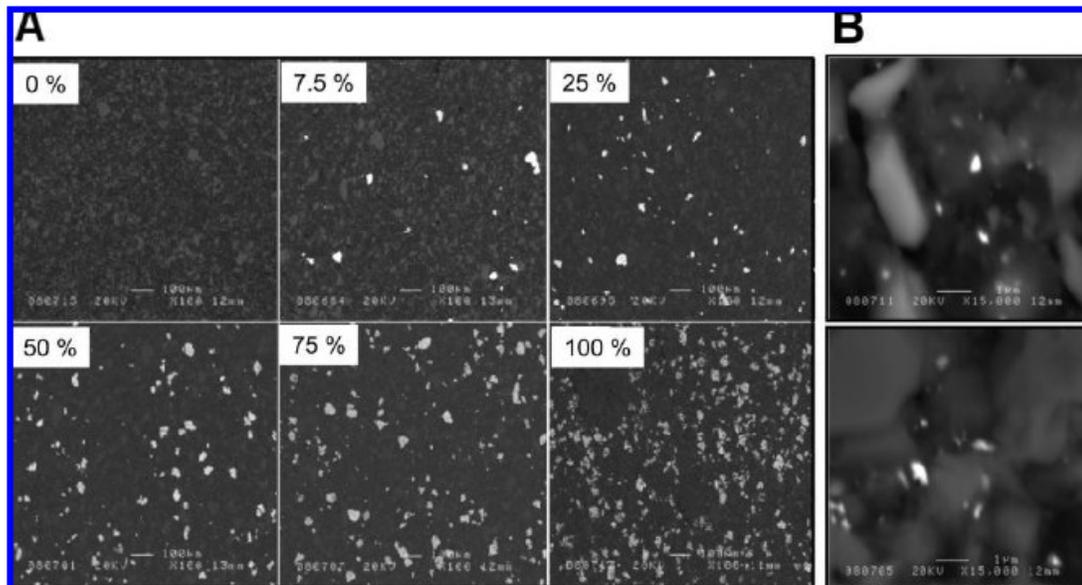


Figure 2. (A) Low-resolution ($100\ \mu\text{m}$) SEM microphotographs showing the distribution of gold nanoparticles aggregated on the surface of nanoAu-GEC sensors (from 0 to 100% of gold nanoparticles). (B) High-resolution ($1\ \mu\text{m}$) SEM microphotographs showing the isolated gold nanoparticles. Acceleration voltage, 20 kV.

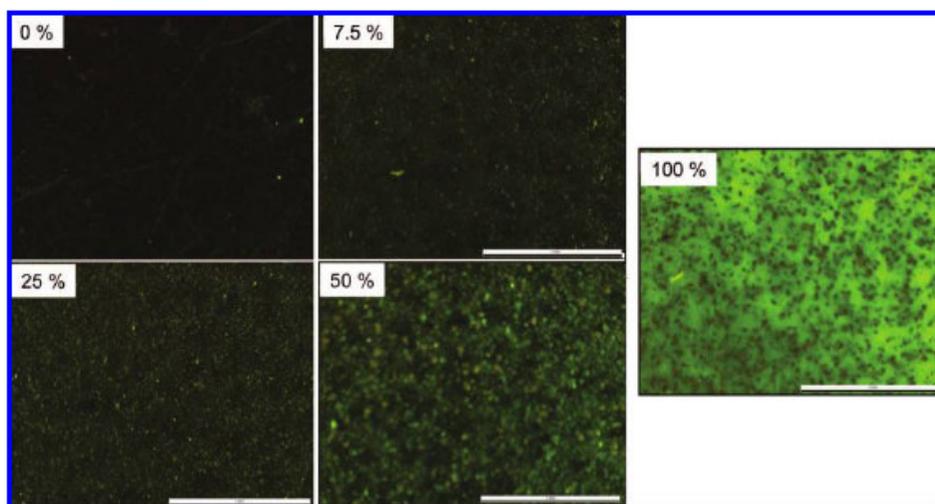


Figure 3. Fluorescence stereomicroscopy at low resolution showing the fluorescence pattern of the different nanoAu-GEC sensors (from 0 to 100% gold nanoparticles) after the immobilization of 200 pmol of double tagged oligo with thiol and fluorescein.

performed using the antiDIG specific antibody labeled with HRP (antiDig-HRP, 60 μg) in blocking Tris buffer at a final volume of 140 μL for 30 min at 42 $^{\circ}\text{C}$ (Figure 1C). Two washing steps were then performed for 10 min at 42 $^{\circ}\text{C}$ in 140 μL of Tris buffer. After the final washing steps, the modified electrode was submitted to the “amperometric determination step”. The modified electrode was immersed into the electrochemical cell containing 20 mL of 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer, 0.1 mol L^{-1} KCl, pH 7.0, 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone, and under continuous magnetic stirring, a potential of -0.015 V vs Ag/AgCl was applied. When a stable baseline was reached, 1 mL of H_2O_2 was added into the electrochemical cell to a final concentration of 4.90 mmol L^{-1} (which corresponds to the H_2O_2 concentration capable to saturate the whole enzyme amount employed in the labeling procedure), and the current was measured until the steady-state current was reached (normally after 1 min of H_2O_2 addition). This steady-state current was used for Figures 5 and 6.

The evaluation of the nonspecific adsorption of the DIG-labeled probe was performed by adding all reagents except the thiolated capture probe. The study of the surface coverage was performed as previously explained for the hybridization study but changing the amount of thiolated oligo during step (i) (immobilization of the thiolated oligo on the nanoAu-GEC electrode) from 2 to 200 pmol while keeping constant the amount of DIG-labeled complementary probe in 0.5 pmol during step (ii) (hybridization).

Rapid Electrochemical Verification of the Double-Tagged PCR Amplicon with Thiolated and Digoxigenin Moieties. The protocol consists briefly of the following steps, as also shown in Figure 1: (i) DNA amplification and double-labeling of *Salmonella* IS200 insertion sequence; (ii) immobilization of the doubly tagged amplicon in which the thiolated end of the ds-DNA amplicon was immobilized on the nanoAu-electrode; (iii) enzymatic labeling using as the enzyme label the antibody antiDIG-HRP able to bond the other labeled extreme of the ds-DNA amplicon; and (iv) amperometric determination.

After the DNA amplification with the double-tagging PCR of the IS200 element specific for *Salmonella* sp. (Figure 1, B2 in the Supporting Information), a dilution of the amplified product coming directly from the PCR was prepared in 5 \times SSC. The immobilization was performed in 5 \times SSC at a final volume of 140 μL for 30 min at 42 $^{\circ}\text{C}$, as shown in Figure 1, B2 in the Supporting Information. Two washing steps were then performed in the Eppendorf tubes for 10 min at 42 $^{\circ}\text{C}$ in 140 μL of 5 \times SSC. After that, the “enzymatic labeling step” as well as the washing steps and the electrochemical detection were performed as previously explained in Hybridization on the NanoAu-GEC Electrode and Surface Coverage Studies.

RESULTS AND DISCUSSION

Microscopic Characterization of NanoAu-GEC Electrodes.

The location and spatial pattern of the gold nanoparticles on the surface of the sensor was observed with scanning electron microscopy with an EDX detector. Figure 2A (taken at low resolution) shows, as bright spots, the aggregates of gold nanoparticles for nanoAu(7.5%)-GEC, which appear to be in increased frequency when increasing the percentage of gold nanoparticles until nanoAu(100%)-EC. However, high-resolution SEM micrographs for nanoAu(7.5%)-GEC (Figure 2B) show clearly isolated gold nanoparticles of about 100 nm within the composite, demonstrated with the EDX detector providing the characteristic gold X-ray spectrum. Moreover, the availability of gold nanoparticles in the composite for the immobilization of thiolated oligos was also studied with fluorescence stereomicroscopy. In this case, 200 pmol of double-tagged oligo with both a thiolated 5' end and the fluorescein 3' end was immobilized on the electrodes with different composition. As can be seen in Figure 3, an increasing amount of fluorescence was obtained with a higher amount of gold nanoparticles in the composite. The fluorescence shows a discontinuous pattern as fluorescence dots of chemisorbing material surrounded by nonreactive graphite-epoxy composite, except in the case of nanoAu(100%)-EC, in which

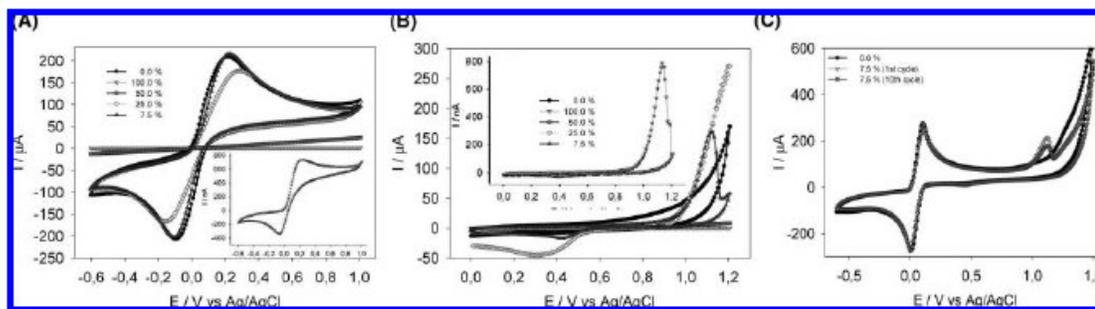


Figure 4. Comparison of the electrochemical properties of nanoAu-GEC sensors (from 0 to 100% gold nanoparticles by cyclic voltammetry). In all cases (A, B and C), 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer, 0.1 mol L^{-1} KCl, pH 7.0, was used, and the potentials were recorded against a Ag/AgCl reference electrode, at a $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. Moreover, for parts A and C, 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone was also used.

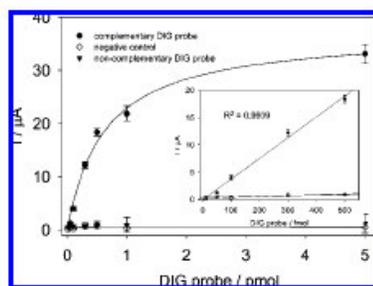


Figure 5. Electrochemical DNA sequence specific detection with increasing amounts of synthetic complementary (●) and noncomplementary (▼) DIG oligo based on the nanoAu(7.5%)-GEC electrode and enzyme labeling. The inset in Figure 5 shows the range of linearity and the value for the regression coefficient. In all cases, 200 pmol of thiolated oligo and $60 \mu\text{g}$ of antiDIG-HRP were used. The nonspecific adsorption (omitting the addition of the thiolated oligo) is also shown (○). Medium: 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer, 0.1 mol L^{-1} KCl, pH 7.0. Mediator: 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone. Substrate: 4.90 mmol L^{-1} H_2O_2 . Error bars indicate the standard deviation ($n = 3$). Applied potential = -0.015 V (vs Ag/AgCl).

a continuous fluorescence pattern is clearly observed. Moreover, it should be pointed out that the fluorescence can be related with the isolated gold nanoparticles pattern because it is not located in the aggregate zones, when comparing with the same photos taken with the stereomicroscope without the fluorescence filter (shown in Figure 3B in the Supporting Information). Thereby, the nanometer scale of gold nanoparticles seems also to play a role in the chemisorbing ability of the gold nanocomposite material, especially in nanoAu(7.5%)-GEC, since the fluorescence pattern is related to the isolated gold nanoparticles instead of the gold aggregates when increasing the amount of gold nanoparticles from 7.5 up to 100%.

Electrochemical Characterization of Bare and DNA-Modified NanoAu-GEC Electrodes. Figure 4A comparatively shows the cyclic voltammograms of the different nanoAu-GEC sensors (from 0 to 100% gold nanoparticles) using as a redox marker HQ (the HRP mediator). As shown in the figure, nanoAu(7.5%)-GEC electrode showed very similar electrochemical behavior compared with nonmodified GEC (nanoAu(0%)-GEC). The relationship of I_{pc}/I_{pa} is equal to unity. When increasing the amount of gold nanoparticles, the electrochemical signal declined, with displace-

ment of values of peak potential and decreasing of signal current intensity, perhaps due to the increasing amount of gold aggregates as previously shown in Figure 2A,B. This study was also useful to establish the location of the reduction potential for the mediator oxidized (HQox) by the enzyme reporter antiDIG-HRP, being the selected potential -0.015 V (vs Ag/Ag/Cl) for further amperometric assays. Figure 4B shows the electrochemical behavior of the electrodes by cycling from 0 to 1.20 V (vs Ag/AgCl) in phosphate buffer. Surprisingly, when increasing the amount of gold nanoparticles from 7.5% to 50%, the gold oxidation signal showed to also be worsened. As a consequence, gold is more available for the electrochemical oxidation in the nanoAu(7.5%)-GEC electrode and is present mostly as nanoparticles instead of aggregates, showing an oxidation signal at $+1.1 \text{ V}$. Interestingly, as can be seen at the insets in both parts A and B of Figure 4, the gold signal reappeared in the nanoAu(100%)-EC (the gold epoxy composite without graphite). However, in this case the signal is in the range of nanoamperes instead of microamperes for GEC (nanoAu(0%)-GEC) and nanoAu(7.5%)-GEC. Although nanoAu(100%)-EC showed properties of interest for further study, the biosensing experiments were performed with the nanoAu(7.5%)-GEC electrode due to the improved electrochemical signal. Although not shown in the figure, the nanoAu(75%)-GEC electrode shows very similar electrochemical behavior to nanoAu(50%)-GEC. Figure 4C shows the electrochemical characterization of the electrode when cycling up to $+1.5 \text{ V}$, up to the reported oxidation potential of gold, with HQ as the electrochemical mediator. As shown in the figure, the cyclic voltammograms of nanoAu(7.5%)-GEC are overlapped with the GEC electrode, except with the oxidation of gold at $+1.1 \text{ V}$, and is maintained almost equal after cycling 10 times.

Although higher electrochemical signals were obtained with the acid and electrochemical treatment of the surface, as shown in Figure 4D in the Supporting Information, the polishing treatment was found to be the most reproducible. Eight different nanoAu(7.5)-GEC electrodes were polished and studied by cyclic voltammetry, showing a $\text{SD}(\%) = 6.7$, for anodic current in 1.81 mmol L^{-1} hydroquinone in 0.1 mol L^{-1} phosphate buffer, 0.1 mol L^{-1} KCl, pH 7.0. ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$), as shown in Figure 4E in the Supporting Information.

The voltammetry for a variety of redox molecules at DNA-modified electrodes can provide additional qualitative information about the system's organization on the surface. The voltammetric

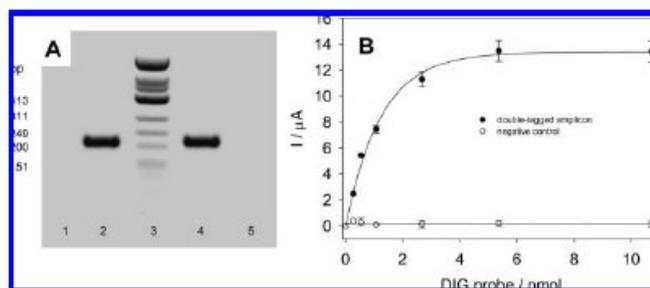


Figure 6. (A) Gel electrophoresis for the DNA double-tagged amplicon with thiolated and digoxigenin primers (lane 4) compared with sized marker (lane 3) and with a positive PCR control performed with the nonlabeled primer (lane 2) and the, respectively, negative assay (lanes 1 and 5). (B) Rapid electrochemical verification of PCR amplification of *Salmonella enterica serovar Typhimurium* ATCC 14028 with the doubly labeled primer set *IS200* based on the nanoAu(7.5%)-GEC electrode (●). The electrochemical signal processing the negative PCR control is also shown (○). In all cases 60 μg of AntiDig-HRP was used. Error bars indicate the standard deviation ($n = 3$). Other experimental details are as in Figure 5.

reversibility of highly charged redox ions is markedly influenced by the attractive/repulsive interactions with the polyanionic DNA layer that the ions must penetrate to reach the electrode surface, in the case of highly packed DNA monolayers.¹¹

The voltammetry for two redox markers of different charge, ferrocyanide (3-/4-), and the neutral probe HQ is given in parts F–I of Figure 4 in the Supporting Information, at the GEC and nanoAu(7.5%)-GEC electrodes before and after the reaction with the thiolated probe.

The voltammetry for the ferrocyanide (3-/4-) redox markers at the DNA-modified nanoAu-GEC is slightly affected by the electrostatic interactions with the polyanionic layer, in contrast to previous reported results for SAMs of DNA in continuous gold electrodes,¹¹ confirming the laxity of the DNA layer created on the nanoAu(7.5%)-GEC electrode. The reduction of ferricyanide is slightly less reversible at DNA/nanoAu(7.5%)-GEC surfaces than at the bare nanoAu(7.5%)-GEC surface, as evidenced by the increased peak splitting, $\Delta E_p = 288$ vs 200 mV. The increase in irreversibility for the redox couple is due to repulsive electrostatic interactions impeding the ability of anions to reach the electrode surface. This effect has been described previously by Tarlov's group, being markedly higher for SAMs of DNA at continuous gold electrodes ($\Delta E_p = 400$ vs 200 mV).¹¹ However, this effect is not observed when the HQ is used as a redox marker. In contrast to previous reported results for SAMs of DNA in continuous gold electrodes,¹¹ these data suggest an architecture that is made up of a disperse layer of oligonucleotide immobilized on the isolated gold nanoparticles and confirms the microscopic pattern achieved by SEM and fluorescence microscopy.

Hybridization on the NanoAu-GEC Electrode and Surface Coverage Studies. In order to avoid the chemisorption of other thiolated molecules, such as proteins or amino acids carrying thiol moieties which could compete for the available gold nanoparticles in the sensor surface, a study of the surface coverage of the nanoAu-GEC electrode was performed, and the results are shown in Figure 5B in the Supporting Information. As shown in the figure, by increasing the amount of thiolated oligo from 2 to 20 pmol, higher hybridization signals were achieved, while from 20 to 200, the electrochemical signal was leveled off. For the further studies, 200 pmol of thiolated oligo was used.

In order to probe the utility of the nanoAu(7,5)-GEC electrode for genosensing, the amperometric response toward different amounts of digoxigenin synthetic DNA oligo (10, 50, 100, 300, 500, 1000, and 5000 fmol) is shown in Figure 5, while the concentration of thiolated probe and AntiDIG-HRP remains constant. As can be seen, the signal clearly increased when increasing the amount of digoxigenin synthetic DNA oligo. As a negative control, the same assay was also performed with different amounts of noncomplementary digoxigenin synthetic DNA oligo (10, 50, 100, 300, 500, 1000, and 5000 fmol) showing negligible response in all the concentration range. Nonspecific adsorption assays evaluate all the adsorption processes producing analytical signals, except hybridization between the thiolated oligo and their complementary digoxigenin DNA sequence. As shown in Figure 5, the contribution of the nonspecific adsorption was constant and negligible. The nonspecific adsorption is mostly related to the adsorption of the digoxigenin probe, perhaps due to the ability of digoxigenin to be chemisorbed on gold to a lesser extent than thiol moieties.

The sensitivity of the assay, extracted from the slope of the linear response (inset in Figure 5), is 37.95 nA/fmol. The calculated LOD for the hybridization assay, based on the $S/N = 3$ IUPAC criteria for detection limit, is 9 fmol (60 pM). As shown in Figure 5, at the LOD concentration level of 9 fmol (60 pM), a signal-to-noise ratio of 3 is achieved; the nanoAu-GEC electrode is able to clearly detect 50 fmol (300 pM) with a signal-to-noise ratio of 12.

Double-Tagging PCR of the *IS200* Element Specific for *Salmonella* with a Thiolated Primer. For the first time, a double tagged PCR using a thiolated primer was performed. The thiol moiety as well as the DIG tag are both incorporated on the PCR product by means of the 5' labeled primers, as shown in Figure 1, B2 in the Supporting Information. After the annealing of both 5' labeled primers on the template, the Taq polymerase enzymatically assembles a new DNA strand by adding nucleotides to the 3' end of both primers. The primers, and thus their tags, are included as a part of the amplicon. Under the PCR conditions used here, this double tagged primer set amplified a 201 bp fragment corresponding to a portion of the *Salmonella enterica* *sv. Typhimurium* specific *IS200* mobile element, according to the agarose

(11) Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Anal. Chem.* 1998, 70, 4670–4677.

gel electrophoresis (Figure 6, A). As such, the compatibility of the thiolated primer with a PCR mix as well as Taq polymerase is demonstrated for the first time.

Rapid Electrochemical Verification of the Double-Tagged PCR Amplicon with Thiolated and Digoxigenin Moieties. The novel nanoAu(7.5%)-GEC transducer was used for the rapid detection of PCR amplification of *Salmonella* sp., using a previously amplified and doubly labeled PCR product with –SH and –DIG in each DNA end to achieve immobilization on the nanoAu(7.5%)-GEC electrode and the electrochemical detection through the antiDIG-HRP electrochemical reporter, respectively.

The amperometric response of the doubly labeled product was then evaluated. Figure 6B shows the calibration plot obtained with different dilutions of the doubly labeled PCR product (1/400, 1/200, 1/100, 1/40, 1/20, and 1/10), comprising the concentration range from 250 fmol to 10 pmol for the PCR amplicon concentration determined spectrophotometrically at 260 nm. As shown in Figure 6B, as low as 200 fmol can be easily detected, with an electrochemical signal of almost 3 μ A. Good reproducibility was also achieved. The nonspecific adsorption was also evaluated by using the PCR negative control, performed with the omission of the *Salmonella* template during the amplification, being as low as 200 nA for the studied range. The signal to nonspecific adsorption ratio (S/R) was of about 15 for 200 fmol of amplicon. As also shown in Figure 6B, the nonspecific adsorption was low and almost the same for all the evaluated concentration range. Although some proteins or amino acids carrying thiol moieties could compete for the available gold nanoparticles on the sensor surface, this is not an issue for this assay taking into account the relative high amount of thiolated amplified product compared to endogenous sample. The negligible value for the negative control compared with the positive signal in PCR coming from real samples shown in Figure 6 confirms this fact. The same effect could be expected from remnant free thiolated primer. However, during the PCR, the primers are mostly consumed and included as a part of the amplicon, as detailed showed in Figure 1, B2 in the Supporting Information. As the concentration of free primers decreases with the increase of amplicon amount during PCR, the remnant low concentration of free thiolated primers does not interfere with the assay as shown in Figure 6. As a result, the biosensor could be used directly on the PCR product without any pretreatment or column separation of the amplicon from remnant reagents and sample (primers, nucleotides, Taq enzyme).

CONCLUSIONS

The nanoAu-GEC material shows interesting properties for electrochemical genosensing in hybridization experiments and very promising features for electrochemical biosensing of a wide range of biomolecules, such as dsDNA, PCR products, affinity proteins, antibodies, or enzymes. Instead of SAMs on continuous layers of gold, isolated gold nanoparticles are able to produce "bioactive chemisorbing islands" for the immobilization of thiolated biomolecules, avoiding stringent conditions for surface coverage

as well as the use of auxiliary reagents such as lateral spacer thiols. Less compact layers are thus achieved favoring the biological reaction on biosensing devices. The spatial resolution of gold nanoparticles was demonstrated to be easily controlled by merely varying its percentage in the composition of the composite. As such, hybridization efficiency is expected to be higher on the edging of the gold nanoparticles surrounded by nonreactive graphite–epoxy composite. Furthermore, the chemisorbing ability of gold nanoparticles in the nano-AuGEC was demonstrated with an excellent LOD (9 fmol/60 pM of ssDNA) in hybridization studies compared with other devices and without the need for complex surface treatment or auxiliary reagents.¹² Beside the immobilization capabilities toward thiolated DNA, this novel material shows excellent electrochemical properties similar to those of GEC. Regarding other electrochemical transducers previously reported, such as an avidin graphite–epoxy biocomposite (Av-GEB) or protein A graphite–epoxy biocomposite (ProtA-GEB),¹³ the main advantages of the inorganic nanoAu-GEC electrode compared to the biocomposite is the lack of loss of activity and that the latter requires the temperature to be kept at 4 °C due to the biological nature of the modifier, the protein avidin.

Moreover, and for the first time, a double tagging PCR strategy was performed with a thiolated primer for the detection of *Salmonella* sp. The rapid electrochemical verification of the amplicon coming from the pathogenic genome of *Salmonella* performed by PCR with a set of two labeled primers was demonstrated to be an easy way for the thiolation of the PCR product. The thiolated end allowed the immobilization of the amplicon on the nano-AuGEC electrode in an easy way. This double tagging PCR strategy opens new routes not only for immobilization purposes but also as an easy strategy for labeling with gold or quantum dots during PCR.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from Ministry of Education and Science (MEC), Madrid (Project BIO2007-63300), is acknowledged. M.I.P. also acknowledges the support from the Universidad Nacional del Litoral (Argentina) and P.R.B.d.O.M. and H.Y. from Conselho Nacional de Pesquisa-CNPq (Brasil).

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Expanded version of Figures 1 and 3–5. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review August 18, 2008. Accepted December 24, 2008.

AC801736B

(12) Pingarrón, J. M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. *Electrochim. Acta* **2008**, *53*, 5848–5866.

(13) (a) Williams, E.; Pividori, M. I.; Merkoçi, A.; Forstner, R. J.; Alegret, S. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *19*, 165–175. (b) Zacco, E.; Pividori, M.; Llopis, X.; del Valle, M.; Alegret, S. *J. Immunol. Methods* **2004**, *286*, 35–46. (c) Lerma, A.; Zacco, E.; Barak, J.; Delwiche, M.; Campoy, S.; Barbé, J.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1805–1811.