

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

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS PARA DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM
DE HEPATITE C

NAIRA CANEVAROLO PESQUERO

Tese de Doutorado

2013

NAIRA CANEVAROLO PESQUERO

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVOS PARA DIAGNÓSTICO E GENOTIPAGEM
DE HEPATITE C

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hideko Yamanaka

Araraquara

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

P474d Pesquero, Naira Canevarolo
Desenvolvimento de dispositivos para diagnóstico e
genotipagem de Hepatite C / Naira Canevarolo Pesquero. –
Araraquara : [s.n], 2013
140 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Hideko Yamanaka

1. Química analítica. 2. Hepatite C. 3. Genossensor.
4. Eletroanalítica. I. Título.

DADOS CURRICULARES

DADOS PESSOAIS

Nome: Naira Canevarolo Pesquero

Data de Nascimento: 29 de outubro de 1985

Naturalidade: São Carlos - SP

Nacionalidade: Brasileiro

Estado Civil: Solteiro

Filiação:

Pai – José Carlos Pesquero

Mae – Elisabete Teresinha Canevarolo Pesquero

Profissão: Bacharel em Química

Documento de Identidade: 40.063.534-3 SSP/SP

Endereço para Correspondência:

Avenida Presidente Kennedy, 35 – Jardim dos Sonhos – CEP: 14700-505

Bebedouro - SP

e-mail: nairacp@gmail.com

FORMAÇÃO

Básica

Ensino Fundamental I: E. E. “Abílio Alves Marques” – Bebedouro – SP

Ensino Fundamental II: Colégio Objetivo – Bebedouro – SP

Ensino Médio: Colégio Objetivo – Bebedouro – SP

Acadêmica

GRADUAÇÃO

Bacharel em Química junto ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Araraquara-SP.

Conclusão: dezembro de 2007.

Iniciação Científica realizada junto ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da UNESP - Araraquara-SP, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno.

Projeto:

“Propriedades estruturais do Li_xCoO_2 preparado a baixa e alta temperatura e sua influência no desempenho eletroquímico de carga/descarga” de julho de 2006 a dezembro de 2007. Bolsa concedida pela FAPESP (Processo no 2006/52404-4).

PÓS-GRADUAÇÃO

Mestrado em Biotecnologia junto ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (UNESP) Araraquara-SP, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno.

Conclusão: fevereiro de 2010.

Projeto:

“Estudo da equivalência entre a lectina ArtinM obtida a partir da semente da jaca e a sua forma recombinante em sua afinidade por glicanas” de março de 2008 a fevereiro de 2010. Bolsa concedida pelo CNPq.

Doutorado em Química junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) Araraquara – SP, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka.

Conclusão: Agosto de 2013.

Projeto:

“Desenvolvimento de dispositivos para diagnóstico e genotipagem de Hepatite C” de março de 2010 a agosto de 2013. Bolsa concedida pela CAPES.

DISCIPLINAS CURSADAS NA PÓS-GRADUAÇÃO

Disciplinas cursadas	Créditos	Carga Horária	Frequência	Conceito
Compostos Metal-Orgânicos Moleculares e Supramoleculares e suas Aplicações Biológicas e Tecnológicas	12	180	93	B
Quimiometria	12	180	100	A
Espectroanalítica Molecular	12	180	100	A
Introdução à Eletroquímica Ambiental	6	90	100	A
Aproveitamento do Mestrado				
Aplicações da Biologia Molecular na Biotecnologia				
Biossensores				
Genética de Microrganismos				
Métodos Instrumentais de Análise				
Bioestatística				
Receptores e transdutores: Biossensores				

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

PESQUERO, N. C., GONGORA-RUBIO, M. R., YAMANAKA, H. Construção e caracterização de eletrodo de carbono impresso para construção de genossensor. **IN: XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica**, Fortaleza – CE, 25 a 30 de março de 2012.

PESQUERO, N. C., BUENO, P. R., FURLAN, F. F., SANTIAGO, E. I., VARELA, J. A., LONGO, E. Voltage-Composition profile and structural analysis of low and high temperature Li_xCoO_2 cathodes. **IN: 11^a International Conference on Advanced Materials**, Rio de Janeiro – RJ, 20 – 25 de setembro de 2009.

PESQUERO, N. C., BUENO, P. R., PEDROSO, M. M., FARIA, R. C., ROQUE-BARREIRA, M. C. Equivalence of Native and Recombinant ArtinM-Carbohydrates Recognition Evaluated by Eletrogravimetric Technique. **IN: 11^a International Conference on Advanced Materials**, Rio de Janeiro – RJ, 20 – 25 de setembro de 2009.

PESQUERO, N. C., PEDROSO, M. M., BUENO, P. R., ROQUE-BARREIRA, M. C., FARIA, R. C. Determinação da constante cinética da lectina KM+ pelo ligante peroxidase por meio da técnica de microbalança de cristal de quartzo. 2008. **IN: 6th Ibero-American Congress on Sensors (Ibersensor)**, São Paulo – SP, 24 – 26 de novembro de 2008.

PESQUERO, N. C., BUENO, P. R., FERREIRA, F. F., SANTIAGO, E. I., VARELA, J. A., LONGO, E. Structural study of the Li_xCoO_2 prepared at low and high temperature by analysis of synchrotron X-ray powder diffraction and discharge curves. **IN: Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat)**. Guarujá – SP, 28 de setembro a 02 de outubro de 2008.

GONZÁLEZ, A. H. M., PESQUERO, N. C., GÓES, M. S., BUENO, P. R., VARELA, J. A., LONGO, E. Estudo da estrutura cristalina de óxidos de LiCoO_2 sintetizados em baixa e alta temperatura pelo método de Rietveld. **IN: Latin American Workshop on Applications of Powder Diffraction**, Campinas – SP, 16 a 20 de abril de 2007.

PUBLICAÇÕES

PESQUERO, N. C., GONGORA-RUBIO, M. R., YAMANAKA, H. A novel LTCC electrochemical cell construction and characterization: a detection compartment for portable devices. **Analyst**, v. 138, p. 4298-4304, 2013.

FERREIRA, A. A. P., ULIANA, C. V., CASTILHO, M. S., PESQUERO, N. C., FOGUEL, M. V., SANTOS, G. P., FUGIVARA, C. S., BENEDETTI, A. V., YAMANAKA, H. Amperometric biosensor for diagnosis of disease. In: RINKEN, T. **State of the art in biosensors: environmental and medical applications**. Hard cover: In Tech, 2013. Cap. 12, p. 253 – 285.

GIMÉNEZ-ROMERO, D., BUENO, P. R., PESQUERO, N. C., MONZÓ, I. S., PUCHADES, R., MAQUIEIRA, A. Elucidation of carbohydrate molecular interaction mechanism of recombinant and native ArtinM. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 28, p.8360-8369, 2013.

PEDROSO, M. M., PESQUERO, N. C., THOMAZ, S. M., ROQUE-BARREIRA, M. C., FARIA, R. C., BUENO, P. R. Jacalin interaction with human immunoglobulin A1 and bovine immunoglobulin G1: Affinity constant determined by piezoelectric biosensing. **Glycobiology**, v. 22, p. 326-331, 2012.

PESQUERO, N.C., PEDROSO, M.M., WATANABE, A.M., GOLDMAN, M.H.S., FARIA, R.C. ; ROQUE-BARREIRA, M.C. ; BUENO, P.R. . Real-time monitoring and kinetic parameter estimation of the affinity interaction of jArtinM and rArtinM with peroxidase glycoprotein by the electrogravimetric technique. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 36-42, 2010.

BUENO, P. R., PESQUERO, N. C., FURLAN, F. F., SANTIAGO, E. I., VARELA, J. A., LONGO, E. Voltage-composition profile and synchrotron X-ray structural analysis of low and high temperature Li_xCoO_2 host material. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, p. 14655-14664, 2008.

PESQUERO, N. C., BUENO, P. R., VARELA, J. A., LONGO, E. Materiais cerâmicos de inserção aplicados a baterias de íons lítio. **Cerâmica**, v. 54, p. 233-244, 2008.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica (Sibae), Fortaleza – CE, 25 – 30 de março de 2012.

Workshop Nacional sobre Biossensores, Araraquara – SP, 07 – 09 de outubro de 2009.

6th Ibero-American Congress on Sensors (Ibersensor), São Paulo – SP, 24 – 26 de novembro de 2008.

Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMat). Guarujá – SP, 28 de setembro a 02 de outubro de 2008.

Latin American Workshop on Applications of Powder Diffraction, Campinas – SP, 16 a 20 de abril de 2007. Estudo da estrutura cristalina de óxidos de LiCoO₂ sintetizados em baixa e alta temperatura pelo método de Rietveld.

XXXVII Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 23 a 28 de setembro de 2007.

XXXVI Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 25 a 29 de setembro de 2006.

XXXV Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 16 a 21 de outubro de 2005.

XXXIV Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 25 a 27 de outubro de 2004.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

Bolsista-Didático na disciplina Química Analítica Quantitativa, ministrada à turma de bacharelado em química, no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, 03 de março a 06 de julho de 2013.

Participação do Grupo PET do Instituto de Química da UNESP - Araraquara, no período de março de 2005 a maio de 2007.

Membro da comissão organizadora do seguinte evento:

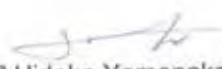
XXXV Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 16 a 21 de outubro de 2005.

NAIRA CANEVAROLO PESQUERO

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

Araraquara, 21 de agosto de 2013.


BANCA EXAMINADORA



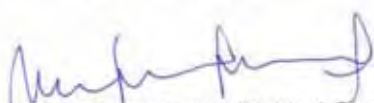
Profª Drª Hideko Yamanaka (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara




Prof. Dr. Assis Vicente Benedetti
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Dr. Antônio Aparecido Pupim Ferreira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Maria Isabel Pividori Gurgo
Universidade Autônoma de Barcelona – UAB, Espanha



Drª Neiva Sellan Lopes Gonçales
Centro de Hematologia e Hemoterapia – UNICAMP, Campinas

À minha mãe Elisabete, ao meu irmão Lucas, aos meus avós, Brasilina e Antônio, e ao namorado Carlos por todo o apoio em todos os momentos de aflição, pelo imenso amor, carinho, preocupação e, principalmente pela paciência.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Dr^ª. Hideko Yamanaka pela orientação, pela amizade, pelo apoio, e principalmente pela formação profissional passada a mim durante a execução deste trabalho.

Ao Dr. Mário Ricardo Gongora Rúbio pela orientação durante o trabalho com a célula e por todas as discussões, as quais foram enriquecedoras.

À Prof^ª. Dr^ª. Neiva Sellan Lopes por fornecer as amostras de material genético viral.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Célia Bertolini pelo apoio e por toda a ajuda para a realização da amplificação das amostras.

À Fernanda Barbosa Cupertino pela paciência, pela amizade e por todo conhecimento transmitido durante os experimentos que realizamos juntas.

Ao Antônio Aparecido Pupim Ferreira pela amizade e por todo conhecimento transmitido nos momentos de maior necessidade.

Aos professores componentes do Grupo de Eletroanalítica, Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto, Prof^ª. Dr^ª. Maria Valnice Boldrin e Prof^ª. Dr^ª. Maria Del Pillar pela amizade, pelo apoio e por todas as discussões enriquecedoras.

Aos meus amigos Elaine Muniz, Carol Rabal, Marcos Foguel, Juliana Brito, Higor, Vinícius, Carol Rocha e Josiel pela amizade, apoio e carinho, e também por todos os momentos felizes de comemoração e por àqueles não tão felizes, mas que também ajudaram a me tornar uma pessoa melhor.

A todos os demais integrantes do Grupo de Eletroanalítica pelo apoio, amizade e também por todos os momentos de discussões informais, os quais auxiliaram imensamente na concretização deste trabalho.

A todos os alunos da Prof^ª. Maria Célia Bertolini pela amizade, acolhimento e auxílio durante a minha estada em seu laboratório.

A todos a minha imensa e eterna gratidão!

*“Há dois tipos de sabedoria: a inferior e a superior.
A sabedoria inferior é dada pelo quanto uma pessoa sabe
e a superior é dada pelo quanto ela tem consciência de que não sabe.
Tenha a sabedoria superior. Seja um eterno aprendiz na escola da vida.”
Chico Xavier*

*“De nada vale o brilho da inteligência se o coração permanece às escuras.”
Bezerra de Menezes*

RESUMO

No presente trabalho estudou-se a construção de um genossensor e sua viabilidade para compor um dispositivo de análise rápida que pudesse ser aplicado na realização do diagnóstico e genotipagem do vírus da Hepatite C (HCV). Primeiramente otimizou-se uma metodologia para a construção dos eletrodos de carbono impresso, os quais foram empregados como dispositivo transdutor. O genossensor foi, então, construído pela imobilização da sonda de captura na superfície do eletrodo de carbono. A sua superfície foi eletroquimicamente oxidada para a geração de grupos carboxílicos, os quais foram utilizados para a imobilização da proteína estreptavidina (STA). A sonda de captura biotinilada foi, então, imobilizada via interação biotina-STA, sendo os sítios remanescentes da STA bloqueados com biotina. Monitorou-se o evento biológico de hibridização entre a sonda de captura e sua sequência complementar via corrente de oxidação da base nitrogenada guanina. Para tanto foi empregada a técnica de voltametria de onda quadrada. Este genossensor demonstrou alta seletividade frente às sequências de oligonucleotídeos contendo uma e quatro bases não complementares e sequências provenientes de viroses coinfectantes do HCV (HIV e HBV). O genossensor estudado foi aplicado na identificação de amostras provenientes de pacientes HCV positivos (HCV do tipo 1 e 3) e negativos. O estudo das amostras negativas possibilitou a determinação de um valor de *cut-off* de 37 μA , o qual foi utilizado na genotipagem das amostras classificadas como positivas. Em seguida, construiu-se uma célula de detecção com volume de 25 μL utilizando a cerâmica LTCC (do inglês, *Low Temperature Co-Fired Ceramic*). Os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar foram confeccionados dentro da célula utilizando tintas condutoras. O comportamento eletroquímico da célula foi avaliado em sistema contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4+}$. Finalmente, o genossensor foi construído dentro da célula de detecção utilizando-se, desta vez, nanotubos de carbono para amplificação do sinal de oxidação da base nitrogenada guanina. Verificou-se um bom desempenho do conjunto para realização do diagnóstico e genotipagem do HCV.

ABSTRACT

In the present work was studied the construction of a genosensor and its availability to compose a device for fast analysis which could be applied in Hepatitis C virus (HCV) diagnose and genotyping. Firstly the methodology for screen printed electrodes' construction was optimized and these electrodes were used as transducer device. Then the genosensor was constructed immobilizing the capture probe on the electrode surface. Thereunto the surface was electrochemically oxidized to carboxylic groups formation, which were used to streptavidin (STA) immobilization. After the biotinilated probe was immobilized through biotin-STA interaction, and the STA reminiscent sites were blocked with biotin solution. Hybridization between the capture probe and its complementary sequence was monitored by means of the guanine oxidation current. Square wave voltammetry was used to this end. The final genosensor showed high selectivity when incubated in solution containing sequences with one and four non complementary nitrogenous bases and also with sequences of coinfecting viruses (HIV e HBV). This genosensor was applied in the identification of samples of HCV positives (HCV type 1 and 3) and negatives patients. This study allowed the determination of the cut-off value (37 μ A) which was used in the HCV positive genotyping process. Then a 25 μ L detection cell was constructed using LTCC ceramic. The working, reference and auxiliary electrodes were prepared inside the cell by means of conducting inks. The cell electrochemical behavior was evaluated in a standard system (with the redox pair $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3+}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4+}$). Finally, the genosensor was constructed inside the detection cell using carbon nanotubes as amplifier of the guanine oxidation signal. A very good performance to the conjoint was observed, which means that this system is promising to be applied to realize HCV diagnose and genotyping.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático do vírus da Hepatite C. (MARQUES, 2009).....	34
Figura 2: Representação esquemática do genoma do vírus da Hepatite C. (SUZUKI, 2007) .	35
Figura 3: Diagrama esquemático do ciclo de vida do vírus da Hepatite C. (SUZUKI, 2007).	36
Figura 4: Prevalência mundial do vírus da Hepatite C. (NADEEM, 2010).....	37
Figura 5: Diagrama esquemático da sequência a ser amplificada. Reagentes a serem utilizados em uma reação de PCR.	42
Figura 6: Diagrama esquemático da estrutura em dupla hélice do DNA.....	44
Figura 7: Diagrama esquemático de um genossensor e da detecção de uma sequência alvo (DRUMMOND, 2003).....	45
Figura 8: Reação de oxidação da base nitrogenada guanina sobre a superfície de carbono (WANG, 2000).	51
Figura 9: Esquema da construção do eletrodo de carbono impresso.....	63
Figura 10 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em (\diamond) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0 e em solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ utilizando solução tampão fosfato como eletrólito suporte (\bullet) antes e (\circ) após o polimento com pasta de alumina $0,05 \text{ }\mu\text{m}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	67
Figura 11 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona registrados (\bullet) antes e (\circ) após a anodização realizada em (A) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0, (B) solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , (C) solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaHCO_3 e (D) solução saturada de Na_2CO_3 . O eletrólito suporte utilizado foi solução tampão fosfato. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	68
Figura 12: Reação de redução da hidroquinona. Processo reversível utilizado na avaliação da reversibilidade dos eletrodos de carbono impresso.	69
Figura 13: Espectro de impedância do eletrodo de carbono impresso em solução tampão fosfato (\circ) antes e (\bullet) após o pré-tratamento eletroquímico em solução saturada de Na_2CO_3	70
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em solução de HQ $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ solubilizada em solução tampão fosfato após a anodização por (—) 60 s, (—) 120 s e (—) 180 s em solução saturada de Na_2CO_3 . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	71
Figura 15 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono impresso registrados em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona solubilizada em solução tampão fosfato. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. $n = 10$	72

Figura 16 - (A) Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono impresso em solução 0,1 mol L ⁻¹ de KCl registrado após a anodização. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	74
Figura 17 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono impressos em (A, C e E) solução tampão fosfato e (B, D e F) em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona construídos (A e B) somente com tinta de grafite, ou seja, sem o contato de prata, (C e D) depositando-se duas vezes a tinta de grafite e (E e F) depositando-se três vezes a tinta de grafite, (●) antes e (○) após a anodização. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	75
Figura 18: Voltamograma cíclico do eletrodo de prata registrado em solução tampão fosfato após o pré-tratamento eletroquímico em solução saturada de Na ₂ CO ₃ . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	76
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono impresso registrados em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de K ₄ Fe(CN) ₆ solubilizada em solução tampão fosfato. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. $n = 10$	77
Figura 20 - Micrografias do eletrodo de carbono impresso (A e C) antes da anodização e (B e D) após a anodização.	78
Figura 21: Diagrama esquemático da superfície do eletrodo de carbono impresso funcionalizada (do autor).....	82
Figura 22: Sequência do RNA do vírus da hepatite C transcrita e amplificada (sublinhada). (do autor).....	84
Figura 23: Diagrama esquemático da reação de PCR realizada para amplificação do material genético viral. (do autor).....	85
Figura 24: Estrutura da guanosina 5' monofosfato. Destacado em vermelho a base nitrogenada guanina, e em azul os grupamentos que sofrem reação de oxidação.....	90
Figura 25 - A- Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono impresso em: (○) solução tampão fosfato; (●) solução 0,5 mol L ⁻¹ de guanosina 5'-monofosfato. $v=50 \text{ mV s}^{-1}$. B- Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso em: (○) solução tampão fosfato; (●) solução 0,5 mol L ⁻¹ de guanosina 5'-monofosfato. $f = 200 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$ e $\Delta E = 15 \text{ mV}$	90
Figura 26 – (A) Geração de grupamentos carboxílicos por meio da oxidação eletroquímica. (B) Mecanismo de ativação dos grupamentos carboxílicos por meio da reação com EDC/NHS, onde 1 simboliza a superfície funcionalizada e 2 simboliza a STA.	91
Figura 27 - Voltamogramas cíclicos em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de K ₄ Fe(CN) ₆ do eletrodo de carbono impresso, (A) oxidado em solução ácida de K ₂ Cr ₂ O ₇ e (B) não oxidado, (●) antes e (○) após a incubação com STA. (C) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de K ₄ Fe(CN) ₆ (○) antes e (●) após a oxidação, porém sem o pré tratamento em solução saturada de Na ₂ CO ₃ . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	92
Figura 28 - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso em (●) solução tampão fosfato, (—) solução 0,5 mmol L ⁻¹ de guanosina 5'-monofosfato solubilizada em solução tampão fosfato e (○) do eletrodo de carbono modificado com a sonda via	

interação STA-biotina em meio de solução tampão fosfato. $v = 200$ Hz, $\Delta E = 15$ mV, $\alpha = 40$ mV..... 94

Figura 29 - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo do carbono impresso modificado com STA em solução tampão fosfato, incubado com (○) a sonda de DNA, (●) a sequência complementar e sem sonda e (-) somente modificado com STA. $v = 200$ Hz, $\Delta E = 15$ mV, $\alpha = 40$ mV..... 95

Figura 30: (A) Pareamento entre as bases nitrogenadas guanina e citosina. (B) Reação de oxidação da base nitrogenada guanina. (MARQUES, 2009)..... 96

Figura 31 - Resultados referentes à otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada..... 97

Figura 32 - Otimização das condições para imobilização da sonda de DNA na superfície do eletrodo impresso de grafite. (A) e (C) Tendência para os níveis alto e baixo de cada uma das variáveis. (B) Diagrama de pareto mostrando os efeitos da concentração e do tempo de incubação da STA e da sonda de captura na resposta do eletrodo modificado. C_{STA} = concentração de estreptavidina, C_{sonda} = concentração da sonda de captura, t_{STA} = tempo de incubação da estreptavidina e t_{sonda} = tempo de incubação da sonda de captura..... 98

Figura 33: Espectro vibracional na região do infravermelho (IV-DRIFTS) do eletrodo de carbono impresso anodizado em solução saturada de Na_2CO_3 e oxidado em solução ácida de $K_2Cr_2O_7$ e após a incubação em solução de STA (b) $0,05$ mg mL^{-1} e (a) $0,10$ mg mL^{-1} 99

Figura 34: Espectro vibracional na região do infravermelho (IV-DRIFTS) do eletrodo de carbono impresso anodizado em solução saturada de Na_2CO_3 e oxidado em solução ácida de $K_2Cr_2O_7$, modificado com solução de STA $0,05$ mg mL^{-1} e incubado em solução de sonda de DNA por (a) 15 minutos e (b) 30 minutos..... 100

Figura 35 - Voltamograma de onda quadrada do eletrodo do carbono impresso registrado em solução tampão fosfato modificado (○) somente com a sonda de DNA e (●) com a sonda hibridizada com sua sequência complementar. $v = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV. 101

Figura 36 – Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, modificado com a sonda (A) HCV3 e (B) HCV1, registrado após a incubação em solução tampão SSC contendo (-) sequência complementar; (-) sequência não complementar; (-) sequência NC1; (-) sequência NC4. (-) Voltamograma de onda quadrada do genossensor. $v = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV. 102

Figura 37 - Análise das amostras de pacientes (■) HCV1 positivos e (◆) HCV negativos utilizando o genossensor desenvolvido. (A) Diluição do DNA em solução tampão fosfato, (B) diluição do DNA em tampão de hibridização do kit de diagnóstico e (C) diluição do DNA em solução tampão SSC. 104

Figura 38 - Intensidade de corrente obtida para as amostras (■) HCV1 positivas e (●) negativas. 105

Figura 39 - 1) Eletroforese em gel de agarose 1 % do fragmento do RNA viral amplificado após síntese do cDNA. (L, ladder 1 kb). 106

Figura 40: Sequência palindrômica de reconhecimento e clivagem da enzima NheI. Localização desta sequência no material amplificado e os fragmentos liberados após a clivagem (do autor).....	106
Figura 41 – Voltamogramas de onda quadrada do genossensor registrados, em solução tampão fosfato, (●) antes e (○) após o evento de hibridização com o material amplificado. $v = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E = 16 \text{ mV}$, $\alpha = 55 \text{ mV}$	107
Figura 42: Diagrama esquemático do genossensor após a incubação com o material genético viral amplificado (do autor).....	107
Figura 43: Valores de intensidade de corrente para as amostras HCV (●) positivas e (■) negativas, e o valor de cut-off para o genossensor construído.	108
Figura 44: Fotografia da célula de detecção construída.....	113
Figura 45 - (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso construído sobre substrato de (○) alumina e (-) LTCC, registrados em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. (B) Avaliação da repetibilidade dos eletrodos de carbono impresso construídos com LTCC. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. $n = 10$	117
Figura 46 - Voltamogramas cíclicos registrados em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ utilizando uma célula composta por (A) eletrodo de carbono vítreo, fio de platina e eletrodo impresso de Ag/AgCl, (B) eletrodos impressos de carbono, platina e Ag/AgCl, como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	118
Figura 47 - Voltamograma cíclico registrado na célula de detecção contendo os três eletrodos de tinta em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (●) antes e (○) após o processo de anodização. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	119
Figura 48 – Voltamogramas de onda quadrada da célula de detecção registrados em (●) solução tampão fosfato e em (○) solução de guanosina 5' monofosfato $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E = 16 \text{ mV}$, $\alpha = 55 \text{ mV}$	120
Figura 49: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, depositado dentro da célula de detecção, (●) limpo e (○) modificado com a sonda de captura, em solução tampão fosfato. $v = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E = 16 \text{ mV}$, $\alpha = 55 \text{ mV}$	121
Figura 50: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, depositado dentro da célula de detecção, (●) limpo, (○) modificado com a sonda de captura e (Δ) modificado com a sonda e incubado em solução contendo a sequência complementar, em solução tampão fosfato. $v = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E = 16 \text{ mV}$, $\alpha = 55 \text{ mV}$	122
Figura 51: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, depositado dentro da célula de detecção, (○) limpo, (●) modificado com a sonda de captura HCV1 e (Δ) modificado com a sonda HCV1 e incubado em solução contendo a sequência complementar HCV3, em solução tampão fosfato. $v = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E = 16 \text{ mV}$, $\alpha = 55 \text{ mV}$	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Biossensores relatados na literatura, que utilizam como material de reconhecimento biológico células, anticorpos e lectina para promover o diagnóstico do HCV.	54
Tabela 2: Biossensores relatados na literatura, que utilizam como material de reconhecimento biológico DNA, PNA e RNA para promover o diagnóstico do HCV	56
Tabela 3: Intensidade das correntes de pico anódica e catódica, assim como a sua razão, observadas após o pré-tratamento eletroquímico realizado nos diferentes meios.....	70
Tabela 4: Valores dos potenciais e correntes de pico, ΔE_p e I_{pa}/I_{pc} calculados a partir do voltamogramas cíclicos registrados em solução de HQ após a pré anodização conduzida em solução saturada de Na_2CO_3 por diferentes tempos de aplicação do potencial.....	72
Tabela 5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do genossensor.	83
Tabela 6 – Intensidade de corrente em potencial 1,07 V do genossensor incubado com as sequências complementar e não complementar, sequências contendo 1 e 4 bases não complementares e sequências de vírus coinfectantes (HIV e HBV). n = 5	103
Tabela 7: Valores médios de intensidade de corrente observados para as amostras quando incubadas no genossensor modificado com as diferentes sondas de captura. Procedimento para genotipagem viral. (n=3)	109
Tabela 8: Intensidade de corrente em potencial 1,13 V do genossensor construído dentro da célula de detecção e incubado com as sequências complementar HCV1 e HCV3 e com as sequências de vírus coinfectantes (HIV e HBV).....	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APL – leucemia promielocítica aguda
- AuNP – nanopartículas de ouro
- cDNA – DNA complementar
- CML – leucemia mieloide crônica
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DPV – voltametria de pulso diferencial
- ELISA – do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*
- GCE – eletrodo de carbono vítreo (do inglês, *glass carbon electrode*)
- HCV – Vírus da Hepatite C
- HGV / GBV-C – Vírus da Hepatite G
- ITO – óxido de índio e estanho (do inglês, *indium tin oxide*)
- LNA – Ácido nucleico bloqueado (do inglês, *locked nucleic acid*)
- LTCC – do inglês, *Low Temperature Co-Fired Ceramic*
- MEMS – sistemas micro-eleto-mecânicos (do inglês, *micro-electro-mechanical-systems*)
- NANBH – Hepatite não A e não B
- ORF – Janela de leitura aberta (do inglês, *open reading frame*)
- PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)
- PEG IFN- α – Interferon- α peguilado
- PEG – polietilenoglicol
- PNA – Ácido nucleico peptídico (do inglês, *peptide nucleic acid*)
- RIBA – do inglês, *Recombinant Immunoblot Assay*
- RNA – Ácido Ribonucléico
- RT-PCR – reação de transcrição reversa seguida pela amplificação por PCR
- SDS – dodecilsulfato de sódio
- SPR – ressonância de superfície plasmônica
- STA – estreptavidina
- SWV – voltametria de onda quadrada
- TMA – amplificação mediada pela transcriptase (do inglês, *Transcription-mediated amplification*)
- UTR – Região não traduzida (do inglês, *untranslated region*)
- μ TAS – do inglês *micro Total Analysis Systems*
- 5-ASA – ácido 5-aminossalicílico

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	31
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO.....	33
1. A HEPATITE C.....	33
1.1. Breve histórico da Hepatite C	33
1.2. O vírus da Hepatite C.....	34
1.3. A Hepatite C e sua prevalência	36
1.4. O Diagnóstico.....	38
2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR E OS GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS	41
2.1. A reação em cadeia da polimerase (PCR).....	41
2.2. Genossensores	43
2.3. Estratégias para a construção de um genossensor eletroquímico.....	46
2.3.1. A funcionalização do eletrodo de trabalho	46
2.3.2. Escolha da sonda de captura	48
2.3.2. Métodos de detecção eletroquímica	49
3. DISPOSITIVOS DE DIAGNÓSTICO	52
3.1. Dispositivos de análise rápida, genossensores e diagnóstico do HCV.....	53
OBJETIVO GERAL	59
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
CAPÍTULO II: ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO.....	63
1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	63
1.1. Materiais e Métodos	63
1.1.1. Construção dos eletrodos de carbono impresso	63
1.1.2. Ativação dos eletrodos de carbono impresso.....	64
1.2. Instrumentação	64
1.2.1. Análise Voltamétrica.....	64
1.2.2. Análise Impedimétrica	64
1.2.3. Microscopia de varredura de alta resolução (FEG-MEV).....	65
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
2.1. Caracterização e otimização dos processos de transferência eletrônica	67
2.2. Otimização da construção do eletrodo de carbono impresso.....	73
2.3. Caracterização da superfície do eletrodo	77

3. CONCLUSÃO PARCIAL.....	79
CAPÍTULO III: GENOSENSOR.....	81
1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	81
1.1. Materiais e Métodos.....	81
1.1.3. Metodologia para imobilização da sonda	81
1.1.4. As sequências de DNA.....	82
1.1.5. Metodologia para hibridização do material genético viral amplificado com a sonda imobilizada na superfície do transdutor	83
1.2. Instrumentação	87
1.2.1. Análise Voltamétrica.....	87
1.2.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com reflectância difusa transformada de Fourier (IV-DRIFTS).....	87
1.2.4. Análise molecular.....	87
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
2.1. Avaliação da resposta eletroquímica da guanosina 5' monofosfato.....	89
2.2. Estratégia de funcionalização do eletrodo de carbono impresso.....	91
2.3. Otimização das condições para funcionalização do eletrodo de carbono impresso	95
2.4. Estudo das condições para detecção do evento de hibridização	101
2.5. Avaliação da seletividade do genossensor	102
2.6. Aplicação do genossensor desenvolvido em amostras provenientes de pacientes HCV positivos e negativos.....	103
2.7. Aplicação do genossensor desenvolvido na genotipagem viral.....	108
3. CONCLUSÃO PARCIAL.....	111
CAPÍTULO IV: CÉLULA DE DETECÇÃO.....	113
1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	113
1.1. Materiais e Métodos.....	113
1.1.1. Construção da célula de detecção	113
1.1.2. Metodologia de modificação dos nanotubos de carbono	114
1.2. Instrumentação	114
1.2.1. Análise Voltamétrica.....	114
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	117
2.1. Construção e caracterização eletroquímica dos eletrodos de platina e Ag/AgCl.....	117
2.2. Caracterização eletroquímica da célula de detecção	118
2.3. Construção do genossensor na célula de detecção	119

3. CONCLUSÃO PARCIAL.....	125
4. CONCLUSÃO FINAL.....	127
5. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	129
REFERÊNCIAS	131

APRESENTAÇÃO

Esta tese versa sobre o desenvolvimento de um dispositivo para realização do diagnóstico e genotipagem da hepatite C. A construção deste dispositivo foi realizada em três etapas, as quais estão organizadas em capítulos diferentes.

O primeiro capítulo consiste em uma introdução envolvendo uma revisão bibliográfica sobre a hepatite C e os meios empregados na realização do seu diagnóstico e na genotipagem viral. Aborda-se também as perspectivas de utilização dos genossensores eletroquímicos para ambas as finalidades anteriormente citadas. E, por fim, como está ocorrendo a inserção destes genossensores em dispositivos de análise rápida visando a realização de diagnósticos mais rápidos.

No segundo capítulo aborda-se a otimização da metodologia de construção de um eletrodo de carbono impresso, assim como a sua caracterização eletroquímica, utilizando voltametria cíclica, e também sua caracterização superficial por meio de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução.

No terceiro capítulo apresenta-se a otimização de todas as etapas envolvidas na modificação do eletrodo de carbono impresso, anteriormente construído, para o desenvolvimento de um genossensor visando a realização do diagnóstico e a genotipagem do vírus da hepatite C. Por fim, o genossensor foi testado frente a amostras de material genético viral amplificado provenientes de pacientes HCV positivos e negativos.

No último capítulo são abordadas as etapas de construção da célula de detecção. Esta foi desenvolvida por meio da aplicação de tintas condutoras para compor uma célula eletroquímica. O genossensor, anteriormente estudado, foi construído dentro da célula como parte de um dispositivo para diagnóstico e genotipagem de hepatite C.

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO

1. A HEPATITE C

1.1. Breve histórico da Hepatite C

Alguns especialistas acreditam que se o HGV/GBV-C (Vírus da Hepatite G), viroses próximas ao vírus da Hepatite C (HCV), possuem suas origens nos primatas do velho e do novo mundo, onde o início do HCV pode ser datado de 35 milhões de anos. Estas, porém, são somente especulações, sendo que o conhecimento real das origens da Hepatite C é impossível, pois não existem amostras de sangue mais antigas do que 50 anos para a realização de testes. Entretanto, sabe-se que os seis diferentes subtipos do HCV tiveram sua origem há 200 anos, possuindo um ancestral comum datado de 400 anos (FRANCISCUS, 2010).

O HCV foi realmente identificado na década de 80. Em meados da década de 70, com o desenvolvimento de testes específicos para o diagnóstico dos vírus das Hepatites A e B, tornou-se claro que a maioria dos casos de hepatite pós-transfusional não eram causados por nenhuma dessas infecções. Após esta descoberta, houve um esforço internacional em pesquisas para a identificação deste vírus, que foi inicialmente denominado de Hepatite não-A e não-B (NANBH, do inglês, *non-A, non-B hepatitis*). A falta de sucesso dos testes imunológicos convencionais na identificação de antígenos e anticorpos virais específicos foi o maior obstáculo no progresso dos estudos desta nova virose. Embora estes resultados pudessem ser interpretados como uma ausência de anticorpos virais, Choo e colaboradores os relacionaram a uma concentração insuficiente de antígenos provenientes da infecção. Novos testes moleculares de clonagem, realizados no Centro para Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*) levaram à identificação de um organismo desconhecido. E em abril de 1989, Choo e colaboradores publicaram na revista *Science* a descoberta do vírus da Hepatite C (CHOO, 1989; FRANCISCUS, 2010)

A Hepatite C afeta, atualmente, cerca de 170 milhões de pessoas no mundo, que juntamente com as pessoas infectadas por Hepatite B têm-se um aumento para 500 milhões. Se não for tratada ou controlada a Hepatite B ou a Hepatite C podem levar a um estado avançado de danos no fígado (cirrose) e outras complicações, como insuficiência hepática, culminando em hepatocarcinoma. Devido à seriedade atribuída às Hepatites B e C, a Aliança Mundial das Hepatites, juntamente com a Organização Mundial da Saúde (com início em 2010) promovem anualmente, desde 2004, o Dia Mundial de Combate à Hepatite.

Este evento, atualmente comemorado no dia 28 de julho, proporciona uma oportunidade para concentrar esforços em ações para o fortalecimento da prevenção e controle das hepatites virais assim como de doenças relacionadas, estendendo os programas de vacinação para a hepatite B e integrando estes programas em políticas públicas de imunização. Além disso, o dia facilita a coordenação de uma resposta global contra as hepatites, estendendo o acesso ao tratamento (WORLD..., 2010).

1.2. O vírus da Hepatite C

O vírus da hepatite C pertence ao gênero Hepacivirus da família Flaviviridae, sendo o homem seu único hospedeiro natural. O genoma deste vírus é composto por uma fita simples de RNA positivo, a qual se encontra dentro de um capsídeo icosaédrico, e este por sua vez está envolvido por um envelope composto por uma bicamada lipídica, como mostrado na Figura 1) (CHEVALIEZ, 2007).



Figura 1: Diagrama esquemático do vírus da Hepatite C. (MARQUES, 2009)

O genoma do HCV, composto por 9600 pares de base (pb), possui três regiões distintas: (1) uma curta sequência de região 5' não codificante (5'UTR, do inglês *untranslated region*) envolvida na replicação do RNA viral e na ligação do vírus à célula hospedeira; (2) uma janela de leitura aberta (ORF, do inglês *open reading frame*) composta por 9000 pb; e (3) uma curta região 3' não codificante (3'UTR) envolvida, também, no processo de replicação do RNA viral (CHEVALIEZ, 2007). A região da ORF codifica para a expressão de uma proteína precursora composta por aproximadamente 3000 resíduos de aminoácidos (SUZUKI, 2007). Esta proteína precursora sofre clivagem originando 10 diferentes proteínas, sendo

quatro delas estruturais (Core, E1, E2 e p7) e as demais não estruturais (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B), como mostrado na Figura 2.

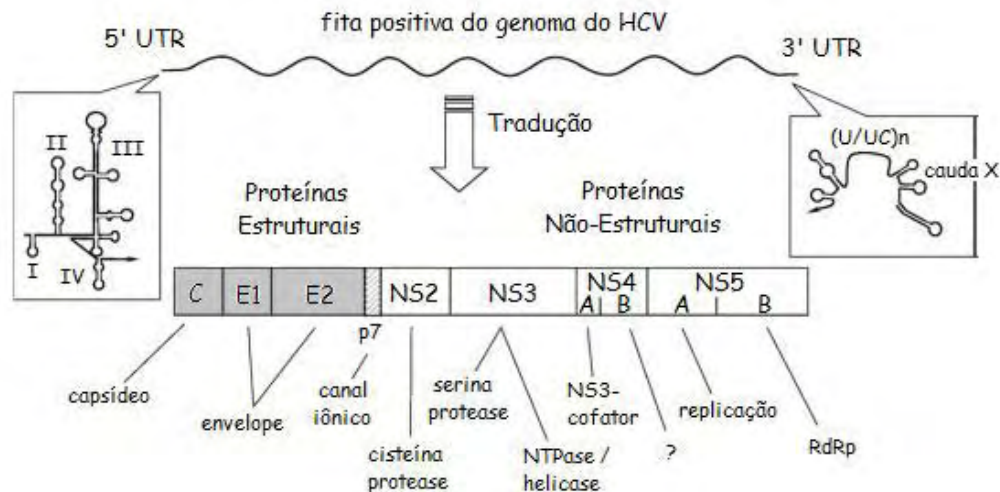


Figura 2: Representação esquemática do genoma do vírus da Hepatite C. (SUZUKI, 2007)

Uma característica importante do genoma do HCV é seu alto grau de variabilidade genética, o que parece estar associado, em parte, à baixa fidelidade da enzima RNA-polimerase RNA-dependente codificada pelo gene 5B (NS5B). Entretanto as taxas de mutação são diferentes para as diversas regiões. As regiões E1 e E2 possuem as maiores taxas de variabilidade, enquanto que as regiões mais altamente conservadas são 5'UTR e 3'UTR (SUZUKI, 2007; TEIXEIRA, 2005). O grau de variabilidade genética relaciona-se com a função desempenhada por cada região genômica. As regiões 5'UTR e 3'UTR desempenham papel de fundamental importância no processo de replicação do RNA viral, sendo, portanto, regiões altamente conservadas entre os diferentes genótipos virais.

Atualmente o HCV, devido a essa alta variabilidade genética, está dividido em 6 genótipos principais (1-6) e mais de 90 subtipos, com uma diversidade nucleotídica de 31-33 % entre os genótipos e de 20-25 % entre os subtipos (LISOWSKI, 2013; NAKANO, 2012; DREXLER, 2009; SUZUKI, 2007).

O ciclo de vida do HCV é pouco conhecido, devido à falta, até o momento, de um sistema eficaz de cultura. Alguns autores supõem por analogia com outros vírus da família Flaviviridae, que primeiramente o virion se liga a receptores específicos da célula hospedeira. Em seguida, o vírus é internalizado, e o nucleocapsídeo liberado no citoplasma. O capsídeo do vírus é removido e o RNA genômico, no citoplasma da célula hospedeira, sofre processo de replicação e tradução para a síntese da poliproteína precursora. A replicação e os processos

pós-traducionais ocorrem no tecido membranoso, composto de proteínas não estruturais e proteínas celulares do hospedeiro denominado “complexo de replicação”, localizado em íntimo contato com a membrana perinuclear. No retículo endoplasmático o genoma viral é encapsulado, os nucleocapsídeos são envelopados e desenvolvidos no Complexo de Golgi. Por fim uma nova produção de virions é liberada por exocitose no espaço pericelular. (CHEVALIEZ, 2007). O ciclo de vida do HCV é apresentado na Figura 3.

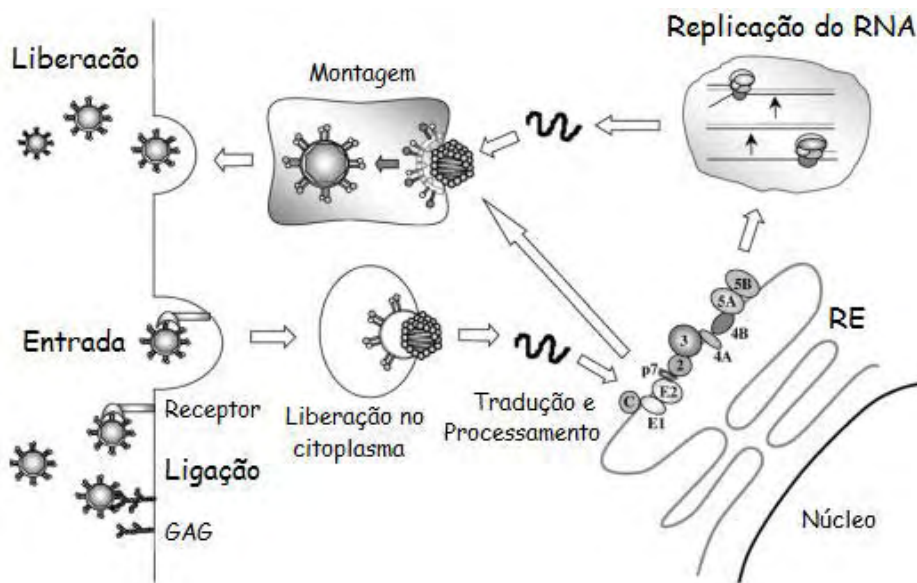


Figura 3: Diagrama esquemático do ciclo de vida do vírus da Hepatite C. (SUZUKI, 2007)

1.3. A Hepatite C e sua prevalência

O vírus da hepatite C (HCV), desde a sua descoberta em 1989, tem sido reconhecido como o principal causador da hepatite crônica, da cirrose hepática e até mesmo do carcinoma hepático (SUZUKI, 2007). Estima-se que a infecção crônica por HCV seja responsável por, aproximadamente, 250 a 350 mil mortes por ano, as quais se encontram relacionadas à cirrose descompensada, doença do fígado em estágio terminal e carcinoma hepático (CHEVALIEZ, 2007).

A transmissão do HCV pode ocorrer pelo compartilhamento de seringas por usuários de drogas injetáveis, em acidentes com instrumentos perfuro cortantes não esterilizados corretamente ou também por meio de alguns procedimentos tais como, transplantes de órgãos, transfusões sanguíneas e hemodiálise (TEIXEIRA, 2005; ULIANA, 2009).

A grande dificuldade existente em relação à hepatite crônica é devida ao fato da ocorrência de pouca ou nenhuma manifestação clínica até o desenvolvimento da cirrose (TEIXEIRA, 2005). Apesar de um pequeno número de pacientes sentirem falta de apetite, fadiga, dores abdominais e alguns sintomas próximos aos da gripe, na maioria dos casos, a fase aguda da infecção é assintomática. A falta de sintomas da hepatite C torna-a uma doença silenciosa, o que dificulta o seu diagnóstico (QURESHI, 2009). Esses fatores aliados à falta de uma vacina disponível tornam a hepatite C um dos mais graves problemas para a saúde pública (TEIXEIRA, 2005).

Atualmente o vírus da hepatite C, incluindo todos os genótipos, afeta cerca de 130 a 170 milhões de pessoas no mundo o que corresponde de 2,2 a 3 % da população. No Brasil estima-se que a prevalência esteja entre 1,0 a 1,9 % da população. A prevalência mundial do HCV é apresentada na Figura 4 (SUZUKI, 2007; TEIXEIRA, 2005; OLIVEIRA, 2012).

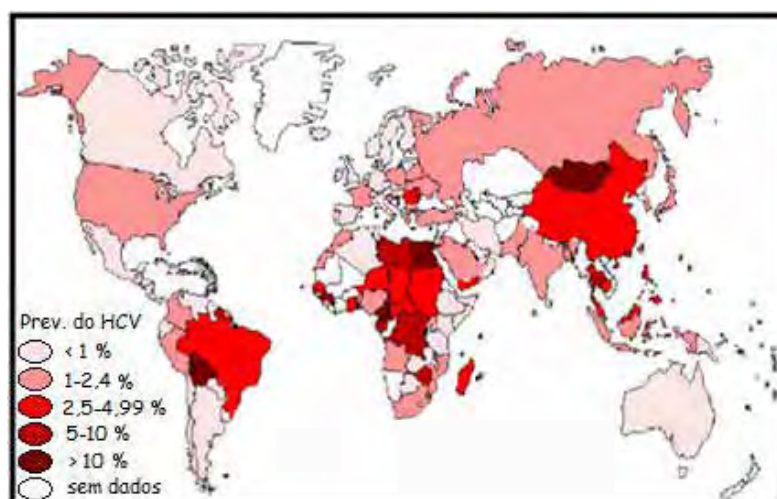


Figura 4: Prevalência mundial do vírus da Hepatite C. (NADEEM, 2010)

Os vários genótipos circulantes apresentam uma significativa variação geográfica da frequência com que são observados. Os genótipos 1, 2 e 3 apresentam distribuição mundial, embora a prevalência relativa destes varie entre as diversas regiões geográficas. O genótipo 4 é encontrado principalmente no Egito e no Zaire, o 5 na África do Sul e o 6 na Ásia. No Brasil, o genótipo mais frequente é o 1, seguido do 3 (RICCARDI, 2008; TEIXEIRA, 2005).

Pacientes que apresentam um quadro de Hepatite C crônica ou aguda são submetidos a um tratamento padrão com injeções semanais de interferon- α peguado (PEG IFN- α) e administração via oral de ribavirina duas vezes ao dia. A terapia baseada na administração combinada de IFN- α e ribavirina produz resultados significativamente mais efetivos do que a

monoterapia baseada somente no IFN. A duração do tratamento, assim como a dosagem dos medicamentos é dependente do genótipo viral pelo qual o paciente se encontra infectado (QURESHI, 2009; CHEVALIEZ, 2007).

Devido à gravidade associada à Hepatite C é de fundamental importância a realização de um diagnóstico precoce, seguido da genotipagem viral.

1.4. O Diagnóstico

O diagnóstico da hepatite C tem sido um desafio, pois devido à falta de sintomas, raramente é realizado durante a fase aguda da doença, e durante a fase crônica, devido à falta de especificidade dos sintomas só é possível realizá-lo após o desenvolvimento de uma doença do fígado em estágio avançado (ULIANA, 2008). Desta forma, metodologias para a identificação da presença do HCV no sangue são de grande importância não somente para o diagnóstico da patologia, mas também na prevenção da transmissão viral, principalmente por meio da transfusão sanguínea. Análises de rastreamento têm se mostrado extremamente eficazes para tal finalidade (GRETCH, 1997).

Os testes existentes para o diagnóstico do HCV incluem ensaios sorológicos (detecção de anticorpos contra o HCV), ensaios combinados que detectam o antígeno e o anticorpo simultaneamente e ensaios moleculares (identificação do material genético viral no soro do paciente).

Os principais testes sorológicos de rastreamento utilizados no diagnóstico da hepatite C são os ensaios imunoenzimáticos (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). Este tipo de análise faz uso de antígenos recombinantes do HCV para a identificação da presença de anticorpos anti-HCV no soro do paciente. Existem quatro gerações do ELISA, as quais vêm sendo desenvolvidas no decorrer dos anos no intuito de aumentar a especificidade do ensaio, diminuir o tempo de soroconversão e da incidência de resultados falso positivos. O aumento da especificidade entre os ensaios das três primeiras gerações é alcançado pelo aumento da quantidade de diferentes antígenos utilizados na identificação de anticorpos anti-HCV. Os ensaios de quarta geração são testes combinados capazes de detectar simultaneamente antígenos e anticorpos (GRETCH, 1997; CHEVALIEZ, 2007).

A baixa especificidade dos testes ELISA determinou o desenvolvimento de testes suplementares para confirmação diagnóstica da infecção pelo HCV em indivíduos com resultados positivos. Um dos testes por immunoblot mais utilizados é comercializado com o nome de RIBA (do inglês, Recombinant Immunoblot Assay). As modificações de

configuração do RIBA foram surgindo concomitantemente com as dos testes ELISA, havendo até o momento três gerações. Tecnicamente, os testes suplementares não são considerados confirmatórios, uma vez que contêm os mesmos antígenos presentes nos testes ELISA. Além disso, um resultado positivo mesmo em um teste suplementar, nem sempre é indicativo de infecção, visto que os pacientes que se recuperam da infecção podem permanecer anti-VHC positivos durante anos. A maior especificidade conferida ao teste RIBA é devida à identificação de anticorpos a antígenos individuais (BRANDÃO, 2001).

Os ensaios sorológicos possuem diversas vantagens, tais como, fácil execução, baixa variabilidade, fácil automação e relativo baixo custo. Embora sejam altamente sensíveis e mesmo com as enumeradas vantagens, estes dependem da janela imunológica, ou seja, do tempo que o organismo necessita para produzir uma quantidade detectável de anticorpos a partir do momento da infecção. Para o HCV este tempo pode variar de 6 a 9 semanas, porém com a utilização dos testes de quarta geração o tempo de janela imunológica diminui para 10-12 dias (FERREIRA, 2001).

Nos ensaios moleculares o diagnóstico da infecção pelo HCV é realizado pela identificação do RNA viral no soro do paciente, o qual se torna detectável entre uma e duas semanas após a infecção. Este tipo de ensaio é o único método capaz de confirmar uma infecção ativa por HCV, sendo, portanto, extremamente útil para o diagnóstico da infecção em sua fase aguda como também para o diagnóstico da infecção em pessoas incapazes de produzir anticorpos como forma de resposta imunológica (ULIANA, 2008; COSTI, 2009; TEIXEIRA, 2005). No ensaio molecular o RNA viral é primeiramente utilizado para síntese do cDNA via reação de transcrição reversa. Em seguida este é amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) e, em seguida, pela utilização de sondas de ácido nucleico (fragmentos de DNA ou RNA com estrutura complementar a uma sequência do ácido nucleico a ser detectado) realiza-se a identificação do agente invasor (BRANDÃO, 2001). Dentro dos ensaios moleculares podemos encontrar três categorias gerais: (1) os testes qualitativos; (2) os testes quantitativos; (3) ensaios de genotipagem viral.

Os testes qualitativos informam somente a presença ou ausência do RNA viral na amostra. Neste, primeiramente realiza-se a síntese do cDNA a partir do RNA viral via reação de transcrição reversa, e em seguida esse cDNA é amplificado via PCR. Nos testes qualitativos o produto amplificado é analisado em gel de agarose. Recentemente, estão disponíveis testes industrializados para detecção qualitativa do RNA do HCV utilizando a

técnica da RT-PCR. Entre eles podemos citar o Amplicor, da Roche Diagnostics e a TMA (do inglês, Transcription-mediated amplification) (TEIXEIRA, 2005).

Os testes quantitativos detectam a quantidade de RNA viral no soro do paciente, sendo, portanto, uma estimativa das taxas de replicação viral ou da eliminação do vírus pelo hospedeiro. Foram desenvolvidas basicamente duas técnicas de biologia molecular para a quantificação do HCV: uma utiliza a tecnologia da PCR e a outra, a do DNA ramificado (branched DNA). Esta última se baseia na amplificação de um sinal, e não do DNA alvo, como ocorre na PCR. O ácido nucleico do agente infeccioso, se presente na amostra, é capturado por sondas, hibridizado com fitas de DNA que possuem inúmeras ramificações e revelado pelo sistema indicador. Esse sistema é composto de oligonucleotídeos complementares conjugados à enzima com atuação sobre um substrato quimiluminescente. Assim, o “sinal de amplificação” é obtido sem amplificação do ácido nucleico do vírus (BRANDÃO, 2001).

Como mencionado anteriormente, o HCV apresenta acentuada variabilidade genética, sendo classificado em 7 tipos genéticos denominados de genótipos. E, as suas distintas variantes genômicas apresentam diferentes respostas à terapia antiviral. Sendo assim, após a realização de diagnóstico via um teste qualitativo, faz-se necessária a genotipagem do vírus infectante. Com esta finalidade foram desenvolvidos os testes para a genotipagem. Nestes amplifica-se apenas as regiões mais conservadas do genoma, como a proteína do envoltório (E1), a proteína core e a proteína não estrutural NS5B. A sequência dos nucleotídeos dentro dessas regiões relativamente conservadas é genótipo-específica, e os isolados podem ser genotipados, independentemente da região que for utilizada para análise. Para uso em laboratórios clínicos foram desenvolvidas basicamente duas metodologias que se valem de técnicas de biologia molecular (genotipagem) ou serológicas (serotipagem) (BRANDÃO, 2001; TEIXEIRA, 2005).

Os métodos que adotam a técnica de biologia molecular para genotipagem incluem a PCR aninhada (nested PCR) (OKAMOTO, 1992), a técnica de RFLP (restriction fragment length polymorphism) (SIMMONDS, 1993), a hibridização reversa (STUYVER, 1993) (INNO-LiPA, Innogenetics, Bélgica; Gen.Eti DEIA HCV, Sorin Biomedica, Itália) e o sequenciamento direto da região 5' não codificante (TruGene, Visible Genetics, Canadá). Suas principais vantagens são a informação direta sobre a sequência dos nucleotídeos do genoma viral, a alta sensibilidade, por se basearem na PCR, e a possibilidade de identificar o subtipo viral (BRANDÃO, 2001).

Os métodos para determinação do genótipo que utilizam serotipagem baseiam-se na detecção de anticorpos genótipo-específicos contra epítopos do HCV (por exemplo, proteínas da região do core) (MACHIDA, 1992). Os testes comercializados utilizam diferentes técnicas, ELISAs competitivos ou immunoblot (Murex-HC1-6, Murex Diagnostics Ltd, Reino Unido; RIBA HCV Serotyping Assay, Chiron Diagnostics, Estados Unidos). As principais vantagens da técnica de serotipagem são o baixo custo e maior facilidade de realização, em comparação com os testes de biologia molecular (BRANDÃO, 2001).

Portanto, os testes moleculares viabilizam o diagnóstico do HCV em indivíduos que ainda não desenvolveram anticorpos vírus-específico, sendo capazes de diagnosticar a infecção em neonatos de mães portadoras do vírus, resolver resultados sorológicos indeterminados, monitorar pacientes beneficiados com o tratamento e identificar o HCV em indivíduos imunossuprimidos (TEIXEIRA, 2005).

2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR E OS GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS

2.1. A reação em cadeia da polimerase (PCR)

A detecção de traços de DNA em amostras clínicas requer sempre uma prévia amplificação por meio da PCR, até a obtenção de níveis de material genético detectável. O processo de PCR é amplamente utilizado como uma ferramenta da biologia molecular para replicar DNA e criar cópias de fragmentos específicos sem a utilização de um organismo vivo (ZHANG, 2006). Esta metodologia foi desenvolvida em 1983 pelo bioquímico Kary Mullis, tendo-lhe sido atribuído o Prêmio Nobel de Química, dez anos depois. O PCR viabiliza a obtenção de quantidades detectáveis de material genético de uma maneira rápida, sensível e versátil.

O PCR utiliza como princípio para a amplificação do DNA a atividade de polimerização da enzima DNA polimerase III encontrada no organismo humano. Esta, porém, para os procedimentos do PCR é substituída pela enzima Taq polimerase devido à alta estabilidade térmica desta última, a qual é atribuída ao organismo do qual é isolada. A bactéria *Thermus aquaticus* habita nascentes termais, proveniente daí a alta estabilidade térmica da DNA polimerase isolada deste organismo.

O PCR é iniciado pela mistura dos reagentes necessários à amplificação. Ao DNA de interesse, que será utilizado como fita molde da enzima, são adicionadas duas sequências iniciadoras, as quais são essenciais para a ligação da enzima DNA polimerase e início da

replicação. Além disso, no procedimento de PCR amplifica-se somente uma determinada sequência do genoma do organismo de interesse, sendo essa sequência delimitada pelos iniciadores. Em seguida, são adicionados os nucleotídeos trifosfatados para a síntese das novas cadeias, a Taq polimerase e íons Mg^{2+} , que atuam como cofator da enzima (Fig. 5).

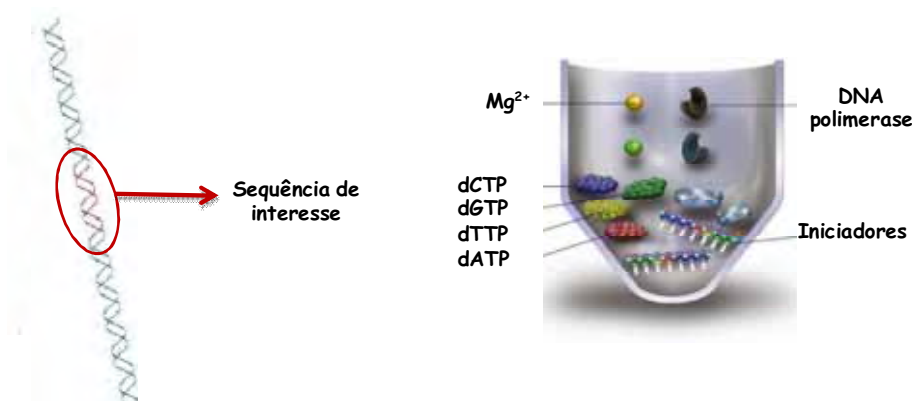


Figura 5: Diagrama esquemático da sequência a ser amplificada. Reagentes a serem utilizados em uma reação de PCR.

Adicionados todos os reagentes, a mistura é, então, submetida a ciclos térmicos. Primeiramente eleva-se a temperatura a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ para promover a separação da dupla fita do DNA, por meio da quebra das ligações de hidrogênio existentes entre as bases nitrogenadas. Então, a temperatura é reduzida entre de $42\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para haja a hibridização das sequências dos iniciadores à fita molde. Em seguida, a temperatura é novamente elevada a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura ótima para atividade da enzima Taq polimerase. Neste momento a enzima realiza síntese das novas fitas. Este procedimento é denominado de ciclo térmico, e é realizado em torno de 32 vezes, sendo que, partindo-se de uma única fita de DNA ao final do 32º ciclo haverá mais de um milhão de cópias da sequência de interesse.

Apesar da capacidade ilimitada de amplificação da PCR, os termocicladores convencionais são equipamentos de tamanho considerável e realizam a amplificação a uma taxa de aquecimento de $1\text{-}2\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$, sendo que o processo completo necessita de 1-2 h. (TELES, 2008; ZHANG, 2006). Desta forma, a técnica de PCR é complexa, requer grandes quantidades de reagentes, mão de obra especializada, além de a amostra estar propensa a contaminações (TELES, 2008; ZHANG, 2009). Uma maior rapidez no processo de PCR depende principalmente de dispositivos capazes de realizar mudanças de temperatura (aquecimento e resfriamento) e de trocar calor entre o dispositivo e a amostra mais rapidamente (KIM, 2006). Sendo assim, os dispositivos microfluídicos vêm surgindo como

uma alternativa para contornar os problemas atuais com os termocicladores convencionais, sempre com o intuito da miniaturização dos dispositivos de diagnóstico. Estes dispositivos serão abordados na seção 3.

2.2. Genossensores

Nos últimos anos muitos avanços tecnológicos importantes têm sido alcançados, os quais fornecem ferramentas necessárias ao desenvolvimento de novas técnicas para o monitoramento dos eventos de biorreconhecimento e interação em suporte sólido e em solução. Juntamente com a capacidade de fabricação com precisão nanométrica sobre suportes sólidos, os biossensores têm surgido como excelentes alternativas para o rastreamento genético e detecção (DRUMMOND, 2003).

Os biossensores são dispositivos analíticos compactos os quais possuem um elemento de reconhecimento biológico, ou biologicamente derivado, intimamente associado a um transdutor físico-químico (TOMBELLI, 2012). Os elementos de reconhecimento biológico empregados no desenvolvimento dos biossensores são enzimas, anticorpos, material genético (DNA ou RNA), células, tecidos, etc. Camadas de reconhecimento biológico formadas por DNA são facilmente sintetizadas, altamente estáveis e reutilizáveis após um simples tratamento térmico, ao contrário das enzimas e anticorpos (TELES, 2008). Os biossensores que empregam material genético como elemento de reconhecimento biológico são denominados de genossensores.

Desde que Watson e Crick propuseram uma estrutura de dupla hélice para o ácido desoxirribonucleico (DNA) em 1953, a identificação e sequenciamento de moléculas de DNA têm sido foco de estudos. A molécula de DNA contém a informação genética e é o material de base da hereditariedade biológica. O conhecimento da sequência dos ácidos nucleicos é uma maneira prática de identificação e de diagnóstico de diversas enfermidades, visto que esta sequência é diferente para cada organismo vivo. O evento de hibridização entre uma sequência específica de DNA e sua fita complementar é a base de todas as metodologias de determinação de DNA (LIU, 2012).

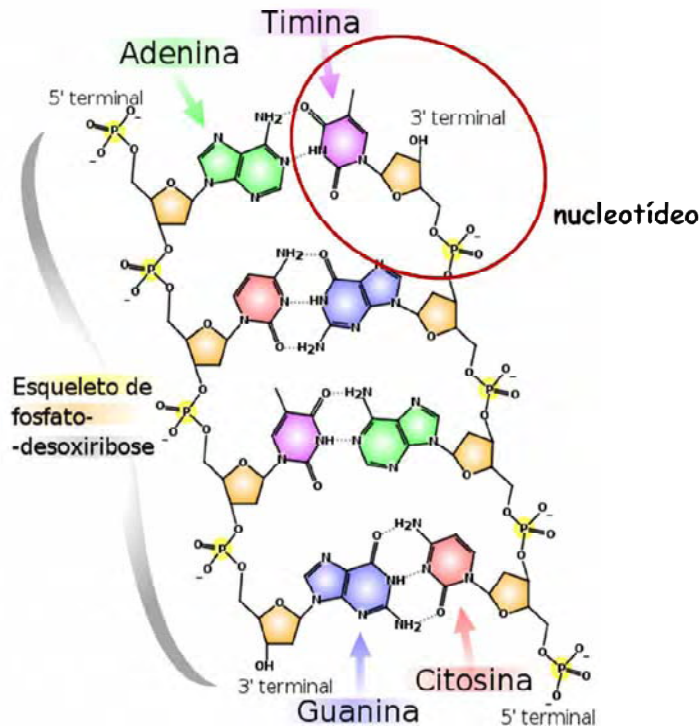


Figura 6: Diagrama esquemático da estrutura em dupla hélice do DNA.

A molécula de DNA é formada por unidades de nucleotídeos ligadas entre si por meio de ligações fosfodiéster. A estrutura do nucleotídeo do DNA é composta por uma molécula de açúcar (desoxirribose), a qual possui ligada a seu carbono de número 5 uma molécula de fosfato e ao carbono de número 1 uma base nitrogenada. Os nucleotídeos são ligados entre si de maneira que a fita de DNA resultante possui sempre duas extremidades distintas. Uma, denominada de 5', possui como terminação um grupamento fosfato ligado ao carbono 5 da molécula de açúcar. E a outra, denominada de 3', possui como terminação um grupo OH ligado ao carbono 3 da molécula de açúcar (NELSON, 1942).

As bases nitrogenadas que compõem a molécula de DNA são a adenina e guanina, denominadas de purinas e a citosina e timina, denominadas de pirimidinas. A estrutura helicoidal do DNA é formada pelo pareamento entre as bases nitrogenadas complementares de forma antiparalela, ou seja, a extremidade 3' pareia com a 5'. Sendo que a base nitrogenada adenina pareia sempre com a timina havendo entre elas a formação de duas ligações de hidrogênio. E a base nitrogenada guanina pareia com a citosina havendo entre elas a formação de três ligações de hidrogênio (NELSON, 1942). A estrutura dupla hélice do DNA é mostrada na Figura 6.

Como exposto anteriormente, a sequência das bases nitrogenadas é característico de cada organismo vivo. O evento biológico de reconhecimento entre as bases nitrogenadas e formação de ligações de hidrogênio é denominado de hibridização das fitas, o qual possui alta especificidade. Sendo assim, por meio do monitoramento do evento de hibridização entre uma fita simples de DNA imobilizada na superfície de um transdutor e sua fita complementar é possível a identificação de organismos, e conseqüentemente realização de diagnósticos.

Através dos esforços de diversos pesquisadores novos testes baseados em DNA têm emergido recentemente. Entre eles o PCR é o mais utilizado, pois a detecção de traços de DNA em amostras clínicas requer, geralmente, uma prévia amplificação até a obtenção de níveis de material genético detectável. Após o procedimento de amplificação o material genético é, então, submetido à etapa de detecção. Os genossensores vêm sendo estudados como uma excelente alternativa para a detecção deste DNA amplificado.

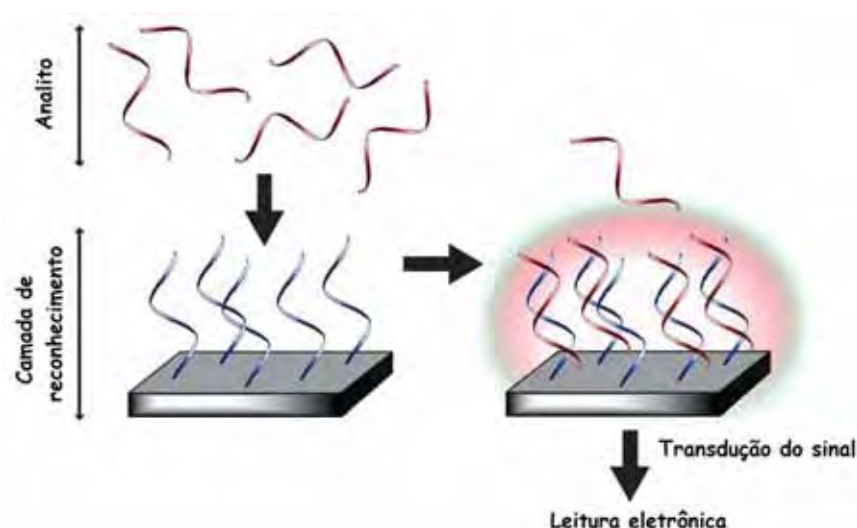


Figura 7: Diagrama esquemático de um genossensor e da detecção de uma sequência alvo (DRUMMOND, 2003).

O transdutor é o componente do biossensor responsável pela conversão do sinal biológico, hibridização entre as sequências de DNA complementares, em um sinal analítico mensurável. Existem diversas formas de promover a transdução do sinal biológico, o qual pode ser realizado por meio de um dispositivo eletroquímico (MILLAN, 1994), ótico (PIUNNO, 1994), gravimétrico (MINUNNI, 2003), baseado na ressonância de superfície plasmônica (SAWATA, 1999) ou elétrico (KELLEY, 1999). A eletroquímica possui propriedades superiores, quando comparada aos demais sistemas citados, pois os biossensores

eletroquímicos possibilitam uma detecção rápida, de maneira simples e a um baixo custo relativo. Neste contexto, os métodos eletroquímicos vêm sendo amplamente estudados, pois os genossensores eletroquímicos permitem uma detecção mais rápida, de maneira simples e a um baixo custo relativo (KERMAN, 2004).

Os genossensores eletroquímicos consistem em uma fita simples de DNA com sequência específica, denominada de sonda de captura, acoplada a uma superfície eletródica. A detecção é, então, realizada por meio da detecção do evento de hibridização entre o oligonucleotídeo imobilizado na superfície do eletrodo e o material genético do organismo alvo presente na amostra, como apresentado na Figura 7. O eletrodo, aqui denominado de transdutor, é o responsável pela conversão do sinal de reconhecimento biológico, ou seja, a hibridização das fitas complementares, em um sinal analítico. O alto desempenho e a especificidade dos genossensores residem no fato de o processo de hibridização entre duas fitas de DNA complementares ser altamente específico, possibilitando a discriminação quando um único par de bases não é complementar (TELES, 2008).

2.3. Estratégias para a construção de um genossensor eletroquímico

Desde que Millan e Mikkelsen, em 1993, introduziram o novo conceito de “biossensor eletroquímico de DNA”, esta área de pesquisa tem recebido intensa atenção de grupos de pesquisa do mundo todo. (KERMAN, 2004).

O planejamento de um genossensor eletroquímico é baseado na dinâmica do evento de hibridização dos ácidos nucleicos. A detecção eletroquímica da hibridização envolve, geralmente, o monitoramento de uma resposta de corrente, com base em um evento de reconhecimento correspondente, sob condições de potencial controlado. Portanto, o preparo dos eletrodos modificados com a sonda de captura e a seletividade destas últimas são de grande importância para o desenvolvimento de um genossensor eletroquímico (LIU, 2012).

2.3.1. A funcionalização do eletrodo de trabalho

A metodologia de funcionalização da superfície do eletrodo é fator determinante da sensibilidade e reprodutibilidade do genossensor. Existem diferentes tipos de eletrodos de trabalho, tais como carbono vítreo, ouro, pasta de carbono e mercúrio. Sendo assim, diversas metodologias vêm sendo desenvolvidas para a imobilização das sondas de DNA às superfícies

sólidas dos genossensores (PAREDES, 2012). Os métodos mais comuns para a imobilização da sonda incluem:

- (1) Monocamadas auto-organizadas de sondas funcionalizadas com um grupamento tiol, para a funcionalização de superfícies de ouro;
- (2) Ligação de uma sonda de DNA biotilada na superfície de um eletrodo modificada com estreptavidina / avidina por meio da interação biotina-avidina/estreptavidina;
- (3) Eletropolimerização (LIU, 2012);
- (4) Nanotubos de carbono (MONOSIK, 2012).

A imobilização de sondas de DNA via síntese de ligantes mercaptoalquil em uma das extremidades da fita simples de DNA (DNA tiolado) baseia-se na alta afinidade dos tióis pelo ouro. O grupamento tiól na extremidade da fita simples de DNA garante uma forte ligação entre o DNA de captura e a superfície do eletrodo, formando, então, monocamadas auto-organizadas. Alguns autores têm utilizado uma mistura da sonda tiolada com 6-mercaptoetanol no intuito de aumentar a eficiência de hibridização, visto que o 6-mercaptoetanol promove um espaçamento entre as sondas de captura imobilizadas na superfície do eletrodo, conferindo-lhes um maior grau de liberdade configuracional (ODENTHAL, 2007; HERNE, 1997; STEEL, 1998).

A avidina e a estreptavidina são proteínas tetraméricas (70 kDa), as quais possuem quatro sítios de ligação idênticos. Estas proteínas possuem uma alta afinidade pela biotina ($K_a = 1 \times 10^{15} \text{ L mol}^{-1}$). Tendo em vista o alto valor da constante de afinidade, a interação entre a avidina/estreptavidina e a biotina é comparável a uma ligação covalente. Desta forma, por meio desta forte afinidade é possível a construção de superfícies modificadas com DNA, através da interação entre a avidina/estreptavidina imobilizada na superfície do eletrodo e uma fita simples de DNA modificada, em uma de suas extremidades, com uma molécula de biotina. A estabilidade natural do complexo avidina/estreptavidina-biotina fornece um sistema de fácil manipulação, mostrando-se, desta forma, como uma excelente alternativa para a imobilização de DNA e, conseqüente, construção de superfícies genossensoras (PIVIDORI, 2000).

Os polímeros condutores também têm sido utilizados como alternativa para a imobilização de biomateriais. A modificação de eletrodos com filmes poliméricos promove a formação de grupos funcionais com alta concentração na superfície do eletrodo, e ao mesmo tempo o aumento da estabilidade dos grupos funcionais imobilizados e seletividade das reações. A imobilização de material genético em superfícies contendo materiais poliméricos

condutores tem sido realizada devido às propriedades de flexibilidade mecânica, elevada área superficial e fácil processamento (WEI, 2009).

Os nanotubos de carbono também vêm sendo amplamente estudados para a construção de biossensores de DNA, pois permitem a imobilização da sonda de captura assim como, a amplificação do sinal de reconhecimento biológico, a hibridização. A amplificação do sinal proveniente da hibridização implica que o biossensor desenvolvido necessitará de uma menor quantidade de amostra para promover a detecção (MONOSIK, 2012). Além disso, a sonda de captura pode ser imobilizada em superfícies eletródicas modificadas com nanotubos de carbono via interação avidina/estreptavidina-biotina.

2.3.2. Escolha da sonda de captura

A interação entre a sonda de captura e sua sequência complementar exerce grande influência no desempenho dos genossensores eletroquímicos. No intuito de promover uma melhoria significativa na especificidade da hibridização entre a sonda DNA e sua sequência complementar, o planejamento da sonda a ser utilizada é fator fundamental na fabricação de um biossensor de DNA.

Existem diversas sondas de DNA desenvolvidas visando a construção de genossensores, tais como, cDNA simples fita, DNA com estrutura em *hairpin*, ácido nucleico peptídico (PNA, do inglês *peptide nucleic acid*) e o ácido nucleico bloqueado (LNA, do inglês *locked nucleic acid*) também conhecido como RNA de difícil acesso. As diferentes sondas de DNA, quando imobilizadas afetam a eficiência do evento de hibridização, o qual possui papel primordial na sensibilidade e especificidade do biossensor eletroquímico (LIU, 2012).

Os diversos tipos de sondas desenvolvidas são capazes de melhorar a sensibilidade do genossensor devido às diferenças em suas estruturas. A sonda de DNA com estrutura em *hairpin* possui algumas características especiais, tais como, capacidade de distinguir uma única base não complementar e a capacidade de detecção da sequência alvo sem a separação das partes hibridizada e não hibridizada da sonda.

A utilização de sondas de ácido nucleico peptídico promove o aumento da seletividade dos biossensores. Este tipo de sonda possui um esqueleto pseudopeptídico não carregado ao invés do esqueleto carregado negativamente formado por moléculas de açúcar e fosfato do DNA natural. Devido ao seu esqueleto neutro, as sondas de PNA oferecem maior afinidade na sua hibridização com a sequência de DNA complementar, fato que melhora a distinção entre

sequências com alto grau de similaridade (incluindo a detecção de imperfeições de uma única base).

As sondas de LNA têm sido desenvolvidas como uma estratégia específica e simples para a imobilização de DNA, sendo capazes de fornecer um bom reconhecimento de alguns genes de fusão em CML e APL. Especificamente as sondas de LNA possuem vantagens, tais como, baixa toxicidade, redução da flexibilidade conformacional da ribose, resistência à ação das nucleases, aumento da organização localizada da cadeia de fosfato. Tem sido verificado, experimentalmente, que as bases de LNA podem aumentar a afinidade de hibridização entre a sonda de captura e a sequência alvo, o que sugere um reconhecimento potencialmente melhor de sequências que difiram em somente uma base da sequência alvo (LIU, 2012)

2.3.2. Métodos de detecção eletroquímica

A detecção eletroquímica da hibridização de DNA e RNA pode ser realizada, basicamente, de quatro maneiras distintas:

(1) monitoramento do aumento / decréscimo da corrente de pico de oxidação / redução de uma molécula eletroquimicamente ativa capaz de se ligar ao DNA na forma de simples fita ou dupla fita;

(2) monitoramento do aumento / decréscimo da corrente de pico de oxidação / redução das bases nitrogenadas eletroativas presentes no DNA, tais como a guanina e a adenina;

(3) monitoramento do sinal eletroquímico de um substrato, após a hibridização com uma sonda repórter marcada com uma enzima;

(4) monitoramento do sinal eletroquímico de nanopartículas metálicas ligadas à sonda de captura após a sua hibridização com a sequência alvo (KERMAN, 2004).

Os métodos que utilizam marcadores são significativamente mais populares do que aqueles que não os utilizam, pois existem muito mais maneiras nas quais a transdução pode ser planejada com alta sensibilidade e seletividade. A utilização de mediadores eletroquímicos é uma maneira, amplamente empregada, de promover a oxidação indireta do DNA.

Os métodos indiretos requerem que as moléculas mediadoras sejam capazes de sofrer um processo de transferência eletrônica reversível na superfície do eletrodo. Portanto, os indicadores da hibridização são moléculas pequenas e eletroativas capazes de se intercalar na fita de DNA ou se ligar aos sulcos da molécula de DNA. Geralmente, essas moléculas indicadoras possuem maior afinidade pelo DNA de fita dupla, porém podem também ser

moléculas que se ligam preferencialmente ao DNA simples fita. Sendo assim, a concentração da molécula indicadora na superfície do eletrodo varia quando a hibridização ocorre, resultando em uma variação do sinal eletroquímico. Além de viabilizar a diferenciação entre o DNA dupla fita e de fita simples, a molécula indicadora deve possuir uma resposta voltamétrica bem definida e a um baixo potencial. As moléculas indicadoras mais comuns são o azul de metileno e alguns corantes orgânicos, assim como a antraquinona, daunomicina, etc (ODENTHAL, 2007; LIU, 2012).

Os ensaios eletroquímicos com DNA que utilizam enzimas como amplificadores de sinal foram desenvolvidos por comparação com os imunoenaios enzimáticos. Estas são capazes de amplificar o sinal analítico, promovendo, desta forma, alta sensibilidade. Geralmente, o sinal analítico é baseado em um processo redox do produto de uma reação enzimática. As enzimas podem ser ligadas diretamente a uma fita de DNA ou via interação estreptavidina/avidina-biotina entre outras. A utilização de enzimas como moléculas marcadoras em ensaios de afinidade é devido à sua capacidade de transformar o evento de hibridização em uma ampla faixa de moléculas detectáveis. As enzimas mais comumente utilizadas são a fosfatase alcalina, peroxidase de raiz forte e a glicose oxidase. Todas essas enzimas possuem uma alta estabilidade relativa, baixo custo e alta velocidade de conversão (PAREDES, 2012).

A nanotecnologia têm se mostrado um campo interdisciplinar emergente desde o final da década de 80. Os nanomateriais possuem uma superfície particular com tamanho reduzido e propriedades macroscópicas de tunelamento quântico, o que fornece a estes materiais características mecânicas, elétricas, magnéticas, óticas e térmicas especiais, além da atividade química. Os nanomateriais tornaram-se uma ferramenta atraente para aplicação na detecção eletroquímica, pois possuem propriedades únicas que são de grande valia para a área de biossensores eletroquímicos de DNA (LIU, 2012).

A detecção eletroquímica direta do DNA envolve a medida de uma variação físico-química ocorrendo na superfície do transdutor devido à hibridização do DNA (LIU, 2012). O monitoramento do sinal de oxidação da base nitrogenada guanina, é de longe, o método sem marcação mais popular de detecção do evento biológico de hibridização. Isso ocorre devido a sua simplicidade, versatilidade, podendo ser utilizado também no estudo de pequenas moléculas capazes de se ligarem ao DNA. A guanina é a base nitrogenada mais facilmente oxidável, com um pico de oxidação sendo observado em potencial ao redor de 1,0 V (vs. Ag/AgCl) na maioria dos materiais eletródicos (potenciais mais anódicos são observados em nanotubos de carbono do tipo bambu) (ODENTHAL, 2007; POURNAGHI-

AZAR, 2009). Sua oxidação é reportada como sendo uma reação irreversível envolvendo quatro elétrons (Figura 8). Desta forma, a detecção da hibridização é possível devido ao fato da disposição das bases influenciar no sinal eletroanalítico. Assim, o DNA nativo (dsDNA), o desnaturado (ssDNA) e o degradado apresentam, cada um, um comportamento característico (WANG, 2000; MARQUES, 2009).

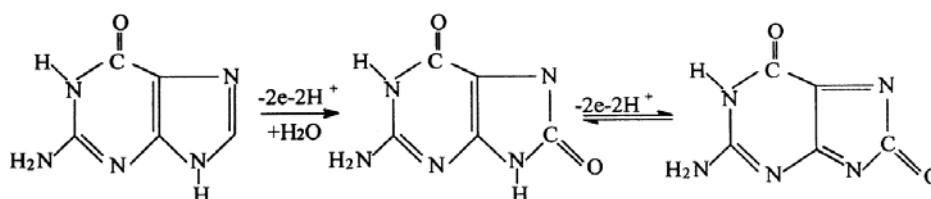


Figura 8: Reação de oxidação da base nitrogenada guanina sobre a superfície de carbono (WANG, 2000).

Segundo trabalhos descritos na literatura, o monitoramento baseado no sinal de oxidação da guanina, presente na sonda e no DNA alvo, na superfície de eletrodos de carbono é a estratégia mais simples, rápida e aplicável (WANG, 2000; MARQUES, 2009; POURNAGHI-AZAR, 2009).

Atualmente os eletrodos impressos têm sido desenvolvidos como uma ferramenta adequada para a execução de análises eletroquímicas devido às suas propriedades únicas, tais como, tamanho reduzido, baixo limite de detecção, resposta rápida e alta reprodutibilidade. Além disso, a tecnologia dos eletrodos impressos é uma técnica bem estabelecida para a fabricação de biossensores.

As tintas de carbono, ouro, platina e prata são as mais empregadas na fabricação de eletrodos impressos. No entanto outros materiais podem ser facilmente utilizados. As tintas de carbono e ouro são amplamente utilizadas como material eletródico para o desenvolvimento de sensores descartáveis.

A tinta de carbono é especialmente utilizada devido à sua química superficial, baixa corrente de fundo, ampla janela de potencial, baixo custo e passividade química. No entanto, a velocidade de transferência eletrônica nos eletrodos a base de tinta de carbono é baixa quando comparada àquela obtida com eletrodos metálicos. Entretanto, esta desvantagem pode ser superada por meio da modificação da superfície com nanoestruturas, tais como nanotubos de carbono ou nanopartículas de ouro. Estes melhoram a transferência eletrônica na superfície do eletrodo e, conseqüentemente, as características analíticas oferecidas pelo sensor (PAREDES, 2012).

Portanto, o desenvolvimento de genossensores utilizando como transdutor eletrodos impressos de carbono possibilita a combinação da alta seletividade do evento de hibridização com a compatibilidade de microfabricação (LUO, 2009).

3. DISPOSITIVOS DE DIAGNÓSTICO

Existe, atualmente, uma intensa busca por dispositivos analíticos miniaturizados e com a capacidade de fornecer um diagnóstico confiável, rápido e, principalmente de uma maneira simples e de baixo custo (TELES, 2008). O diagnóstico de ácidos nucleicos possui diversas aplicações, tais como, testes de paternidade, pesquisa genética, análise forense, determinação de sexo e ancestrais, diagnóstico de doenças etc. Os métodos convencionais de análise de seqüências de genes específicos estão baseados no sequenciamento direto ou na hibridização do DNA (MONOSIK, 2012).

Os genossensores são dispositivos capazes de detectar a presença de genes mutantes ou associados a doenças hereditárias, podendo também ser utilizados na obtenção de diagnósticos de agentes infecciosos. A partir de seu rápido progresso no passado, acredita-se que o maior impacto da detecção eletroquímica da hibridização do DNA pode estar no futuro. As pesquisas na área dos biossensores eletroquímicos de DNA levarão, futuramente, ao desenvolvimento de estratégias analíticas de detecção que resultarão em dispositivos de diagnóstico miniaturizados e fáceis de usar. Os biossensores eletroquímicos de DNA irão, sem dúvida, acelerar a produção destes dispositivos genéticos em larga escala (LIU, 2012).

Atualmente, essa nova instrumentação analítica já vem sendo estudada, sendo denominada de *lab-on-a-chip* (ou μ TAS, do inglês *micro Total Analysis Systems*), que consiste em dispositivos miniaturizados que integram o processo analítico completo, e muitas vezes capazes de extrair informações valiosas diretamente de amostras de sangue ou de soro de pacientes (IBANEZ-GARCIA, 2006; TELES, 2008; WU, 2010). Tais dispositivos tornam disponíveis diagnósticos em regiões remotas, onde não há acessibilidade a laboratórios bem equipados (LUO, 2009).

Os dispositivos μ TAS aplicados ao diagnóstico molecular, geralmente, são baseados em estruturas microfluídicas compostas por três importantes regiões: separação, amplificação e detecção (IBANEZ-GARCIA, 2006).

A microfluídica vem sendo empregada nos dispositivos de detecção de DNA devido à necessidade de amplificação do material genético como etapa prévia da detecção. O desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para os processos de PCR teve início nos

anos 90, quando os conceitos de sistema de μ TAS e *lab-on-a-chip* foram propostos para a construção de dispositivos para análises químicas e biológicas (ZHANG, 2009). Os dispositivos microfluídicos produzidos pela tecnologia dos sistemas micro-eleto-mecânico (MEMS, do inglês micro-electro-mechanical-systems) têm representado uma central de tecnologia para muitos sistemas miniaturizados usados em aplicações químicas, biológicas e médicas, cujo avanço promete revolucionar os processos de detecção de patógenos e poluentes ambientais. Sendo assim, os instrumentos de PCR miniaturizados vêm se tornando uma ferramenta de grande importância (ZHANG, 2006).

Desta forma, a utilização da tecnologia microfluídica para PCR tem facilitado a amplificação de DNA, pois promove mais rápida mistura por difusão e transferência de calor, devido à pequena dimensão e à grande razão área/volume (ZHANG, 2009). Além disso, também são utilizados volumes significativamente menores e o tempo de cada ciclo também é menor, diminuindo, desta forma o custo do processo. Sendo que, a mais atraente de suas vantagens é que o dispositivo de PCR miniaturizado é portátil, podendo ser usado na realização de análise de campo (ZHANG, 2006; KOOP, 1998; ZHANG, 2009; KIM, 2006; WANG, 2009; SHEN, 2005).

Os biossensores eletroquímicos de DNA têm sido muito estudados para a sua aplicação como detectores nesses microdispositivos, pois possibilitam a utilização de pequenas quantidades de amostra, mínima manipulação de equipamentos, além da simples instrumentação (WU, 2010).

3.1. Dispositivos de análise rápida, genossensores e diagnóstico do HCV

Atualmente observa-se um rápido desenvolvimento de dispositivos sensores utilizando DNA como material de biorreconhecimento para a detecção da hibridização. Estes dispositivos são considerados como ferramentas importantes devido a sua ampla aplicação, abrangendo desde testes clínicos descentralizados até o monitoramento ambiental, detecção de micro-organismos infecciosos e investigações forenses. Dentre os métodos de detecção existentes, os eletroquímicos têm se destacado devido à simplicidade do procedimento, rápida resposta, baixo custo relativo e compatibilidade com a tecnologia de microfabricação. Portanto, os genossensores eletroquímicos combinam a alta seletividade do evento de hibridização com a sensibilidade, e a realização de testes clínicos descentralizados (HEJAZI, 2010).

Existe, atualmente, uma intensa busca por dispositivos sensores capazes de identificar o vírus da Hepatite C em pacientes de maneira mais rápida, evitando, assim, maiores complicações para a saúde do paciente e também para que este não contamine outros por ignorar a doença da qual é portador. Os biossensores, atualmente em estudo, utilizam os mais diversos elementos de reconhecimento biológico imobilizado no dispositivo transdutor, assim como diferentes estratégias para a detecção do vírus. Na Tabela 1 são listados os trabalhos relatados na literatura envolvendo a detecção do HCV com a utilização de células, anticorpos e lectinas como elemento de biorreconhecimento.

Tabela 1: Biossensores relatados na literatura, que utilizam como material de reconhecimento biológico células, anticorpos e lectina para promover o diagnóstico do HCV.

Material de reconhecimento biológico	Transdutor / detecção	Amostra clínica	referência
Células do fígado	Células imobilizadas em tubo condutor / detecção potenciométrica	S*	KINTZIOS, 2001; KINTZIOS, 2001
Anticorpo	Arranjo com Nanopartículas de ouro / detecção potenciométrica	N	TANG, 2010
Anticorpo	Detecção tipo Elisa / fluorescência via HRP	N	WANG, 2005
Anticorpo	ITO modificado com fibra ótica / detecção de quimioluminescência	S	KONRY, 2005
Anticorpo	GCE/AuNP / detecção eletroquímica – DPV	S	MA, 2012
Anticorpo	Detecção piezométrica	N	TIMURDOGAN, 2011
Anticorpo	Detecção potenciométrica via atividade da enzima α -L-fucosidase	S	OTHMAN, 2011
Lectina	Interação lectina – anticorpo anti-HCV / detecção por SPR	N	LOZACH, 2003

*S – sim; N-não

A escolha do elemento de biorreconhecimento depende de alguns fatores, tais como, especificidade, sensibilidade, condições para estocagem e estabilidade operacional e ao ambiente. Sendo importante, também, nesta seleção a consideração da molécula alvo (WIRTH, 2010). Embora a utilização de células, anticorpos e lectinas como material de reconhecimento biológico possibilite a detecção do HCV e, conseqüentemente, o diagnóstico, a realização da genotipagem não é viabilizada.

Tendo em vista a realização do diagnóstico do HCV, sabe-se que para a escolha de um tratamento adequado, além da detecção do vírus, a identificação de seu genótipo é de fundamental importância. Embora os sensores construídos utilizando-se como material de biorreconhecimento células, anticorpos e lectinas realizem a detecção do HCV com alta eficiência, estes são incapazes de promover a genotipagem viral. Além disso, esses biossensores, assim como os testes sorológicos de diagnóstico, dependem da janela imunológica, no caso da utilização de anticorpos, e de uma quantidade de partículas virais detectáveis circulantes, para os sensores que utilizam células e lectinas. O emprego de material genético, RNA e DNA, como elemento de biorreconhecimento elimina o tempo de replicação viral e produção de anticorpos, viabilizando, desta forma, um diagnóstico precoce. Além disso, a identificação do material genético viral torna possível a genotipagem, levando, assim, à escolha do tratamento mais adequado a ser administrado em um tempo reduzido.

Os trabalhos relatados na literatura envolvendo o estudo de biossensores, que empregam material genético como elemento de biorreconhecimento, são mais numerosos que aqueles anteriormente citados, como apresentado na Tabela 2. Observa-se que, embora seja possível a utilização de RNA, o DNA é mais comumente utilizado. Esta última opção torna-se mais vantajosa quando se considera a estabilidade de ambas as biomoléculas, pois a molécula de RNA está muito mais propensa à degradação do que a molécula de DNA. Sendo assim, genossensores construídos utilizando DNA como elemento de biorreconhecimento terão uma vida útil mais longa, podendo permanecer por um período mais longo em estoque.

Nota-se também, pela observação da tabela apresentada que, existe uma maior prevalência de genossensores estudados para o diagnóstico de HCV utilizando os métodos eletroquímicos na transdução do sinal de biorreconhecimento. Os métodos eletroquímicos, além de possuírem um baixo custo relativo e serem de fácil manuseio, são muito promissores quando se trata de miniaturização do sistema de análise. Apesar das suas inúmeras vantagens, os dispositivos desenvolvidos para o diagnóstico molecular do HCV relatados na literatura têm também utilizado, para a detecção, métodos envolvendo compostos coloridos e fluorescentes (SHEN, 2011; WANG, 2009; SOCHOL, 2011).

Tabela 2: Biossensores relatados na literatura, que utilizam como material de reconhecimento biológico DNA, PNA e RNA para promover o diagnóstico do HCV

Material de reconhecimento biológico	Transdutor / detecção	PCR	Amostra clínica	genotipagem	Referência
RNA	Interação RNA – proteína viral / Utilização de quantum-dots / detecção por emissão de fluorescência	N*	N	N	ROH, 2010a; ROH, 2010b; ROH, 2011; ROH, 2012
RNA	Interação RNA – proteína viral / detecção por SPR	S*	N	N	LEE, 2007
DNA	Arranjo de microeletrodos / detecção com marcador fluorescente	S	S	S	BIDAN, 1999
DNA	GCE / detecção por eletrocatalise / utilização de sonda modificada com AuNP	S	S	N	LI, 2012
DNA	Eletrodo de ouro / sonda modificada com tionina / detecção por meio DPV e SWV utilizando BamH1	N	N	N	LIU, 2009
DNA	GCE / sonda modificada com tionina e HRP em capsuladas em nanoesferas de ouro / detecção por meio DPV utilizando BamH1	N	N	N	TANG, 2011
DNA sonda de PNA	Eletrodo de ouro / detecção via intercalante (azul de metileno)	N	N	N	AHOUR, 2012
DNA	Eletrodo de grafite de lapiseira / detecção via oxidação direta da base nitrogenada guanina	N	N	N	POURNAGHI-AZAR, 2009
DNA	Utilização de quantum-dots / detecção por emissão de fluorescência	N	N	N	GIRAUD, 2010
DNA	CD-trodo / detecção eletroquímica via HRP	S	S	N	ULIANA, 2011
DNA	Separação de gel SDS / detecção colorimétrica via atividade enzimática	S	S	N	GLYNOU, 2003
DNA	Microscopia de varredura eletroquímica	S	S	S	RICCARDI, 2008
DNA	Eletrodo de ouro / detecção piezométrica	S	S	S	SKLADAL, 2004
DNA	Eletrodo de grafite / detecção eletroquímica via HRP	S	S	S	RICCARDI, 2006
DNA	Detecção por SPR	S	S	N	O'MEARA, 1998
DNA sonda de PNA	FET / utilização de nanotubos de carbono	N	N	N	DASTAGIR, 2007
DNA	Eletrodo de platina / detecção piezométrica	N	N	N	BIDAN, 2000
DNA	Superfície de ouro / detecção por SPR	N	N	S	ZYBIN, 2005
DNA	Eletrodo de ouro / detecção de RNA viral por espectroscopia de impedância eletroquímica	N	N	N	PARK, 2010
DNA sonda de PNA	Eletrodo de ouro / detecção eletroquímica (DPV) via intercalante (azul de metileno)	N	N	N	POURNAGHI-AZAR, 2010; HEJAZI, 2010

Muitos esforços têm sido empregados no sentido de se desenvolver genossensores capazes de detectar quantidades cada vez menores de material genético viral e que sejam, ao mesmo tempo, passíveis de miniaturização, para compor os dispositivos de análise rápida como compartimento de detecção. E um enorme progresso tem sido alcançado no desenvolvimento de genossensores eletroquímicos, porém existem ainda muitas dificuldades a serem superadas até que os biossensores de DNA se tornem portáteis e amplamente comercializados. O primeiro desafio relaciona-se ao fato de que os biossensores de DNA necessitam de um preparo, pois a amostra a ser analisada não está prontamente disponível. Sendo assim, muito trabalho precisa, ainda, ser feito para o desenvolvimento de métodos miniaturizados de preparo e amplificação da amostra (ODENTHAL, 2007).

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de um genossensor para a realização do diagnóstico da Hepatite C. E, conjuntamente, o estudo da viabilidade de utilização deste genossensor como componente de detecção de um futuro dispositivo para análise *in situ*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construção e caracterização de um eletrodo de carbono impresso com vistas à sua aplicação como transdutor do genossensor a ser desenvolvido.

2. Desenvolvimento do genossensor para realização da detecção do vírus da Hepatite C. Estudo de seletividade do sensor construído. Avaliação da viabilidade de realização do procedimento de genotipagem empregando o sensor estudado.

3. Estudo da viabilidade de miniaturização do genossensor desenvolvido e caracterização de seu funcionamento como célula de detecção de um futuro dispositivo para análise *in situ*.

CAPÍTULO II: ELETRODO DE CARBONO IMPRESSO

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1.1. Materiais e Métodos

1.1.1. Construção dos eletrodos de carbono impresso

O eletrodo de trabalho foi construído utilizando-se um substrato de alumina sobre o qual foi colada uma máscara. Esta foi feita cortando-se um retângulo de 3 cm de comprimento e 1 mm de largura em papel contact, como mostrado na etapa 1 da Figura 9. Então, o contato elétrico foi construído depositando-se a tinta de prata (E 1660 - ERCON) sobre a máscara. Após o depósito, a máscara foi retirada e o eletrodo levado à estufa para processo de cura a 120 °C por 30 minutos (etapa 2). Então, outra máscara foi feita cortando-se um círculo com 3 mm de diâmetro no papel contact, utilizando um cortador de couro 9'' (LEE Tools). Esta máscara foi colada sobre o substrato de alumina (etapa 3), de modo que o círculo ficasse na extremidade inferior do contato de prata depositado anteriormente. Tinta de grafite (G 449 I - ERCON) foi depositada para a confecção da área do eletrodo de trabalho e em seguida também foi curada em estufa a 120 °C por 30 minutos (etapa 4). Em seguida, uma fita de galvanoplastia contendo um corte circular de 3 mm de diâmetro foi utilizada para isolar o contato de prata da solução (etapa 5), de modo que a resposta voltamétrica obtida fosse somente referente à superfície de grafite.

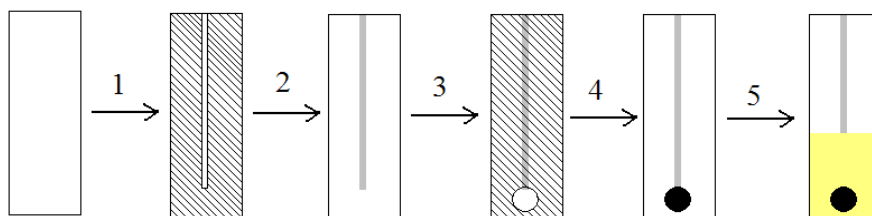


Figura 9: Esquema da construção do eletrodo de carbono impresso.

1.1.2. Ativação dos eletrodos de carbono impresso

Após a construção dos eletrodos impressos, foi realizada a ativação da tinta de carbono para promover a melhora dos processos de transferência eletrônica na superfície. Para a ativação foram testadas duas metodologias: (1) Polimento com suspensão de alumina 0,05 μm (Arotec); (2) Aplicação de uma diferença de potencial anódica (1,5 V) em diferentes meios: solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ com pH 7,0, H₂SO₄ (J. T. Baker) 1,0 mol L⁻¹, NaHCO₃ (Synth) 1,0 mol L⁻¹ e Na₂CO₃ (Sigma-Aldrich) saturada. O tempo de aplicação do potencial foi otimizado, após a definição do meio.

1.2. Instrumentação

1.2.1. Análise Voltamétrica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula convencional de três eletrodos utilizando um sistema potenciostato/galvanostato μ Autolab tipo III interfaciado a um computador. O eletrodo de referência empregado foi um eletrodo de calomelano saturado (ECS) e como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina. Como eletrodo de trabalho foi utilizado o eletrodo de carbono impresso construído, com área geométrica de 0,071 cm².

Os processos de transferência de carga foram avaliados por meio de medidas de voltametria cíclica em janela de potencial de -0,9 a 1,0 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

1.2.2. Análise Impedimétrica

A caracterização dos processos de transferência eletrônica na superfície do eletrodo de carbono impresso foi realizada também por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica. Para tanto utilizou-se um potenciostato do Biologic, modelo VSP, interfaciado a um computador e controlado pelo programa EC-Lab versão 10.30.

A caracterização foi realizada no intervalo de frequência de 100 kHz a 10 mHz, com amplitude de 10 mV e registrando-se 8 pontos por década. A medida foi realizada em potencial de circuito aberto e em meio de solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH = 7,0.

1.2.3. Microscopia de varredura de alta resolução (FEG-MEV)

A caracterização da superfície dos eletrodos impressos de carbono construídos foi realizada utilizando um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, equipado com fonte de elétrons de emissão de campo, JEOL JSM 7500F.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Caracterização e otimização dos processos de transferência eletrônica

O eletrodo de carbono impresso construído foi, primeiramente, avaliado quanto à sua janela eletroquímica. Observou-se um intervalo de potencial de trabalho entre -1,8 e +1,5 V vs. ECS, valores de potencial onde ocorrem, respectivamente, a redução e a oxidação da água.

De acordo com Cui e colaboradores, os eletrodos de carbono impresso fabricados com tinta de carbono tem suas propriedades eletroquímicas afetadas pela composição da tinta e também pelos processos de cura. Sendo a transferência eletrônica determinada pela fração de área de grafite ativa na superfície do eletrodo, os eletrodos confeccionados com essa tinta necessitam, portanto, de um tratamento superficial para melhorar as suas propriedades eletroquímicas (CUI, 2001; GORNALL, 2009).

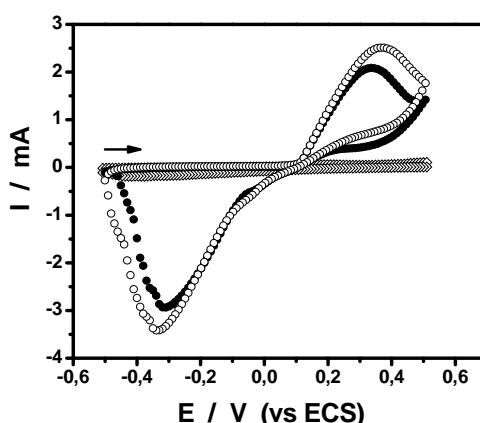


Figura 10 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em (◇) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0 e em solução $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ utilizando solução tampão fosfato como eletrólito suporte (●) antes e (○) após o polimento com pasta de alumina $0,05 \text{ } \mu\text{m}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Desta forma, foram avaliadas duas metodologias na tentativa de melhorar o desempenho eletroquímico dos eletrodos impressos de carbono construídos. Primeiramente, realizou-se o polimento da superfície do eletrodo utilizando uma suspensão de alumina. Este polimento foi aplicado com o objetivo de promover uma maior exposição das partículas de carbono por meio do desgaste do material polimérico presente na tinta. Voltamogramas cíclicos, em solução $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, foram registrados antes e após o polimento para a avaliação dos processos de transferência de carga. Verificou-se, como apresentado na Figura 10, que o polimento aumentou a intensidade de corrente dos picos de

oxidação e redução, não promovendo, entretanto, nenhuma melhora nos processos de transferência eletrônica, fato que pôde ser observado pelo aumento da diferença de potencial de pico (ΔE_p) de 650 mV para 700 mV. Portanto, avaliou-se a aplicação de um tratamento eletroquímico na superfície do eletrodo de carbono no intuito de promover uma melhoria dos processos de transferência eletrônica.

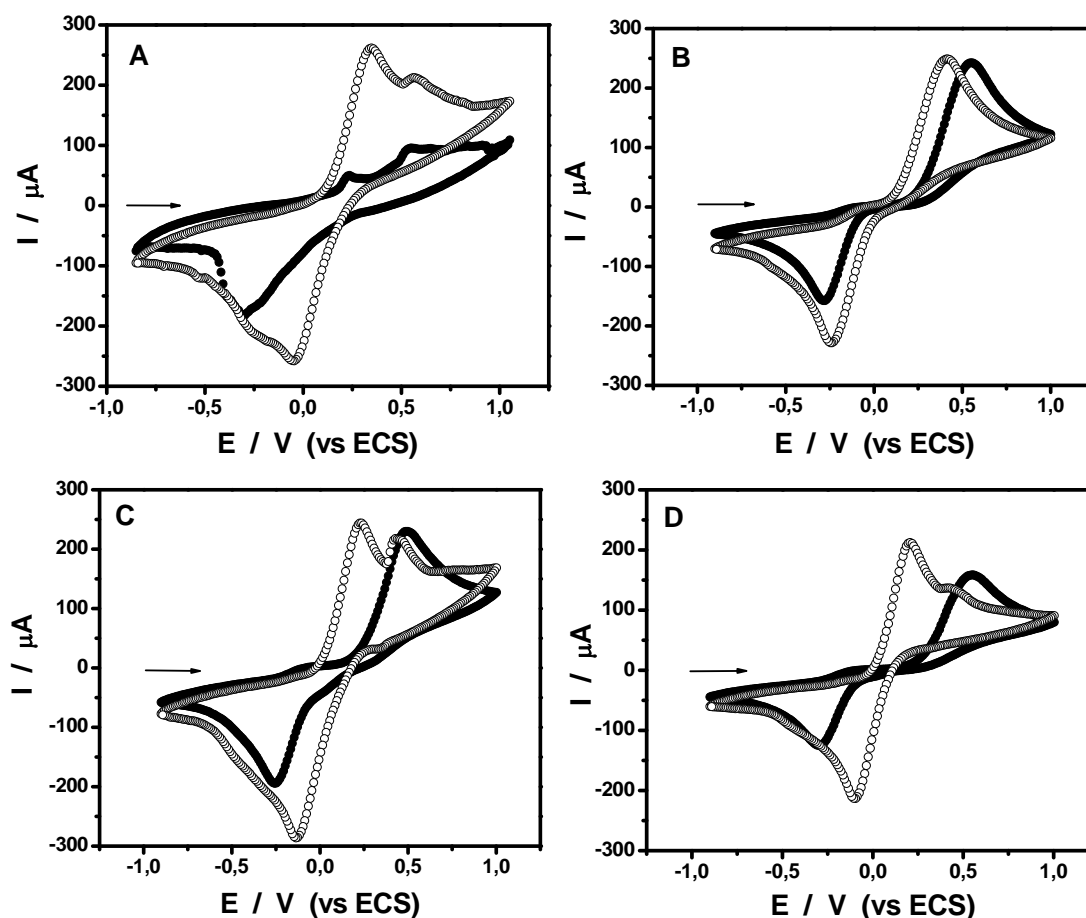


Figura 11 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona registrados (\bullet) antes e (\circ) após a anodização realizada em (A) solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 7,0, (B) solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de H_2SO_4 , (C) solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaHCO_3 e (D) solução saturada de Na_2CO_3 . O eletrólito suporte utilizado foi solução tampão fosfato. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A pré anodização tem sido estudada por alguns autores como uma alternativa viável para melhorar as funcionalidades superficiais de eletrodos confeccionados à base de tinta de carbono. Segundo Cui e Gornall, tal metodologia mostrou-se eficaz na melhoria da transferência eletrônica em superfícies de carbono. (CUI, 2001; GORNALL, 2009). Desta forma, avaliou-se o efeito de uma rápida pré anodização nos processos de transferência eletrônica dos eletrodos construídos. A pré anodização foi realizada aplicando-se uma

diferença de potencial de 1,5 V vs. ECS por 120 s, em quatro meios reacionais diferentes: (1) solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, (2) solução de ácido sulfúrico 1,0 mol L⁻¹, (3) solução de bicarbonato de sódio 1,0 mol L⁻¹ e (4) solução saturada de carbonato de sódio.

Os efeitos da pré anodização conduzida em cada um dos meios reacionais foram avaliados registrando-se voltamogramas cíclicos em solução de hidroquinona, utilizando como eletrólito suporte solução tampão fosfato. Os voltamogramas obtidos, antes e após a pré anodização realizada em cada um dos meios reacionais, estão apresentados na Figura 11.

O processo de pré anodização conduzido em meio de solução tampão fosfato, como pode ser observado na Figura 11A, melhorou consideravelmente os processos de transferência eletrônica na superfície, sendo que o ΔE_p do par redox diminuiu de 850 mV para 400 mV. Almejando-se uma melhoria mais significativa, visto que a hidroquinona, por sofrer uma reação de transferência de dois elétrons (Fig. 12), espera-se, para um processo Nerstiano controlado por difusão, um valor de $\Delta E_p \sim 30$ mV, procedeu-se à pré anodização nos demais meios anteriormente citados. Os resultados observados (Figura 11) demonstram que a pré anodização conduzida em meio de solução saturada de Na₂CO₃ proporcionou uma melhoria mais significativa dos processos de transferência eletrônica, visto que foram observados os valores de ΔE_p 650, 360 e 290 mV para a pré anodização realizada em H₂SO₄, NaHCO₃ e Na₂CO₃, respectivamente. Além disso, após o pré-tratamento em solução saturada de Na₂CO₃ a razão I_{pa}/I_{pc} aproximou-se mais da unidade do que quando o pré-tratamento foi conduzido nas demais condições (Tabela 3).

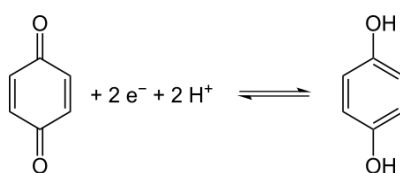


Figura 12: Reação de redução da hidroquinona. Processo reversível utilizado na avaliação da reversibilidade dos eletrodos de carbono impresso.

Tabela 3: Intensidade das correntes de pico anódica e catódica, assim como a sua razão, observadas após o pré-tratamento eletroquímico realizado nos diferentes meios.

Meio – pré-tratamento	$I_{pa} / \mu A$	$I_{pc} / \mu A$	I_{pa}/I_{pc}
Solução tampão fosfato	270	-263	1,03
H_2SO_4 1,0 mol L ⁻¹	254	-230	1,10
$NaHCO_3$ 1,0 mol L ⁻¹	249	-286	0,87
Na_2CO_3 (sat.)	216	-214	1,01

O efeito do pré-tratamento eletroquímico conduzido em solução saturada de Na_2CO_3 na cinética de transferência eletrônica também foi avaliado por meio de espectroscopia de impedância eletroquímica. A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma ferramenta de grande utilidade para o estudo de praticamente todos os tipos de fenômenos que ocorrem na interface, pois permite a exploração de grandes intervalos de frequência cobrindo um amplo intervalo de valores de constante de tempo. Esta técnica permite a separação de diferentes processos, tais como, capacitivo, transferência de carga, transporte de massa, adsorção/dessorção, etc (FERREIRA, 2011). Sendo assim, o eletrodo de carbono impresso foi imerso em uma solução tampão fosfato, na qual foram realizadas as medidas de impedância, antes e após o tratamento eletroquímico.

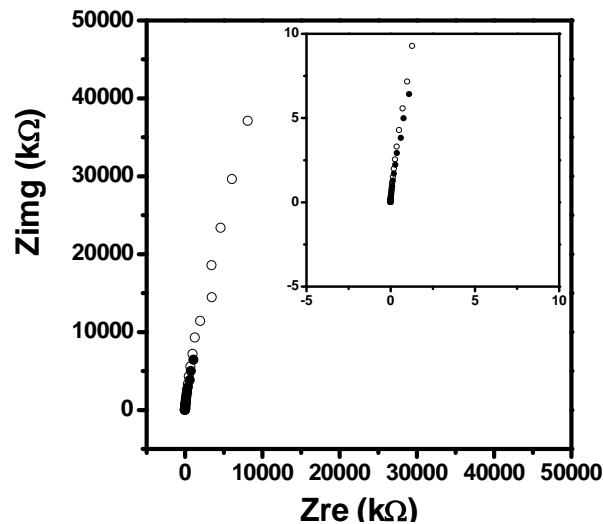


Figura 13: Espectro de impedância do eletrodo de carbono impresso em solução tampão fosfato (○) antes e (●) após o pré-tratamento eletroquímico em solução saturada de Na_2CO_3 .

A Figura 13 mostra estudos iniciais usando EIS para confirmar a eficiência do tratamento eletroquímico da superfície de carbono do eletrodo impresso. As medidas foram

realizadas em eletrólito suporte, antes e após a anodização. Importante notar que os estudos realizados na ausência do par redox são, também, muito significativos, pois auxiliam no entendimento da estabilidade e das propriedades elétricas e físico-químicas da superfície (FERREIRA, 2011). Antes do pré-tratamento observa-se um comportamento mais capacitivo do sistema com extrapolação linear tendendo ao infinito, devido à presença de espécies carregadas provenientes do eletrólito. Este comportamento também está intimamente relacionado à presença de polímeros na composição da tinta utilizada. Realizado o tratamento em solução saturada de Na_2CO_3 observa-se uma diminuição da capacitância do sistema devido à formação de grupos oxigenados na superfície do eletrodo, facilitando, desta forma, a ocorrência dos processos de transferência eletrônica, como já observado anteriormente por outros pesquisadores (CUI, 2001; GORNALL, 2009). Os resultados observados corroboram os anteriormente obtidos por meio da técnica de voltametria cíclica, os quais demonstram que este tipo de tratamento é adequado para promover uma melhora nos processos de transferência eletrônica na superfície do eletrodo de carbono impresso construído.

Após a definição do meio reacional mais adequado para a realização do processo de pré anodização, avaliou-se o tempo de aplicação do potencial anódico. Os tempos estudados foram 60, 120 e 180 s. Voltamogramas cíclicos em meio de HQ foram registrados após o tratamento eletroquímico realizado em cada um dos tempos de aplicação citados. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 14. Os valores dos potenciais e das correntes de pico, assim como o valor de ΔE_p e I_{pa}/I_{pc} foram calculados a partir dos voltamogramas registrados em solução de hidroquinona, e são apresentados na Tabela 4.

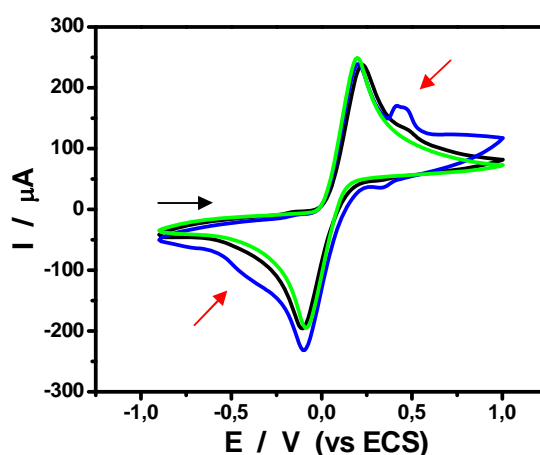


Figura 14 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em solução de HQ $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ solubilizada em solução tampão fosfato após a anodização por (—) 60 s, (—) 120 s e (—) 180 s em solução saturada de Na_2CO_3 , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Tabela 4: Valores dos potenciais e correntes de pico, ΔE_p e I_{pa}/I_{pc} calculados a partir do voltamogramas cíclicos registrados em solução de HQ após a pré anodização conduzida em solução saturada de Na_2CO_3 por diferentes tempos de aplicação do potencial.

t / s	E_{pa} / V	E_{pc} / V	$\Delta E_p / V$	$I_{pa} / \mu A$	$I_{pc} / \mu A$	I_{pa}/I_{pc}
60	0,223	-0,099	0,322	239	-197	1,21
120	0,177	-0,087	0,264	232	-234	0,99
180	0,195	-0,086	0,281	252	-197	1,28

O valor de ΔE_p do par redox antes do tratamento anódico da superfície era de 850 mV, observa-se que todos os tempos de pré anodização promoveram uma melhoria significativa dos processos de transferência eletrônica da superfície. Sabe-se que a reversibilidade da transferência eletrônica é avaliada pelos valores de ΔE_p assim como pelos valores de intensidade de corrente pico. Para os processos de transferência eletrônica reversíveis a intensidade da corrente de pico anódica é igual à intensidade da corrente de pico catódica, ou seja, a razão entre estas é igual a unidade (BARD, 2001). Avaliando-se, então, a razão entre as intensidades de corrente anódica e catódica, nota-se que quando a anodização foi realizada por 120 s esta razão apresentou uma maior proximidade da unidade. Portanto, como os valores de ΔE_p não variaram muito entre si, optou-se por dar continuidade ao trabalho adotando-se o tempo de anodização de 120 s.

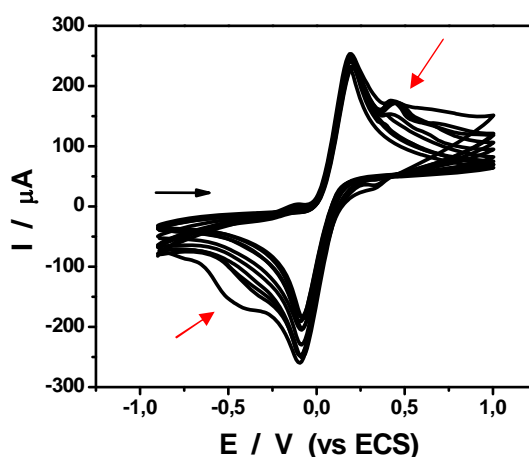


Figura 15 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono impresso registrados em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona solubilizada em solução tampão fosfato. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. $n = 10$.

Em seguida avaliou-se a repetibilidade do eletrodo de carbono impresso construído. Para tal construíram-se 10 eletrodos e registraram-se voltamogramas cíclicos em solução de

HQ após o procedimento de pré anodização. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 15, mostraram uma boa repetibilidade entre os eletrodos, sendo encontrados desvios de 3,7 e 13,4 % para as correntes de pico anódica e catódica, respectivamente. Avaliando-se mais cuidadosamente os resultados obtidos, Fig. 14 e 15, nota-se a presença de processos de oxidação e redução adicionais aos processos referentes ao par redox utilizado (destacados pelas setas em vermelho). Estes estão, provavelmente, relacionados à resposta eletroquímica da tinta de prata utilizada para a confecção do contato elétrico não totalmente recoberta pela tinta de carbono. Estes processos redox adicionais serão discutidos na próxima seção.

2.2. Otimização da construção do eletrodo de carbono impresso

Durante a otimização das condições de tratamento eletroquímico para melhoria dos processos de transferência eletrônica, foram observados processos de oxidação e redução além daqueles referentes ao par redox (HQ/BQ) utilizado. Estes podem ser perfeitamente visualizados nas Figuras 11, 14 e 15, sendo que nas duas últimas estão destacados pelas setas em vermelho. Tais processos redox são, provavelmente devido a resposta da tinta de prata, utilizada na confecção do contato elétrico, não totalmente recoberta pela tinta de carbono.

A confirmação da resposta eletroquímica da tinta de prata foi realizada registrando-se um voltamograma cíclico em solução de KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, no qual observou-se um par de picos separados por 500 mV, como mostrado na Figura 16. O pico de oxidação é devido a formação de AgCl na superfície, pois dados da literatura indicam que o cloreto se adsorve sobre a prata em diferença de potencial de -400 mV. Após este estágio inicial de adsorção do cloreto e com o aumento do potencial há a eletrooxidação da prata (pico anódico, $E = 300 \text{ mV}$) e formação de cloreto de prata na superfície do eletrodo. O processo catódico ($E = -250 \text{ mV}$) está relacionado à eletrorredução do cloreto de prata formado durante a varredura anódica. (BENEDETTI, 1994). Estes resultados comprovam que a quantidade de tinta de carbono depositada não foi suficiente para a cobertura total da tinta de prata utilizada na confecção do contato elétrico. Portanto a quantidade de tinta carbono depositada também foi otimizada.

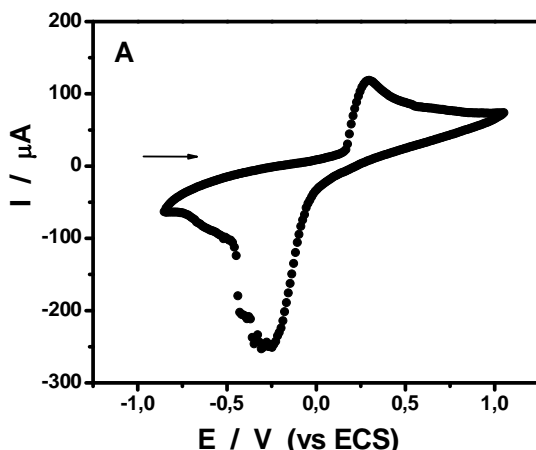


Figura 16 - (A) Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono impresso em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl registrado após a anodização. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A otimização da quantidade de tinta de carbono a ser depositada foi realizada construindo-se eletrodos variando a quantidade de tinta de carbono utilizada na confecção do mesmo, (1) eletrodos sem o contato de prata, ou seja, com contato confeccionado com tinta de carbono, (2) eletrodos com o contato de prata, e aplicando-se a tinta de carbono duas vezes e submetendo-o à cura também duas vezes, e (3) eletrodos com o contato de prata, e aplicando-se a tinta de carbono três vezes.

Os três diferentes tipos de eletrodo construídos foram avaliados quanto a sua resposta eletroquímica em solução tampão fosfato e em solução de HQ. Para tanto, registraram-se voltamogramas cíclicos nos meios acima citados antes e após a pré anodização, os quais são apresentados na Figura 17. No voltamograma cíclico do eletrodo de carbono, confeccionado com contato de carbono, em solução tampão fosfato (Fig. 17A) não é observado nenhum processo redox, sendo que na Fig. 17B são observadas as reações de oxidação e redução referentes ao par redox presente no meio. Este resultado sugere que os processos redox anteriormente observados (Fig. 11, 14 e 15) são realmente referentes à resposta eletroquímica da tinta de prata exposta, visto que na sua ausência estes não são mais visualizados.

Nos voltamogramas do eletrodo de carbono, confeccionado com contato elétrico de prata e duas deposições da tinta de carbono (Fig. 17C), registrados em solução tampão fosfato já pode ser observado um processo redox, o qual se encontra destacado pela seta em vermelho. Confirmou-se que este processo observado é referente à resposta da tinta de prata avaliando-se a resposta eletroquímica de um eletrodo de prata em solução tampão fosfato.

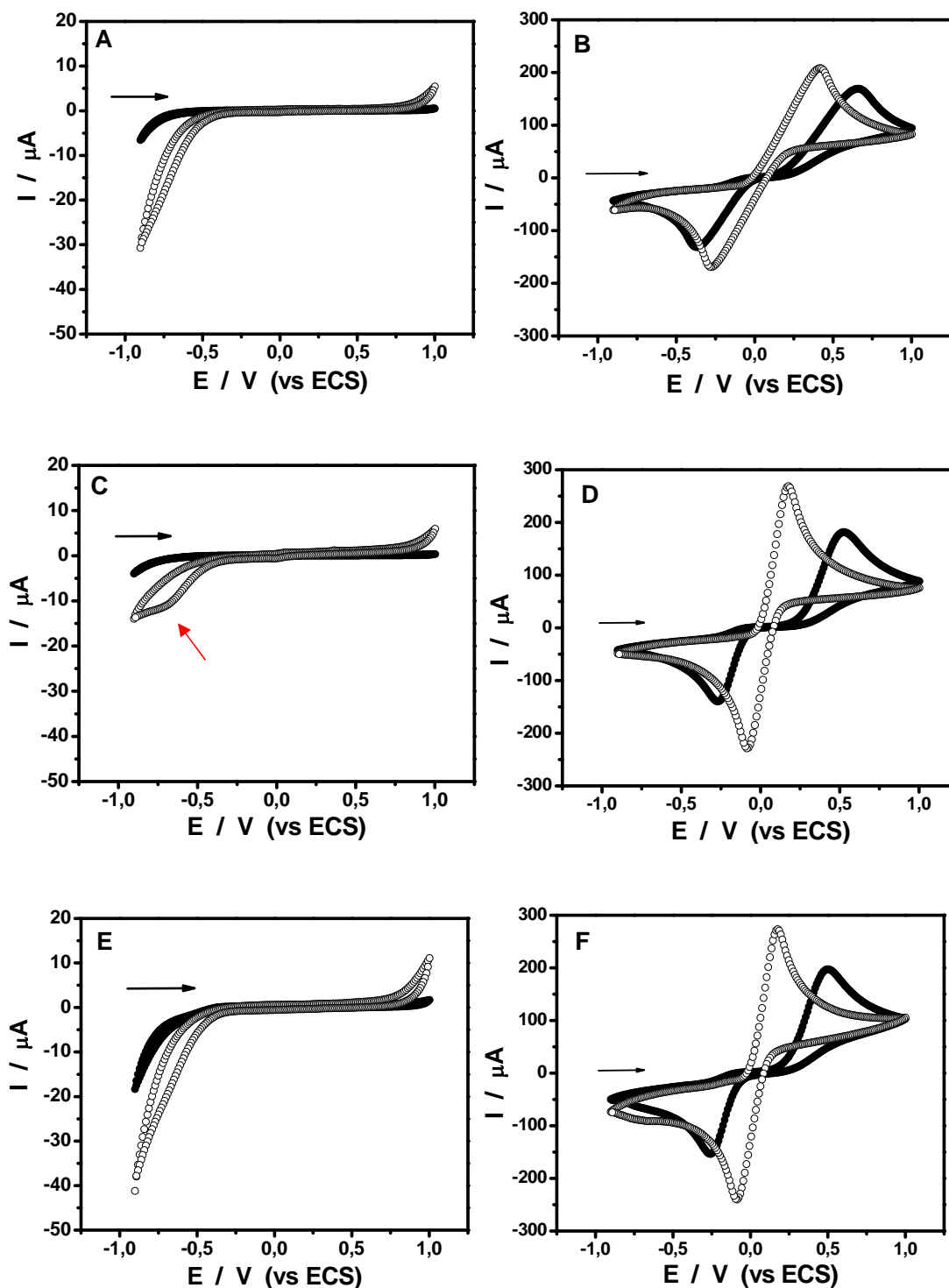


Figura 17 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono impressos em (A, C e E) solução tampão fosfato e (B, D e F) em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona construídos (A e B) somente com tinta de grafite, ou seja, sem o contato de prata, (C e D) depositando-se duas vezes a tinta de grafite e (E e F) depositando-se três vezes a tinta de grafite, (●) antes e (○) após a anodização. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Na Figura 18 apresenta-se o voltamograma cíclico do eletrodo de prata em solução tampão fosfato. O processo redox observado em potencial próximo a $-0,5$ V é o mesmo processo registrado para o eletrodo construído com contato de prata e duas deposições de carbono e destacado (Fig. 17C). Confirmando, portanto, que apenas duas deposições da tinta de carbono não são suficientes para recobrir totalmente a tinta de prata utilizada na confecção do contato elétrico.

Na Figura 17D são apresentados os voltamogramas do eletrodo, confeccionado com duas deposições da tinta de carbono, registrados em solução tampão fosfato contendo o par redox. Observam-se somente os picos de oxidação e redução referentes somente ao par HQ / BQ. Este fato, provavelmente, é devido a uma maior cobertura da tinta de prata. Estando uma menor área de prata exposta a corrente dos processos eletroquímicos que nela ocorrem possuem intensidade menor. Portanto, sendo a área de carbono bem superior e a intensidade de corrente dos processos redox nesta superfície sendo bem superiores, provavelmente impossibilitam a observação daqueles que estão ocorrendo na superfície da prata.

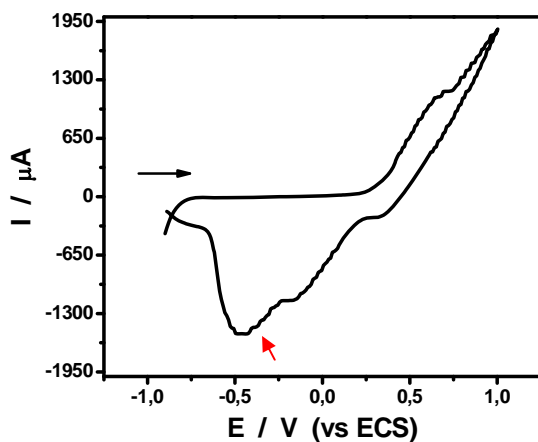


Figura 18: Voltamograma cíclico do eletrodo de prata registrado em solução tampão fosfato após o pré-tratamento eletroquímico em solução saturada de Na_2CO_3 . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nos voltamogramas do eletrodo de carbono, confeccionado com contato elétrico de prata e três deposições da tinta de carbono, não são observados processos redox referentes à resposta eletroquímica da tinta de prata (Fig. 17E e 17F). Com tais resultados conclui-se que três deposições da tinta de carbono são suficientes para a total cobertura da tinta de prata, de modo que esta não mais responde juntamente com a tinta de carbono durante a aplicação da diferença de potencial. Desta forma, esta construção é a melhor para a continuidade do trabalho, visto que o eletrodo confeccionado com contato elétrico de carbono, apesar de

garantir a não interferência da prata, possui uma alta resistência à transferência de carga, o que pode ser confirmado pelo ΔE_p ($\Delta E_p = 690$ mV) observado para o par redox.

Após o procedimento de otimização da construção do eletrodo de carbono impresso, este foi novamente avaliado quanto à repetibilidade. Este estudo foi realizado utilizando-se como par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, pois a hidroquinona, por possuir em sua estrutura um anel benzênico com um sistema de elétrons π é capaz de interagir com o DNA, podendo, desta forma, prejudicar as etapas posteriores de desenvolvimento do genossensor. Para o estudo construiu-se, então, 10 eletrodos e registrou-se voltamogramas cíclicos em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ após a anodização. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 19, mostraram uma boa repetibilidade entre os eletrodos, sendo encontrados desvios de 7,4 % e 8,7 % para as correntes de pico anódica e catódica, respectivamente.

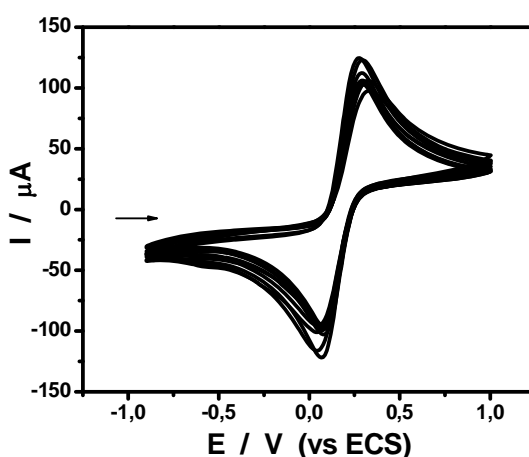


Figura 19 - Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de carbono impresso registrados em solução 1×10^{-2} mol L^{-1} de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solubilizada em solução tampão fosfato. $v = 50$ mV s^{-1} . $n = 10$

2.3. Caracterização da superfície do eletrodo

Finalizando, então, realizou-se a caracterização do eletrodo de carbono impresso construído com o objetivo de se avaliar os efeitos do tratamento eletroquímico na sua superfície por meio de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG). As micrografias obtidas estão apresentadas na Figura 20. Observou-se, uma superfície com estrutura heterogênea, o que de acordo com Harris e colaboradores são características esperadas para eletrodos de carbono confeccionados com tinta de grafite (HARRIS, 2008).

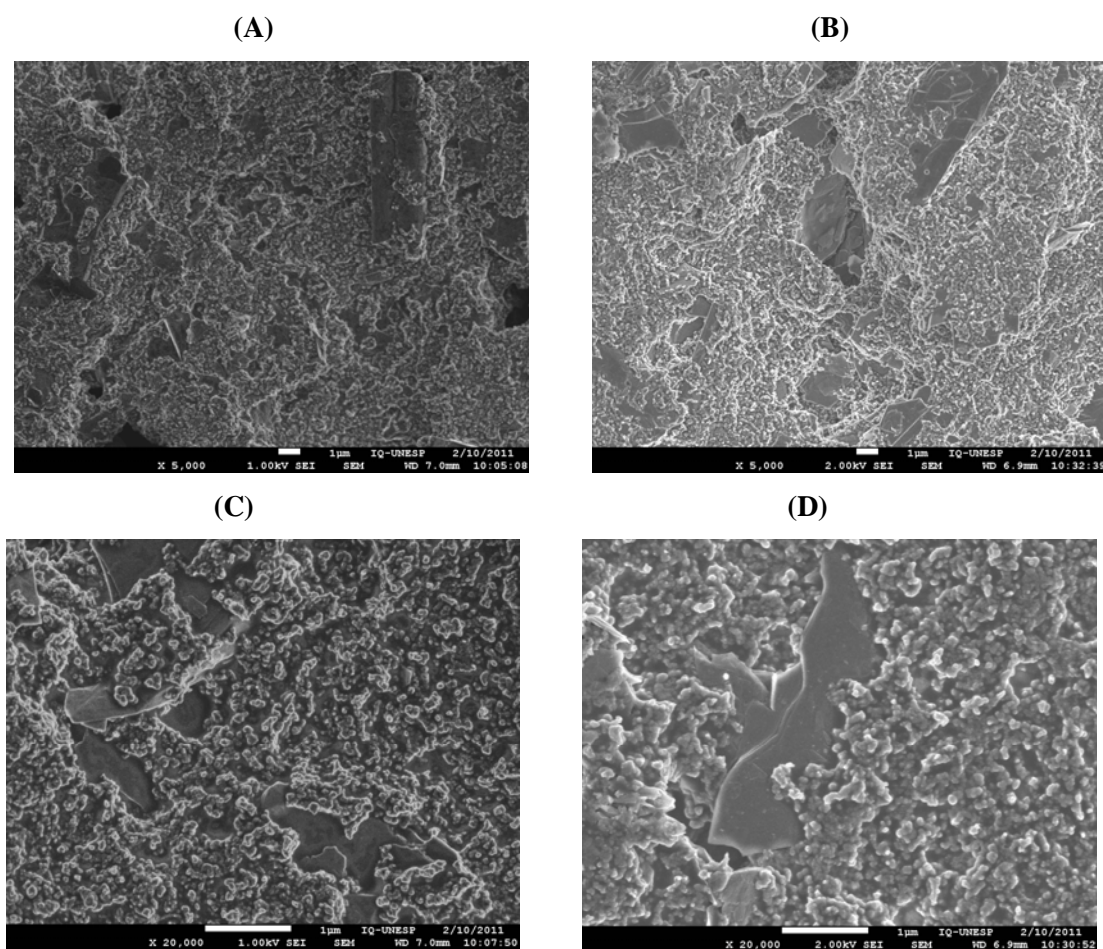


Figura 20 - Micrografias do eletrodo de carbono impresso (A e C) antes da anodização e (B e D) após a anodização.

As imagens revelaram partículas de carbono de dois tamanhos diferentes incorporadas em uma matriz polimérica. São observadas, tanto antes como após a realização da anodização, partículas de carbono com morfologia não definida e variada com tamanho em torno de 3 μm , e partículas com morfologia esférica e tamanho menor do que 1 μm . Estes resultados corroboram aqueles observados antes e após o polimento do eletrodo de carbono impresso. Concluindo-se, portanto que, a anodização não promoveu uma maior exposição das partículas de carbono, e que a melhora no desempenho eletroquímico do eletrodo não está relacionada às suas características superficiais e sim à formação de espécies oxigenadas na superfície do eletrodo como descrito na seção 2.1 deste capítulo.

3. CONCLUSÃO PARCIAL

Neste capítulo foram definidas as melhores condições para a construção dos eletrodos de carbono impresso. Definiu-se, a partir dos resultados de voltametria cíclica, para a confecção dos eletrodos a melhor estratégia como sendo a utilização da tinta de prata para a confecção do contato elétrico e para que não houvesse resposta eletroquímica da prata realizar a aplicação da tinta de carbono três vezes.

Observou-se como melhor forma de promover a melhoria dos processos de transferência eletrônica na superfície do eletrodo de carbono impresso, a aplicação de um pré tratamento eletroquímico. Definiu-se as melhores condições para este tratamento como sendo a aplicação de uma diferença de potencial de 1,5 V durante 120 s em meio de solução saturada de carbonato de sódio.

CAPÍTULO III: GENOSENSOR

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1.1. Materiais e Métodos

1.1.3. Metodologia para imobilização da sonda

A superfície do eletrodo de carbono impresso previamente anodizada foi oxidada para a geração de grupamentos carboxílicos. A oxidação foi realizada por meio de aplicação de potencial anódico (1,5 V vs. ECS) em uma solução aquosa de $K_2Cr_2O_7$ (Sigma-Aldrich) 2,5 % e HNO_3 (Sigma-Aldrich) 10 % (PIVIDORI, 2000). Em seguida, os grupamentos carboxílicos foram ativados incubando-se, por 1 h, o eletrodo de trabalho em solução aquosa contendo uma mistura de N-etil-N-(dimetilaminopropil) carbodiimida (ECD) (Sigma-Aldrich) 5 mmol L^{-1} e N-hidoxisuccinimida (NHS) (Sigma-Aldrich) 8 mmol L^{-1} . Após a ativação, a proteína estreptavidina (STA) (Sigma-Aldrich) foi imobilizada na superfície do eletrodo, para possibilitar, em seguida, a imobilização da sonda de DNA biotilada via interação biotina-STA. Os parâmetros, concentração e tempo de incubação, tanto para a STA como para a sonda de DNA foram otimizados por meio de um planejamento fatorial do tipo 2^n realizado utilizando-se o software Minitab.

As seqüências das sondas utilizadas podem ser visualizadas na Tabela 5. Após a modificação do eletrodo de trabalho com a STA e a sonda, os sítios remanescentes da proteína foram bloqueados via reação com uma solução de biotina (Sigma-Aldrich) $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ por 30 minutos. Na Figura 21 é mostrado em diagrama esquemático do eletrodo funcionalizado e pronto para a realização das medidas de voltametria. As soluções de STA, sonda e biotina foram preparadas em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,0$.

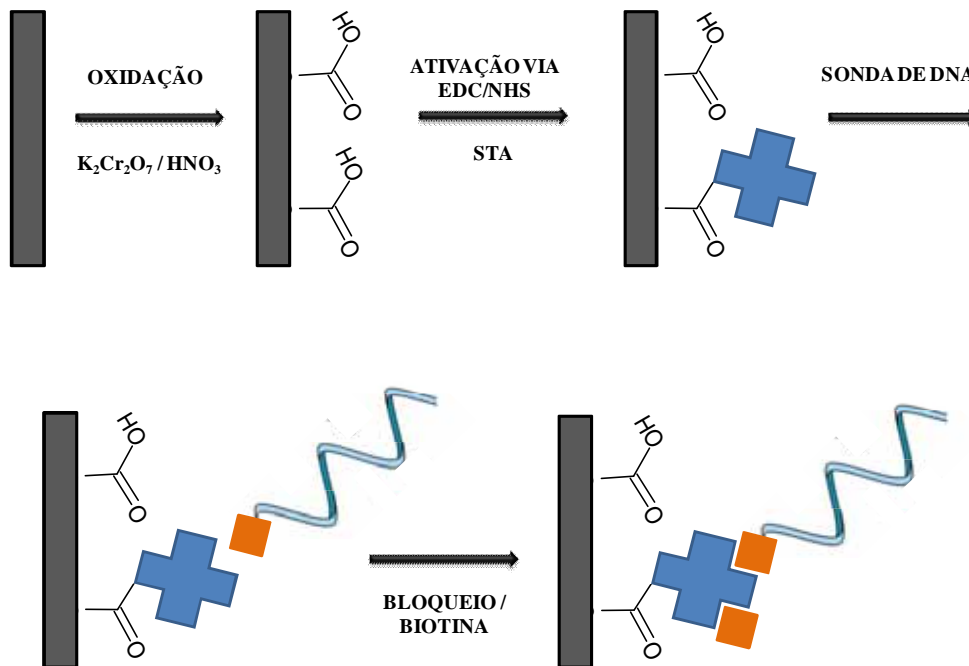


Figura 21: Diagrama esquemático da superfície do eletrodo de carbono impresso funcionalizada (do autor).

1.1.4. As sequências de DNA

No propósito de se avaliar a seletividade do genossensor construído foram utilizadas, para a modificação do eletrodo de carbono, sondas de captura específicas para o diagnóstico da Hepatite C tipo 1 (HCV1) e tipo 3 (HCV3) (RICCARDI, 2006). Monitorou-se, então, a hibridização destas sondas com sequências de DNA complementares e também sequências contendo algumas bases não complementares. Para a avaliação da seletividade da metodologia também foram usadas sequências de DNA de dois vírus coinfectantes (HBV e HIV). Todas as sequências de DNA utilizadas foram adquiridas da Sigma-Aldrich, e estão apresentadas na Tabela 5.

As soluções de sequências de DNA foram preparadas em solução tampão citrato de sódio salino (SSC, do inglês *saline-sodium citrate*) ($NaCl$ $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ / $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ $0,015 \text{ mol L}^{-1}$) com pH 7,0. Todas as soluções utilizadas nos procedimentos analíticos foram preparadas com água deionizada (Millipore system, Direct Q3) com condutividade de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Tabela 5: Sequências dos oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do genossensor

Sonda HCV1	5'-biotin- CGC TCA ATG CCT GGA GAT	
Sonda HCV3	5'-biotin- CGC TCA ATA CCC AGA AAT	
Complementar HCV1	5'- ATC TCC AGG CAT TGA GCG	
Complementar HCV3	5'- ATT TCT GGG TAT TGA GCG	
SEQUÊNCIAS NÃO COMPLEMENTARES		
	5'- ATC TCA AGG CAT TGA GCG	Uma base não complementar (NC1)
HCV1	5'- ATC CCT AGT CAT GCA GCG	Quatro base não complementar (NC4)
	5'- CGA GAA CTT ACG GTC TAT	Sequência não complementar (TNC)
	5'- ATT TCT AGG TAT TGA GCG	Uma base não complementar (NC1)
HCV3	5'- ATT TAG GGG GCT TGA GCG	Quatro base não complementar (NC4)
	5'- CGG GAG TTT GCG GTC TAT	Sequência não complementar (TNC)
VIROSES COINFECTANTES		
HBV	5'- TAT ATG GAT GAT GTG GTA TT	
HIV	5'- AGA AGG AGA GAG ATG GGT GC	

1.1.5. Metodologia para hibridização do material genético viral amplificado com a sonda imobilizada na superfície do transdutor

O genossensor construído foi testado frente a amostras de pacientes HCV positivos e negativos. Amostras de RNA viral e de DNA amplificado foram cedidas pelo Laboratório de Biologia do Grupo de Hepatites da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas coordenado pela Prof^a. Dr^a. Neiva Sellan Lopes Gonçalves.

Para o processo de hibridização das amostras de DNA amplificado recebidas foram testadas diferentes soluções tampão devido à dificuldade encontrada em se realizar esta etapa da análise. Receberam-se as amostras em solução de desnaturação, as quais foram, então, incubadas no genossensor utilizando três metodologias distintas:

- (1) Diluição da solução de DNA amplificado em solução tampão fosfato em proporção 1:1 e incubação do eletrodo, nesta solução, à temperatura ambiente por 1 h. (ULIANA, 2011)
- (2) Diluição da solução de DNA amplificado em solução tampão de hibridização (HYB / SW SOLN) proveniente do kit para diagnóstico VERSANT[®] HCV (Genotype 2.0 Assay

- LiPA), em proporção 1:1, e incubação do eletrodo, nesta solução, à temperatura ambiente por 1 h.
- (3) Diluição da solução de DNA amplificado em solução tampão SSC em proporção 1:100, e incubação do eletrodo, nesta solução, a 40° C por 1 h.

```

5'- GCCAGCCCC TGATGGGGG GACTCTCCAC CATGAATCAC TCCCCTGTGA GAACTACTG
61 TCTTCACGCA GAAAGCGTCT AGCCATGGCG TTAGTATGAG TGTCGTGCAG CTCCAGGAC
121 CCCCCCTCCC GGGAGAGCCA TAGTGGTCTG CGGAACCGGT GAGTACACCG AATTGCCAG
181 GACGACCGGG TCCTTCTTG GATAAACCG CTCAATGCCT GGAGATTTGG GCGTGCCCCC
241 GCAAGACTGC TAGCCGAGTA GTGTTGGGTC GCGAAAGGCC TTGTGGTACT GCCTGATAGG
301 GTGCTTGCGA GTGCCCGGG AGGTCTCGTA GACCGTGCAC CATGAGCACG AATCTAAAC
361 CTCAAAGAAA AACCAAACGT AACACCAACC GTCGCCACA GGACGTCAAG TTCCCGGGTG
421 GCGGTCAGAT CGTTGGTGA GTTACTTGT TGCCGCGCAG GGGCCCTAGA TTGGGTGTGC
481 GCGCGACGAG GAAGACTTCC GAGCGGTCGC AACCTCGAGG TAGACGTCAG CCTATCCCCA

```

Figura 22: Sequência do RNA do vírus da hepatite C transcrita e amplificada (sublinhada). (do autor)

Amostras de RNA também foram empregadas nos ensaios de hibridização com o genossensor. A fita de RNA positiva foi primeiramente submetida à reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA entre os nucleotídeos 1 e 540 da região 5' UTR (do inglês, *untranslated region*), sequência apresentada na Figura 22.

Para tanto preparou-se uma mistura com 1,5 µg de RNA, 2 pmol do iniciador direto (5'-TGG GGA TAG GCT GAC GTC TAC), 10 mmol L⁻¹ de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e água destilada estéril (tratada com dietilpirocarbonato) para completar um volume de 13 µL. Essa mistura foi, então, incubada a 65 °C por 5 minutos para a quebra das ligações de possíveis formações do tipo hairpin e, em seguida mantida em gelo por 1 minuto. A essa mistura adicionou-se 4 µL de solução tampão (First-Strand buffer – 5x), 1 µL de ditiotretitol (DTT) 0,1 mol L⁻¹ e 1 µL de enzima Super ScriptTM III RT (Invitrogen). Homogeneizou-se e incubou-se a mistura final a 50 °C por 1 h para a reação de transcrição reversa. Após a reação, a enzima foi inativada pela incubação da solução a 70 °C por 30 minutos. A reação de transcrição reversa foi conduzida seguindo as instruções do fabricante (Super ScriptTM III RT (Invitrogen)).

Concluída a síntese do cDNA procedeu-se, então, a reação de amplificação deste por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). Para a reação de PCR utilizou-se 2 µL da solução resultante do procedimento de transcrição reversa. À esta solução adicionou-se 1 µL de solução do iniciador direto, anteriormente citado, 1 µL de solução do iniciador reverso (5'-CGC TCA ATG CCT GGA GAT TTG), 10 µL de solução

tampão para PCR (200 mmol L^{-1} Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mmol L^{-1} de KCl), $1,5 \text{ }\mu\text{L}$ de MgCl_2 , $1,5 \text{ }\mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO), $1 \text{ }\mu\text{L}$ de dNTPs 10 mmol L^{-1} , $0,5 \text{ }\mu\text{L}$ da enzima Phusion DNA polimerase (Finnzymes Oy) e completou-se o volume a $50 \text{ }\mu\text{L}$ com água destilada. A mistura foi levada a um termociclador, onde foi submetida a uma desnaturação inicial a $98 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30s, e em seguida a 35 ciclos térmicos consistindo em uma etapa de desnaturação a $98 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 s, seguida pela etapa de anelamento dos iniciadores a $68 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30s e extensão a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1 minuto. Após os 35 ciclos térmicos a mistura foi submetida a uma etapa de extensão final a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos (Figura 23). A reação de amplificação foi conduzida seguindo as instruções do fabricante (Phusion DNA Polymerase (Finnzymes)).

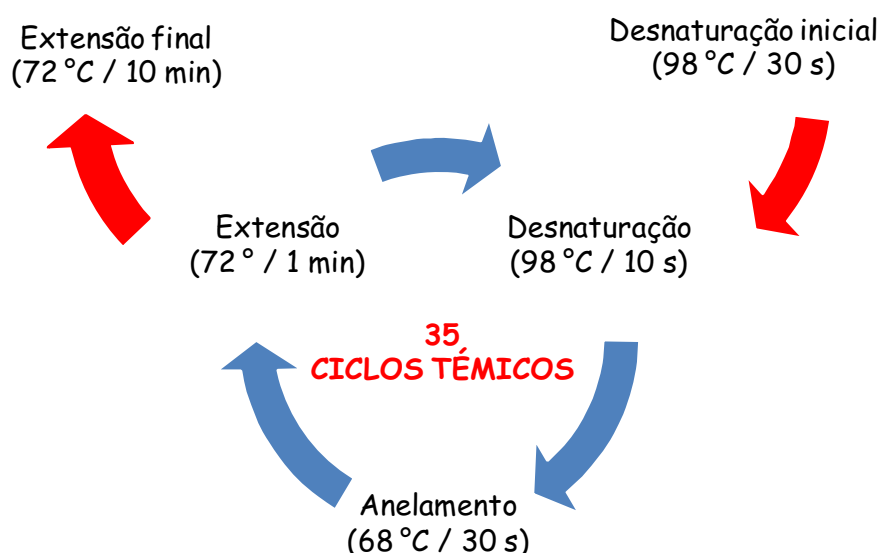


Figura 23: Diagrama esquemático da reação de PCR realizada para amplificação do material genético viral. (do autor)

Após a reação de amplificação, o DNA foi purificado por meio de reação de precipitação com glicogênio 20 %, solução tampão acetato de sódio 3 mol L^{-1} em pH 5,2 e etanol absoluto. Em seguida, o DNA purificado foi submetido à digestão com a endonuclease de restrição Nhe I (Biolabs – New England) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ *over night*, para a liberação de um fragmento de 40 pares de base. Em seguida a enzima foi inativada pela incubação a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos.

O processamento das amostras de RNA foi realizado em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microorganismos do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Maria Célia Bertolini.

Procedeu-se em seguida a incubação do cDNA amplificado no genossensor desenvolvido. Primeiramente a solução de cDNA foi diluída em solução tampão SSC na proporção 1:100,

em seguida aquecida a 100° C por 5 minutos, colocada em banho de gelo por 1 minuto, e incubada no genossensor a 50° C por 1 h para a reação de hibridização.

1.2. Instrumentação

1.2.1. Análise Voltamétrica

As medidas eletroquímicas foram realizadas como descrito no item 1.2.1 mencionado no capítulo 2.

Os processos de transferência de carga foram avaliados por meio de medidas de voltametria cíclica em janela de potencial de -0,9 a 1,0 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A oxidação da guanosina 5'-monofosfato (Sigma-Aldrich) e da base nitrogenada guanina foram monitoradas em meio de solução tampão fosfato por meio da técnica de voltametria de onda quadrada em janela de potencial de 0,2 e 1,5 V. Os valores de incremento de potencial, frequência e amplitude foram otimizados durante a execução do trabalho.

1.2.3. Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com reflectância difusa transformada de Fourier (IV-DRIFTS)

A superfície do eletrodo de trabalho também foi caracterizada após a sua modificação. Esta foi realizada por meio de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu FTIR 8300 interfaciado a um computador e controlado pelo programa HYPER IR 1.51. Foram realizadas 32 varreduras entre 400 e 4000 cm⁻¹.

1.2.4. Análise molecular

As reações de transcrição reversa do RNA viral e de amplificação do cDNA foram realizadas em um termociclador da Applied Biosystems (Veriti 96 well).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Avaliação da resposta eletroquímica da guanosina 5' monofosfato

Os eletrodos de carbono impressos desenvolvidos na primeira etapa do trabalho foram aplicados na construção de um genossensor, no intuito de se realizar o diagnóstico e a genotipagem da Hepatite C por meio da detecção do material genético de seu vírus causador.

O diagnóstico utilizando os genossensores é realizado por meio da detecção do evento biológico de hibridização entre o material genético viral e uma fita simples de DNA (sonda), com sequência complementar e específica, imobilizada na superfície de um eletrodo. Eletroquimicamente, esta detecção pode ser realizada de duas maneiras: (1) indiretamente, com o uso de moléculas marcadoras ou (2) diretamente, pelo monitoramento da intensidade da corrente de oxidação de algumas bases nitrogenadas, como apresentado no Capítulo 1. A disposição das bases nitrogenadas na molécula de DNA influencia no sinal analítico obtido, pois o DNA de fita dupla, o de fita simples e o degradado apresentam respostas características, sendo possível, portanto, a detecção da hibridização a partir do sinal analítico observado. Sendo assim, tendo em vista a simplicidade do dispositivo final, optou-se pela identificação do processo de hibridização, por meio do sinal de oxidação da base nitrogenada guanina.

O nucleosídeo monofosfatado, guanosina 5'-monofosfato, possui o mesmo potencial de oxidação na superfície do eletrodo de carbono, que a base nitrogenada guanina presente no DNA quando em sua forma desnaturada (BRABEC, 1978). Desta forma, antes da imobilização da sonda de DNA, foi avaliado o comportamento eletroquímico da guanosina 5' monofosfato frente aos eletrodos de carbono impresso, pois sendo este o nucleotídeo equivalente da base nitrogenada guanina, apresenta os mesmos grupamentos capazes de sofrer reações de oxidação (Fig. 24). Este estudo foi realizado por meio de voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada, sendo os parâmetros fixados segundo Lucarelli e colaboradores (LUCARELLI, 2002).

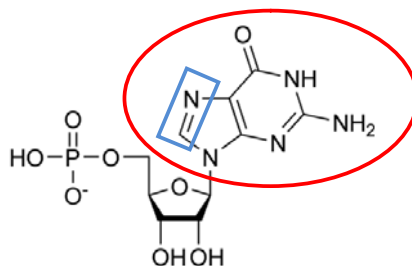


Figura 24: Estrutura da guanosina 5' monofosfato. Destacado em vermelho a base nitrogenada guanina, e em azul os grupamentos que sofrem reação de oxidação.

O voltamograma cíclico do eletrodo de carbono impresso registrado em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de guanosina 5' monofosfato, mostrado na Figura 25.A, apresenta um processo de oxidação em potencial igual a $0,97 \text{ V}$. Este processo anódico é referente à oxidação da guanosina presente no meio, e está de acordo com os estudos realizados por Brett e colaboradores (BRETT, 1994).

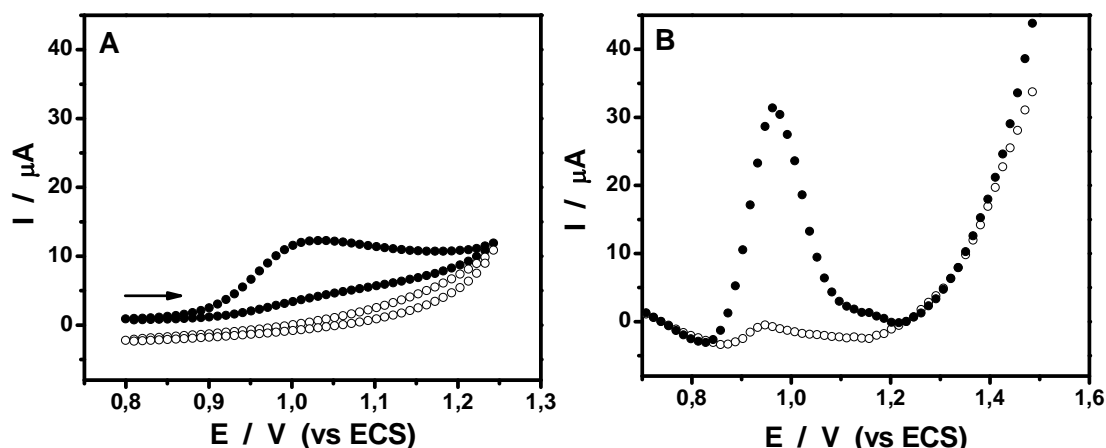


Figura 25 - A- Voltamograma cíclico do eletrodo de carbono impresso em: (○) solução tampão fosfato; (●) solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de guanosina 5'-monofosfato. $v=50 \text{ mV s}^{-1}$. B- Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso em: (○) solução tampão fosfato; (●) solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de guanosina 5'-monofosfato. $f=200 \text{ Hz}$, $a=40 \text{ mV}$ e $\Delta E=15 \text{ mV}$.

Pelo voltamograma apresentado na Figura 25A observa-se que a intensidade de oxidação da guanosina 5' monofosfato é relativamente baixa ($\sim 13 \text{ } \mu\text{A}$). Sabendo que a hibridização entre o material genético viral e a sonda imobilizada na superfície do eletrodo é detectada por meio da diminuição da intensidade da corrente de oxidação da base nitrogenada e que a técnica de voltametria de onda quadrada possui uma sensibilidade maior, optou-se por avaliar a resposta eletroquímica da guanosina por meio desta técnica, visando uma maior sensibilidade da metodologia em estudo. Desta forma, registrou-se o voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso em solução de guanosina 5' monofosfato (Figura

25B), no qual foi possível a perfeita visualização do pico de oxidação da guanosina em potencial igual a 0,97 V e com uma intensidade de corrente significativamente maior (em torno de 30 μA).

2.2. Estratégia de funcionalização do eletrodo de carbono impresso

Posteriormente à avaliação do comportamento eletroquímico da guanosina 5' monofosfato no eletrodo de carbono impresso, procedeu-se à imobilização da sonda de DNA na superfície do mesmo. Dentre as diversas metodologias descritas na literatura para imobilização de sondas de DNA em eletrodos de carbono (Capítulo 1), optou-se por realizar uma oxidação da superfície para ligação da proteína STA para posteriormente imobilizar a sonda de DNA. A oxidação da superfície de carbono promove a geração de grupamentos carboxílicos, como mostrado na Figura 26A (DONET, 1968; PIVIDORI, 2000), os quais possibilitam a imobilização de proteínas via formação de uma ligação covalente.

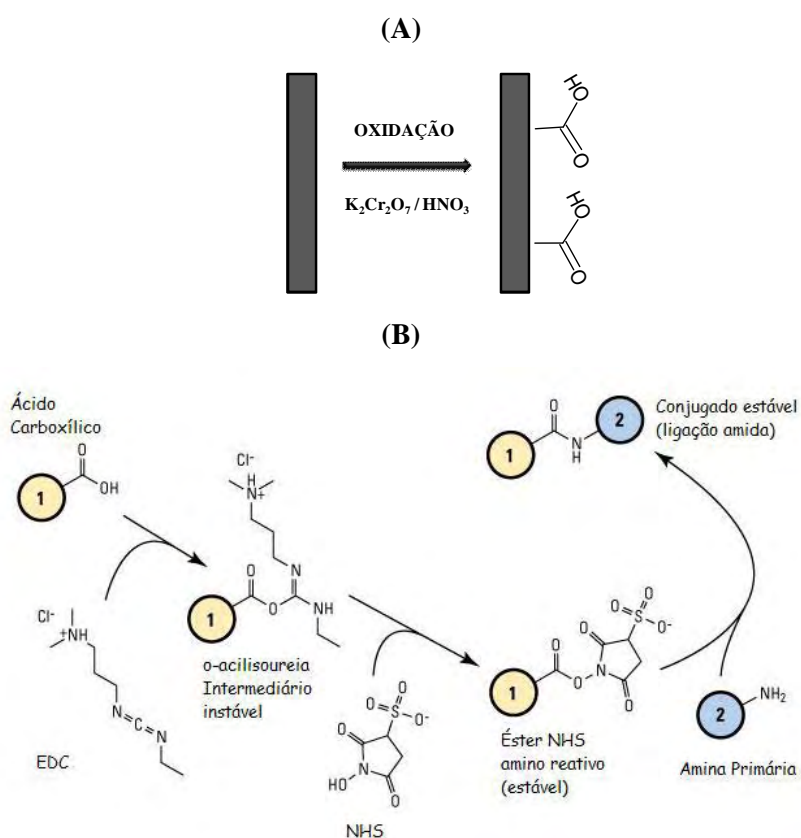


Figura 26 – (A) Geração de grupamentos carboxílicos por meio da oxidação eletroquímica. (B) Mecanismo de ativação dos grupamentos carboxílicos por meio da reação com EDC/NHS, onde 1 simboliza a superfície funcionalizada e 2 simboliza a STA.

A oxidação da superfície de carbono, neste trabalho, foi realizada após o pré tratamento em carbonato de sódio, imergindo-se o eletrodo de carbono impresso em uma solução aquosa contendo 2,5 % de $K_2Cr_2O_7$ 2,5 % e 10 % de HNO_3 e aplicando-se uma diferença de potencial igual a +1,5 V por 15 s.

Os grupamentos carboxílicos gerados durante a oxidação foram, em seguida, ativados incubando-se o eletrodo em uma solução contendo uma mistura de EDC/NHS. O mecanismo da reação de ativação é apresentado na Figura 26B. Em seguida incubou-se o eletrodo de carbono em solução contendo a proteína STA ($0,05 \text{ mg mL}^{-1} / 1 \text{ h}$) para a imobilização desta na superfície do eletrodo.

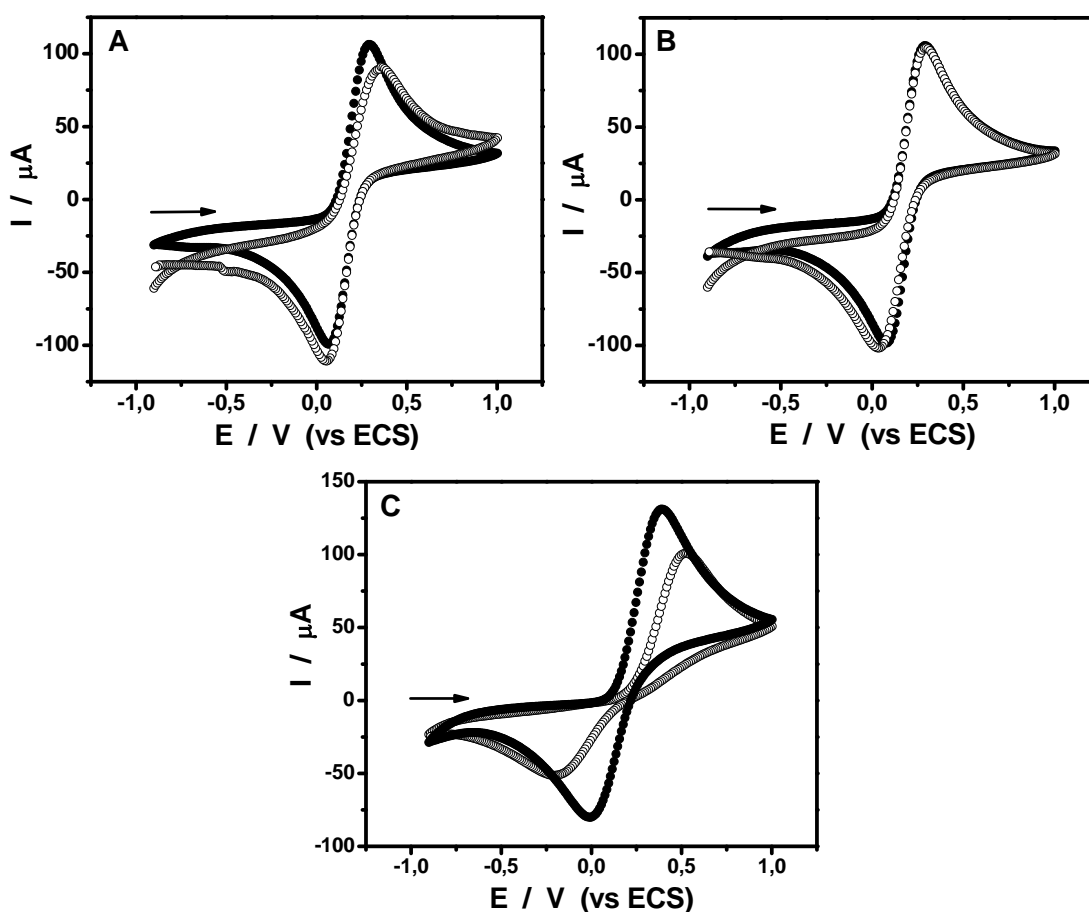


Figura 27 - Voltamogramas cíclicos em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $K_4Fe(CN)_6$ do eletrodo de carbono impresso, (A) oxidado em solução ácida de $K_2Cr_2O_7$ e (B) não oxidado, (●) antes e (○) após a incubação com STA. (C) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $K_4Fe(CN)_6$ (○) antes e (●) após a oxidação, porém sem o pré tratamento em solução saturada de Na_2CO_3 . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Após a incubação, a modificação da superfície do eletrodo de carbono foi avaliada registrando-se um voltamograma cíclico em solução contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$, antes e após a imobilização da STA. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 27A. Os resultados demonstram que o processo prévio de oxidação eletroquímica é adequado para a imobilização da STA, visto que pôde-se observar um recobrimento da superfície de 15,6 % indicando a viabilidade desta metodologia para a modificação do eletrodo de carbono impresso.

Como maneira de reforçar a importância do pré tratamento em solução de carbonato de sódio e da oxidação prévia da superfície foram realizados dois estudos: (1) incubação do eletrodo de carbono, somente pré tratado em solução de carbonato de sódio, em solução de STA, e (2) incubação do eletrodo de carbono, apenas oxidado e sem pré tratamento, em solução de STA.

Primeiramente o eletrodo de carbono impresso, após pré-tratamento e não submetido ao processo de oxidação superficial, foi incubado em solução contendo a proteína STA. Então registrou-se voltamogramas cíclicos antes e após a incubação, os quais são apresentados na Figura 27B. Os resultados obtidos demonstram que somente o pré-tratamento em solução de carbonato de sódio não é suficiente para geração de grupos carboxílicos na superfície do eletrodo, o que pôde ser observado pela falta de deformação do voltamograma cíclico registrado após a incubação do eletrodo de carbono em solução de STA. Com base nestes resultados consegue-se inferir também que não está ocorrendo a adsorção da STA na superfície do eletrodo, e, portanto, o recobrimento da superfície observado na Fig. 27.A é devido somente a formação de ligações covalentes entre os grupamentos carboxílicos presentes na superfície do eletrodo e os grupos amina da proteína.

Em seguida, avaliou-se a necessidade da realização do pré-tratamento em solução saturada de carbonato de sódio. Visto que a oxidação da superfície poderia ser suficiente para promover a melhora dos processos de transferência eletrônica e funcionalizar a superfície do eletrodo de carbono com os grupamentos carboxílicos. Sendo assim, o eletrodo de carbono impresso foi oxidado, sem a realização do pré-tratamento prévio. Então, registrou-se voltamogramas cíclicos em solução contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ antes e após a oxidação em solução ácida de dicromato de potássio. Os resultados obtidos, apresentados na Figura 27C, comprovam a importância do pré-tratamento com carbonato de sódio, visto que a oxidação da superfície não promoveu uma melhora dos processos de transferência eletrônica tão significativa quanto àquela observada após o pré tratamento. Fato que pode ser observado

pelos valores de ΔE_p de 400 e 250 mV para os eletrodos oxidado e pré tratado com carbonato, respectivamente.

Portanto, conclui-se que ambos os procedimentos são fundamentais para a construção do genossensor. O pré tratamento em solução de carbonato de sódio para a melhoria dos processos de transferência eletrônica, com conseqüente melhora da resposta eletroquímica do genossensor. E o processo de oxidação superficial para geração dos grupamentos carboxílicos superficiais viabilizando, assim a modificação da superfície do eletrodo e construção do genossensor.

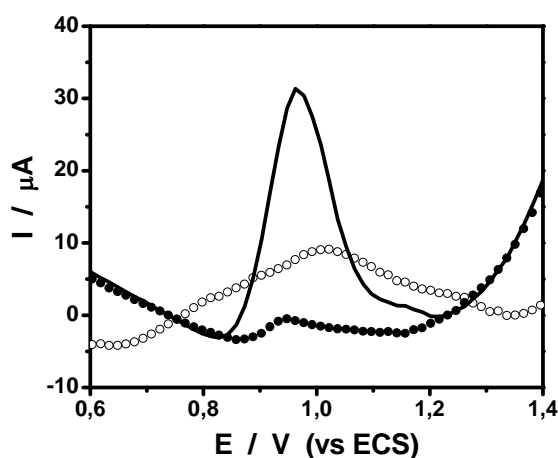


Figura 28 - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso em (●) solução tampão fosfato, (—) solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de guanosina 5'-monofosfato solubilizada em solução tampão fosfato e (○) do eletrodo de carbono modificado com a sonda via interação STA-biotina em meio de solução tampão fosfato. $\nu = 200 \text{ Hz}$, $\Delta E = 15 \text{ mV}$, $\alpha = 40 \text{ mV}$.

Concluídos os estudos de modificação da superfície do eletrodo de carbono com a STA, procedeu-se a imobilização da sonda de DNA. A sonda de DNA utilizada, por possuir uma molécula de biotina ligada em sua extremidade 5' foi imobilizada via interação biotina/STA. Sendo assim, o eletrodo de carbono impresso modificado com a proteína STA foi incubado em solução contendo a sonda de DNA ($75 \mu\text{g mL}^{-1} / 1 \text{ h}$). Em seguida, registrou-se, um voltamograma de onda quadrada do eletrodo modificado com a sonda, para avaliação da oxidação da guanina presente na fita de DNA. Observa-se, a partir dos voltamogramas apresentados na Figura 28 que a oxidação do DNA ocorre em potencial igual a 1,01 V, o qual é correspondente à oxidação da base nitrogenada guanina. Nota-se a ocorrência de um leve deslocamento no potencial de oxidação da base e também um alargamento no pico, quando comparado a oxidação da guanosina 5' monofosfato, fatos decorrentes da modificação da

superfície do eletrodo com as moléculas biológicas, o que dificulta os processos de transferência eletrônica.

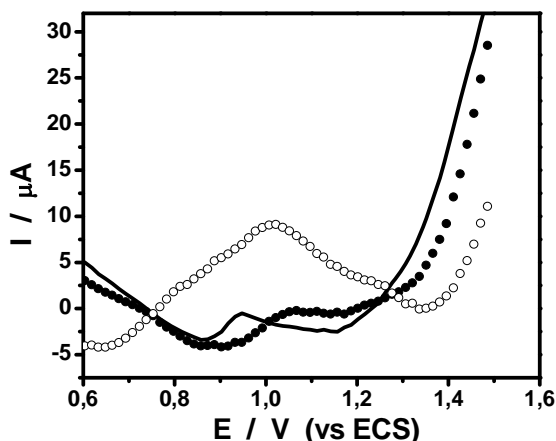


Figura 29 - Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo do carbono impresso modificado com STA em solução tampão fosfato, incubado com (○) a sonda de DNA, (●) a sequência complementar e sem sonda e (-) somente modificado com STA. $v = 200$ Hz, $\Delta E = 15$ mV, $\alpha = 40$ mV.

Imobilizada a sonda de DNA avaliou-se a possibilidade de interação entre a sequência de DNA complementar à sonda de HCV1 utilizada, com as moléculas biológicas imobilizadas e também com a superfície do eletrodo de carbono. O eletrodo de carbono impresso modificado com STA foi, então, incubado em solução $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ da sequência complementar por 1 h. Em seguida, registrou-se o voltamograma de onda quadrada, o qual está apresentado na Figura 29. Observou-se que não houve interação inespecífica entre a fita de DNA complementar e a STA imobilizada na superfície do eletrodo, visto que o voltamograma registrado não apresentou nenhum processo de oxidação em potencial próximo de 1,0 V. Não havendo, inclusive a adsorção da STA na superfície do eletrodo de carbono. Diante disso, o genossensor em estudo pode ser utilizado no diagnóstico sem riscos de resultados falsos positivos, ocasionados pela interação de sequências inespecíficas com as moléculas biológicas imobilizadas na superfície do eletrodo de carbono.

2.3. Otimização das condições para funcionalização do eletrodo de carbono impresso

A sensibilidade da metodologia em estudo é dependente da intensidade de corrente de oxidação da guanina, visto que após a hibridização esta diminuiu. A diminuição ocorre devido ao fato das bases nitrogenadas estarem ligadas entre si (Figura 30) e dispostas na região central da molécula. Desta forma, os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada,

assim como a concentração e o tempo de incubação da STA e da sonda de DNA foram avaliados, de maneira que a intensidade da corrente de oxidação fosse a maior possível.

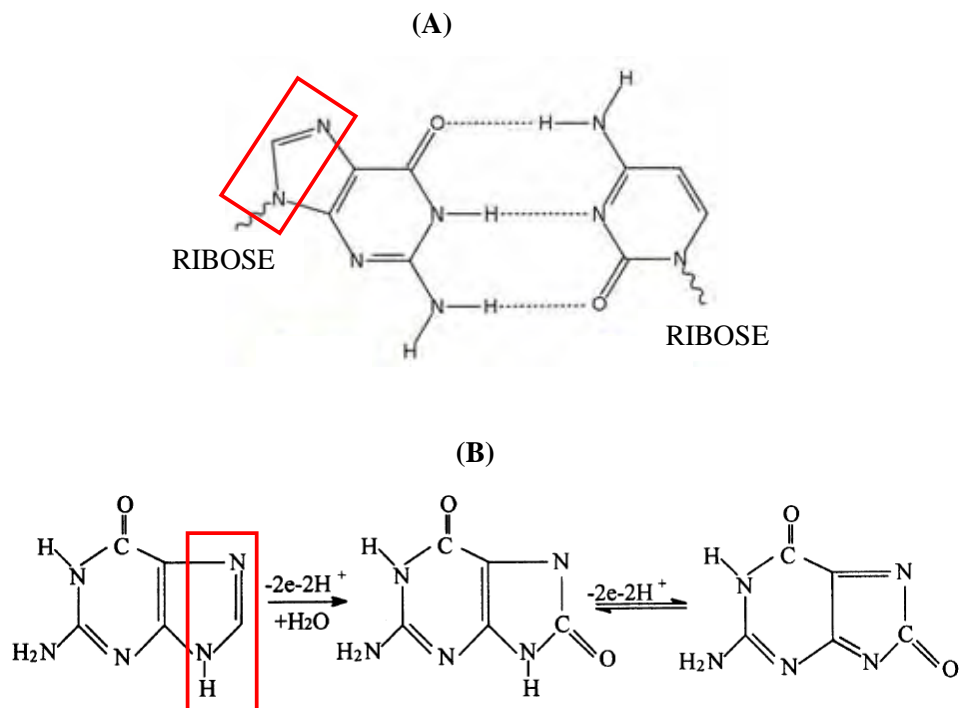


Figura 30: (A) Pareamento entre as bases nitrogenadas guanina e citosina. (B) Reação de oxidação da base nitrogenada guanina. (MARQUES, 2009)

Primeiramente os parâmetros da técnica, frequência (ν), amplitude (α) e incremento de potencial (ΔE), foram otimizados utilizando-se uma solução de guanosina 5'-monofosfato $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e como eletrólito suporte solução tampão fosfato. Desta forma, fixou-se dois dos parâmetros e variou-se o terceiro. As medidas foram realizadas em triplicata, e os resultados são apresentados na Figura 31.

Os valores nos quais se observou a maior intensidade de corrente de oxidação da guanosina foram: 250 Hz, 16 mV e 55 mV para a frequência (ν), o incremento de potencial (ΔE) e a amplitude (α), respectivamente. Estes valores foram adotados para o prosseguimento do trabalho.

Posteriormente, as condições para a imobilização da STA e da sonda de DNA na superfície do eletrodo, tais como, concentração e tempo de incubação, foram otimizadas por meio de um planejamento fatorial do tipo 2^n . Os resultados encontrados são mostrados na Figura 32.A.

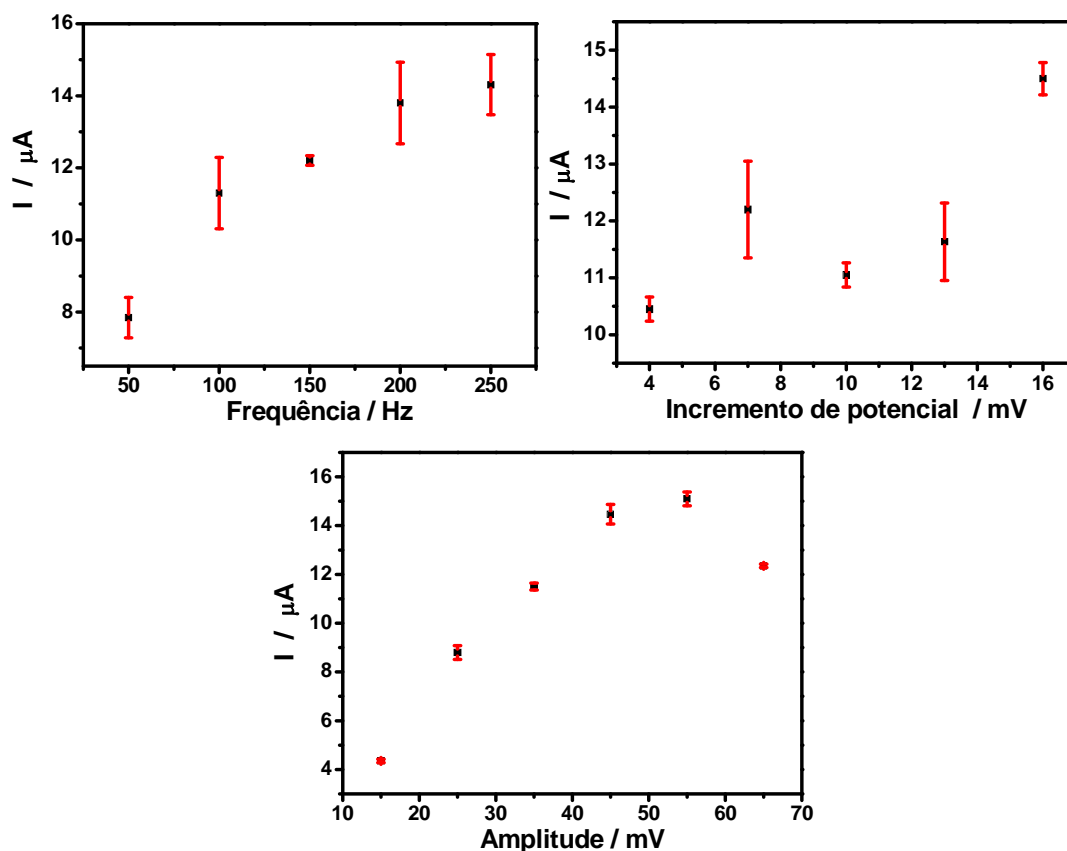


Figura 31 - Resultados referentes à otimização dos parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada.

Observou-se como melhores condições para a modificação da superfície do eletrodo as seguintes: solução de STA $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ com tempo de incubação de 30 minutos, e solução de sonda $75 \mu\text{g L}^{-1}$ com tempo de incubação de 30 minutos. A partir dos resultados da Figura 32A nota-se que a variação do valor da intensidade de corrente de oxidação da guanina nos tempos de incubação estudados para imobilização da sonda de DNA não foi significativa. Na Figura 32B observa-se que o fator que possui maior influência na resposta do sensor é a concentração de STA utilizada. Sendo assim, optou-se por realizar um novo planejamento fatorial do tipo 2^n diminuindo os tempos de incubação, tanto da STA como da sonda de DNA, para uma melhor avaliação das condições de construção do genossensor. Observou-se que, para a incubação da STA, a diferença entre a corrente encontrada para o tempo de 30 e de 15 minutos não foi significativa. Enquanto que, tratando-se do tempo de incubação da sonda de DNA, o tempo de 15 minutos mostrou-se mais adequado, visto que a corrente de oxidação observada foi significativamente maior (Fig. 32C). Sendo assim, optou-se por utilizar o tempo de 15 minutos tanto para a incubação da STA quanto para a sonda de DNA.

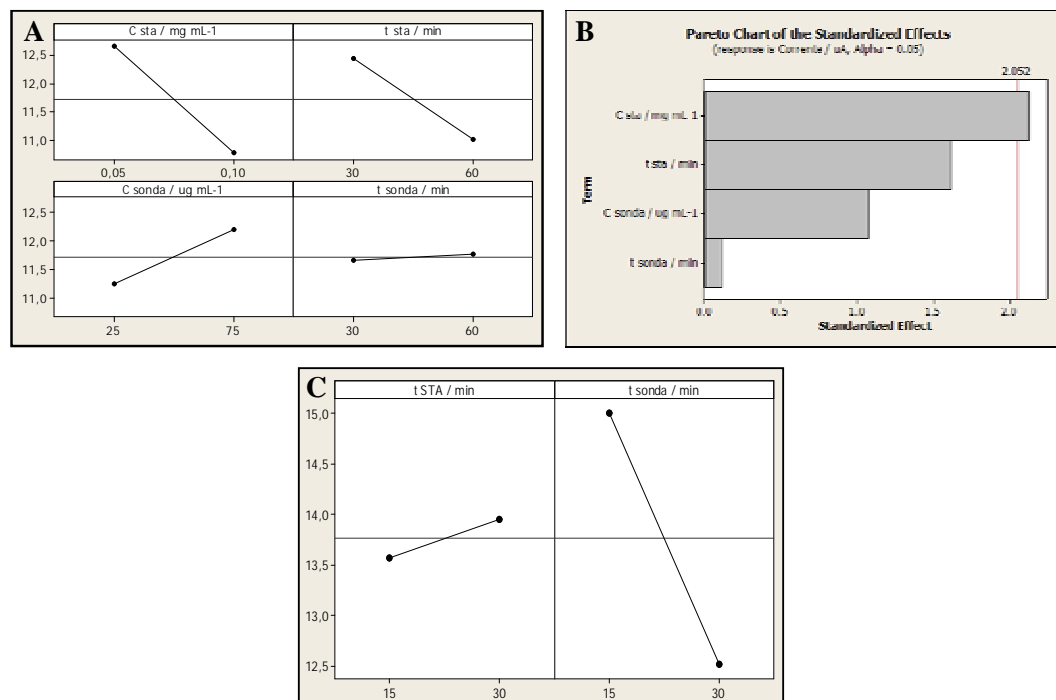


Figura 32 - Otimização das condições para imobilização da sonda de DNA na superfície do eletrodo impresso de grafite. (A) e (C) Tendência para os níveis alto e baixo de cada uma das variáveis. (B) Diagrama de pareto mostrando os efeitos da concentração e do tempo de incubação da STA e da sonda de captura na resposta do eletrodo modificado. C_{STA} = concentração de estreptavidina, C_{sonda} = concentração da sonda de captura, t_{STA} = tempo de incubação da estreptavidina e t_{sonda} = tempo de incubação da sonda de captura.

As etapas de modificação do eletrodo de carbono impresso para a construção do genossensor também foram avaliadas por meio de IV-DRFTS. Este estudo foi realizado com eletrodos de carbono nas diversas etapas de modificação. Procedeu-se, então, a estudo da etapa de imobilização da STA no eletrodo anodizado em solução saturada de Na₂CO₃. Para isto, avaliou-se eletrodos de carbono incubados em solução 0,05 e 0,10 mg mL⁻¹ de STA.

Na Figura 33.a são observadas bandas de deformação axial de NH₃ entre 3100-2600 cm⁻¹, estendidas até cerca de 2000 cm⁻¹ devido a bandas múltiplas de combinação e harmônicos. Na região de harmônicos observa-se uma banda proeminente entre 2222 e 2000 cm⁻¹, atribuída a uma combinação das vibrações de deformação angular assimétrica e de oscilação de torção do grupo NH₃⁺. Entre 1660 e 1610 cm⁻¹ é observada uma banda de deformação angular assimétrica de NH₃⁺ e entre 1150 e 1485 cm⁻¹ uma banda de deformação angular simétrica. Também são observadas bandas de deformações axiais assimétrica e simétrica de C(=O)₂ entre 1600-1590 cm⁻¹. Essas bandas provêm das deformações axiais assimétrica e simétrica de C(=O)₂ respectivamente. Na Figura 33.b também são observadas as mesmas bandas, porém com uma intensidade menor. Os espectros obtidos e apresentados na

Figura 33 comprovam a presença da proteína STA na superfície do eletrodo após a incubação (SILVERSTEIN, 1994).

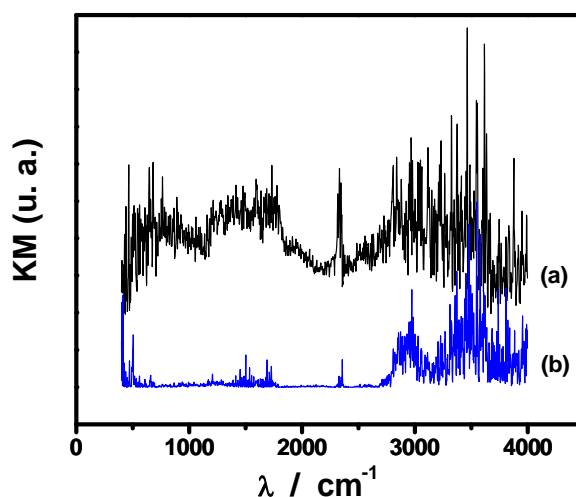


Figura 33: Espectro vibracional na região do infravermelho (IV-DRIFTS) do eletrodo de carbono impresso anodizado em solução saturada de Na_2CO_3 e oxidado em solução ácida de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ e após a incubação em solução de STA (b) $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e (a) $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$.

O espectro da Fig. 33.b é referente ao eletrodo incubado em solução de STA mais concentrada e quando comparado ao espectro da Fig. 33.a, observa-se que quanto maior a concentração de STA na solução de incubação, menor é a intensidade das bandas observadas. Nos experimentos de otimização das etapas de construção do genossensor observou-se que quanto maior a concentração de STA na solução de incubação menor o sinal de oxidação da sonda imobilizada na etapa seguinte. Tal fato pode estar relacionado ao aumento das interações intermoleculares que ocorre com o aumento da concentração, dificultando assim, a difusão das moléculas de STA até a superfície para reação com os grupamentos carboxílicos ativados. Sendo assim, os resultados de espectroscopia vibracional corroboram aqueles obtidos anteriormente por planejamento fatorial, indicando que uma solução de STA menos concentrada é mais adequada para a construção do genossensor.

Prosseguiu-se a última etapa da construção do genossensor, a imobilização da sonda de DNA. Na Figura 34 são apresentados espectros vibracionais registrados para eletrodos de carbono incubados em solução $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sonda de captura durante 15 e 30 minutos.

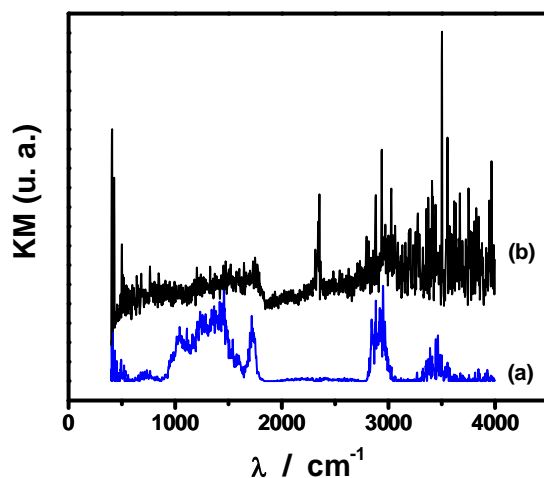


Figura 34: Espectro vibracional na região do infravermelho (IV-DRIFTS) do eletrodo de carbono impresso anodizado em solução saturada de Na_2CO_3 e oxidado em solução ácida de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, modificado com solução de STA $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ e incubado em solução de sonda de DNA por (a) 15 minutos e (b) 30 minutos.

Na Figura 34.a são observadas bandas vibracionais das bases dos nucleotídeos entre $1750\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$, bandas de vibrações do esqueleto fosfodéster-desoxirribose entre $1300\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$, bandas de vibração das ligações duplas no plano, das bases dos nucleotídeos entre $1715\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$, bandas de vibrações fracas N-H, deformações C-H das bases no plano e interações de empilhamento vertical das bases entre $1500\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$. Também são observadas bandas de estiramento assimétrico do grupo PO_2 $\sim 1240 \text{ cm}^{-1}$, bandas de estiramento simétrico dos grupos PO_2 e de vibração de estiramento CO da desoxirribose entre $1300\text{-}1000 \text{ cm}^{-1}$. E por fim, bandas de vibrações da ribose e fosfato da cadeia principal entre $1021\text{-}960 \text{ cm}^{-1}$ (KONDEPATI, 2006). O espectro vibracional observado para o eletrodo incubado em solução de sonda de DNA durante 15 minutos comprova a presença desta na superfície do eletrodo após todas as etapas de construção do genossensor.

O espectro vibracional da Fig. 34.b é referente ao eletrodo de carbono incubado na solução de sonda por 30 minutos. Neste não é possível a observação de bandas. Este fato pode ser atribuído à interação entre as fitas simples de sonda em solução ocasionando um impedimento para que estas alcancem a superfície do eletrodo adequadamente orientadas para a interação da biotina com a STA, para conseqüente imobilização da sonda. Uma outra possibilidade, seria a lixiviação das sondas da superfície do eletrodo devido ao elevado tempo de incubação. Esses resultados corroboram anteriormente relatados, indicando que o tempo mais adequado para a incubação do eletrodo na solução de sonda de DNA é de 15 minutos.

2.4. Estudo das condições para detecção do evento de hibridização

Otimizada a metodologia de construção do genossensor procedeu-se a avaliação da possibilidade de realização da detecção do processo de hibridização para posterior diagnóstico do material genético do vírus da Hepatite C. Sendo assim, o genossensor construído foi incubado em solução tampão SSC contendo a sequência complementar da sonda de DNA imobilizada na concentração de $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ por 1 h à temperatura ambiente.

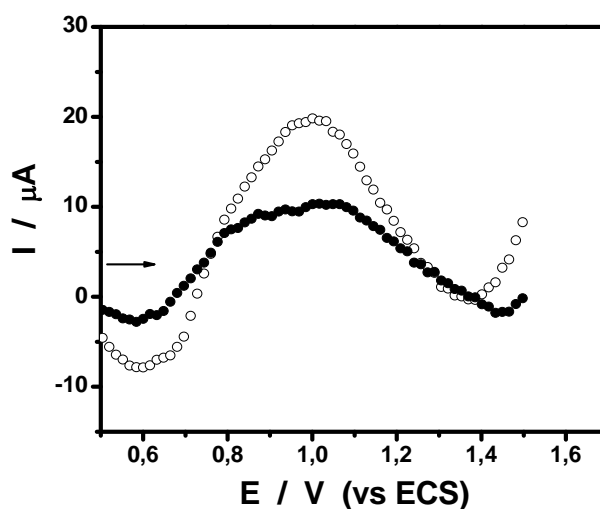


Figura 35 - Voltamograma de onda quadrada do eletrodo do carbono impresso registrado em solução tampão fosfato modificado (○) somente com a sonda de DNA e (●) com a sonda hibridizada com sua sequência complementar. $\nu = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E = 16 \text{ mV}$, $\alpha = 55 \text{ mV}$.

Os resultados obtidos, e apresentados na Figura 35, demonstraram que a metodologia desenvolvida é viável para a detecção da hibridização entre a sonda imobilizada na superfície do eletrodo e a sequência de bases complementar. Observou-se que, em potencial 1,0 V, a corrente de oxidação da base nitrogenada guanina é mais intensa quando se têm somente a sonda de DNA na superfície do eletrodo, diminuindo, aproximadamente duas vezes quando esta se encontra hibridizada com sua sequência complementar.

A diminuição da intensidade da corrente de oxidação quando o DNA encontra-se na forma de fita dupla é devida ao fato das bases estarem ligadas entre si e dispostas na região central da molécula, colaborando, desta forma, para um processo de oxidação mais difícil. Sendo assim, a intensidade de corrente é menor, em comparação com a oxidação de uma fita simples de DNA.

2.5. Avaliação da seletividade do genossensor

O comportamento do genossensor construído foi avaliado frente a sequências não complementares à sonda e, também a sequências contendo 1 e 4 bases nitrogenadas não complementares. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas neste estudo de seletividade são apresentadas na Tabela 5 da seção 1.1.4 deste capítulo. Estas sequências foram incubadas no eletrodo nas mesmas condições utilizadas para a sequência complementar. Após a incubação foram registrados os voltamogramas de onda quadrada em solução tampão fosfato. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados são apresentados na Tabela 6.

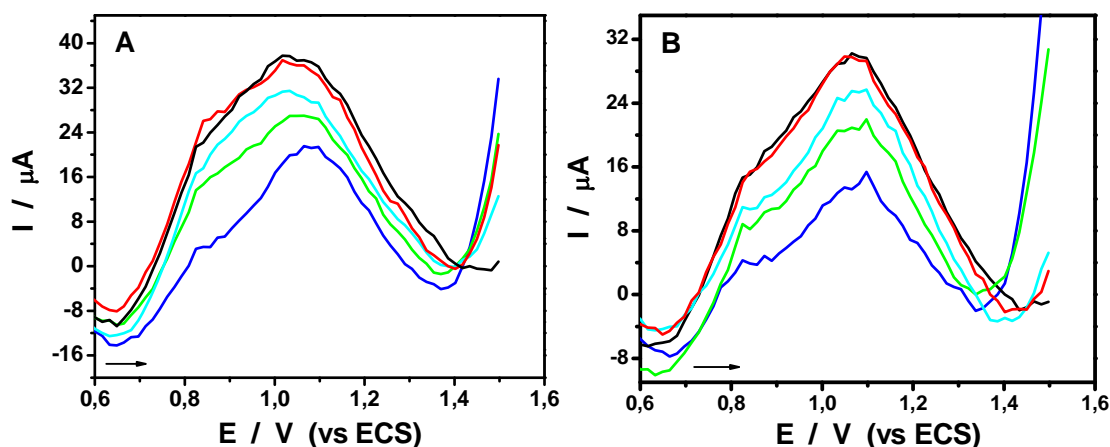


Figura 36 – Voltamogramas de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, modificado com a sonda (A) HCV3 e (B) HCV1, registrado após a incubação em solução tampão SSC contendo (—) sequência complementar; (---) sequência não complementar; (—) sequência NC1; (---) sequência NC4. (—) Voltamograma de onda quadrada do genossensor. $\nu = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV.

Os resultados obtidos, mostrados na Figura 36 e na Tabela 6, demonstram que o genossensor desenvolvido possibilita a diferenciação entre uma sequência de bases totalmente complementares e sequências não complementares, sendo possível também a distinção de sequências contendo 1 e 4 bases não complementares. Esses resultados são de grande valia, visto que o vírus em estudo possui diversos genótipos diferentes e dentro desses genótipos, subtipos diversos. Sendo assim, com a escolha adequada da sonda de captura, o sensor em estudo poderia ser aplicado em análises de genotipagem de amostras de pacientes HCV positivos.

Coinfecções pelos vírus da hepatite B (HBV) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV) são frequentes em pacientes infectados pelo HCV, pois estes possuem as mesmas formas de transmissão (PERRIN, A., 2003). Sendo assim, o genossensor foi testado também

frente a sequências utilizadas para a detecção destes dois vírus. Incubou-se o eletrodo modificado em solução tampão SSC contendo as sequências dos mencionados vírus, nas mesmas condições utilizadas para as demais sequências estudadas. Registrou-se, após o procedimento de lavagem, os voltamogramas de onda quadrada. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 – Intensidade de corrente em potencial 1,07 V do genossensor incubado com as sequências complementar e não complementar, sequências contendo 1 e 4 bases não complementares e sequências de vírus coinfectantes (HIV e HBV). n = 5

Sonda	I / μ A	
	HCV 1	HCV 3
---	30,5 \pm 0,5	36,7 \pm 0,6
Complementar	17 \pm 2	22 \pm 2
NC1	21 \pm 2	25 \pm 2
NC4	24 \pm 1	28 \pm 3
TNC	30 \pm 2	35 \pm 1
HBV / HIV	30 \pm 3	30 \pm 2

Observou-se que não houve a hibridização entre as sequências dos vírus coinfectantes e a sonda de captura, visto que a corrente de oxidação observada após a incubação foi muito semelhante à corrente de oxidação da sonda apenas. Tais resultados demonstram que o genossensor desenvolvido é capaz de reconhecer especificamente a sequência do vírus da hepatite C, pois as demais sequências estudadas, incluindo aquelas de vírus coinfectantes, apresentaram resposta distintas àquela observada para a sequência complementar.

2.6. Aplicação do genossensor desenvolvido em amostras provenientes de pacientes HCV positivos e negativos

Estabelecidas as condições ótimas para a construção do genossensor e para a detecção da oxidação da guanina, o dispositivo foi testado frente a amostras de pacientes HCV1 positivos e amostras de pacientes HCV negativos.

O cDNA, amplificado e desnaturado, recebido foi diluído e incubado nas condições descritas na seção 1.1.4 deste capítulo. Em seguida foram registradas as medidas de voltametria de onda quadrada em meio de solução tampão fosfato. Os valores de corrente obtidos para todas as amostras são apresentados na Figura 37. Analisando-se os resultados, verifica-se que em nenhuma das condições de diluição e incubação do material genético viral

foi possível a distinção entre as amostras positivas e as amostras negativas, visto que os valores de intensidade de corrente encontrados, para ambos os tipos de amostras (+ e -), foram muito semelhantes.

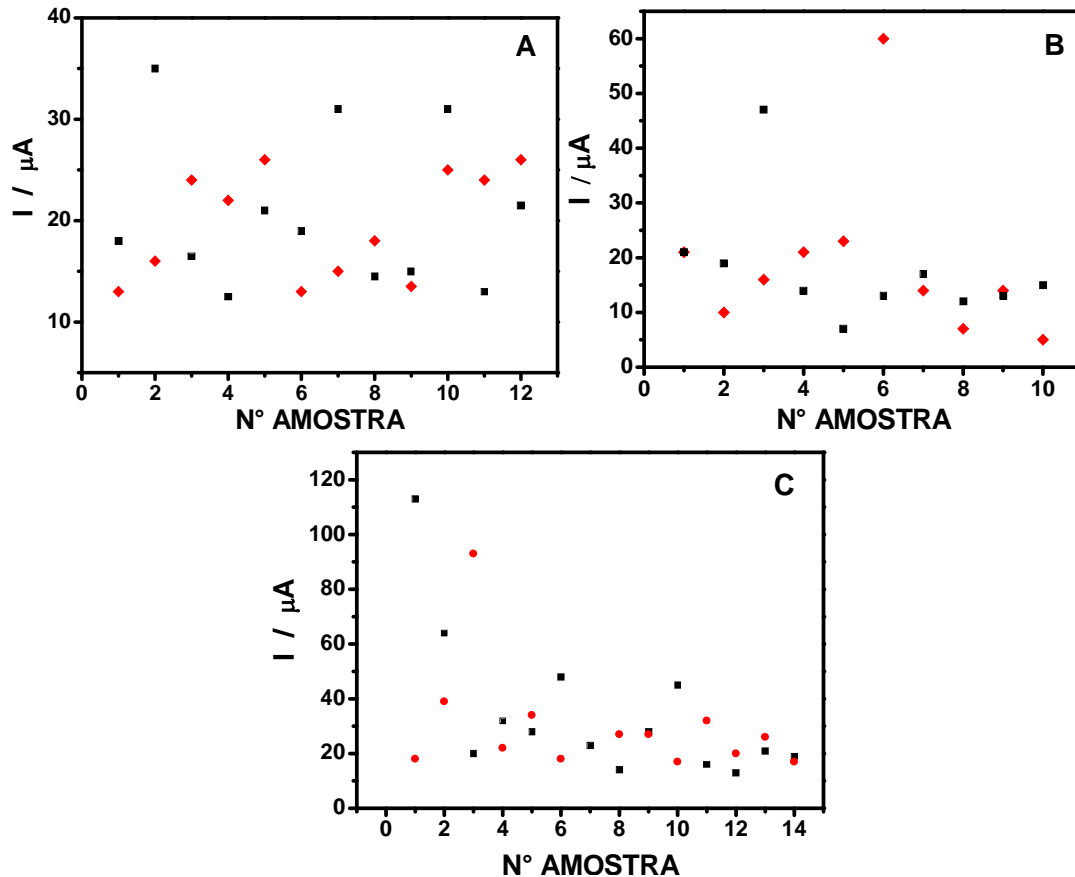


Figura 37 - Análise das amostras de pacientes (■) HCV1 positivos e (♦) HCV negativos utilizando o genossensor desenvolvido. (A) Diluição do DNA em solução tampão fosfato, (B) diluição do DNA em tampão de hibridização do kit de diagnóstico e (C) diluição do DNA em solução tampão SSC.

Visto que a metodologia foi avaliada perante a adição da sequência complementar sintética, e os resultados obtidos demonstraram sua viabilidade em distinguir o DNA fita simples do DNA hibridizado, conclui-se que o problema encontra-se na hibridização do material genético viral amplificado com a sonda de captura imobilizada na superfície do transdutor, a qual, pelos resultados observados, não está ocorrendo.

Para a confirmação de que o processo de hibridização não está ocorrendo, avaliou-se uma metodologia com detecção enzimática demonstrada por Uliana e colaboradores (ULIANA, 2008). Neste procedimento, a modificação do eletrodo foi realizada da mesma forma, assim como a incubação com o material amplificado, e após esta etapa o eletrodo foi

incubado em solução contendo a enzima HRP modificada com uma molécula de avidina (conjugado HRP-avidina). O material genético viral amplificado possui como modificação uma molécula de biotina, pois nas reações de PCR foram utilizados iniciadores marcados com esta molécula. Portanto, a hibridização poderia ser detectada por meio da oxidação enzimática do peróxido de hidrogênio a água, utilizando como mediador de elétrons o 5-ASA. Os resultados obtidos e apresentados na Figura 38 mostram que realmente o evento de hibridização não está ocorrendo, visto que a intensidade de corrente referente à redução do 5-ASA foi a mesma, tanto para as amostras positivas quanto para as amostras negativas.

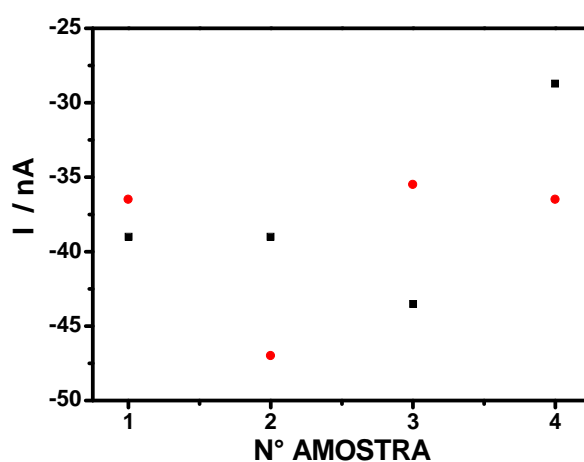


Figura 38 - Intensidade de corrente obtida para as amostras (■) HCV1 positivas e (●) negativas.

A ausência da hibridização pode estar relacionada a dois fatores: (1) a falta de complementaridade entre a sequência da sonda de DNA imobilizada e a região do genoma viral amplificado, ou (2) devido à degradação do material genético por permanecer muito tempo (~24 h para transporte) exposto à solução de desnaturação, visto que esta solução possui um pH extremamente básico (solução de NaOH com pH ~ 12).

Para a identificação e resolução do problema, optou-se por realizar também as etapas de transcrição reversa e de amplificação, ao invés de utilizar o material transportado, já amplificado. As reações de transcrição reversa e de amplificação foram conduzidas como descrito na seção 1.1.5 deste capítulo.

Após a reação de amplificação, com o objetivo de avaliar os produtos da reação de PCR, realizou-se uma eletroforese em gel de agarose do produto amplificado. A Figura 39 mostra o resultado da eletroforese. Nos resultados obtidos foi possível a observação de uma banda em tamanho próximo a 400 pb, tamanho correspondente a sequência alvo de amplificação. Nota-se, portanto, que a reação de PCR realizada foi bem sucedida.

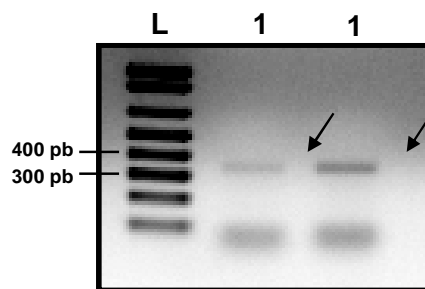


Figura 39 - 1) Eletroforese em gel de agarose 1 % do fragmento do RNA viral amplificado após síntese do cDNA. (L, ladder 1 kb).

Após a confirmação que a sequência de interesse havia sido amplificada procedeu-se a clivagem da sequência de DNA obtida por meio de digestão com uma enzima de restrição. As enzimas de restrição são enzimas que reconhecem sequências palindrômicas no DNA dupla fita e as clivam. A enzima de restrição utilizada neste trabalho foi a NheI. A sua sequência palindrômica de reconhecimento e clivagem é mostrada na Figura 40. Esta clivagem foi realizada com o objetivo de se obter como resultado final, uma sequência de DNA de tamanho em torno de 40 pb diminuindo, desta forma, os efeitos de impedimento estérico durante a etapa de hibridização com a sonda de captura. Os fragmentos liberados após clivagem com a enzima NheI são apresentados na Figura 40.

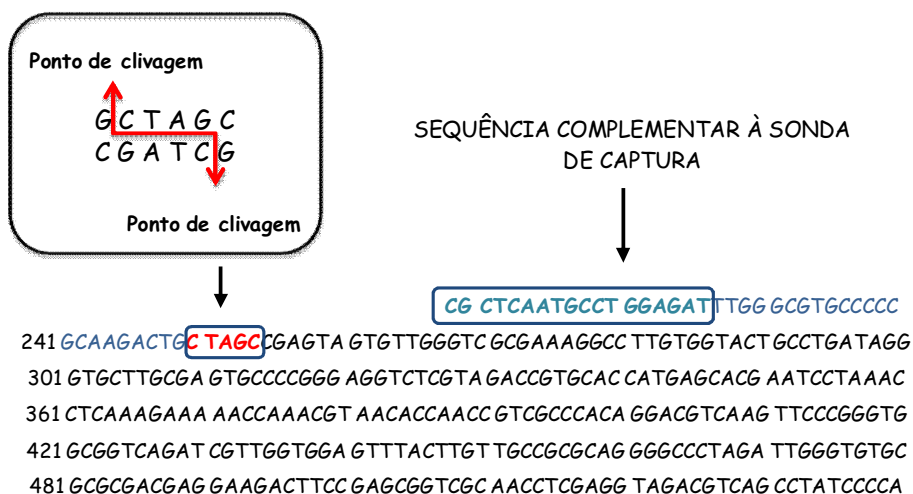


Figura 40: Sequência palindrômica de reconhecimento e clivagem da enzima NheI. Localização desta sequência no material amplificado e os fragmentos liberados após a clivagem (do autor).

O DNA dupla fita obtido foi, então, diluído em solução tampão SSC na proporção 1:100 e levado à ebulição por 5 minutos para a separação das fitas do DNA. Em seguida foi colocado em banho de gelo por 1 minuto e incubado no genossensor a

50 °C durante 1 h. Lavou-se, então, os eletrodos com solução tampão fosfato e registrou-se o voltamograma de onda quadrada, tanto para os eletrodos contendo somente a sonda imobilizada, quanto para àqueles incubados em solução de DNA amplificado.

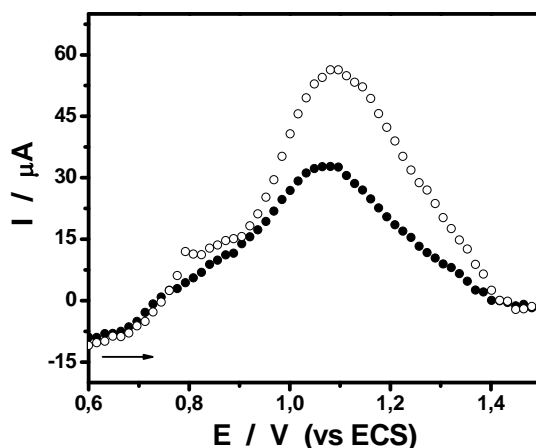


Figura 41 – Voltamogramas de onda quadrada do genossensor registrados, em solução tampão fosfato, (●) antes e (○) após o evento de hibridização com o material amplificado. $\nu = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV.

As medidas foram realizadas em triplicata e os valores de corrente de oxidação observados foram 35 ± 2 e 54 ± 2 μA para o genossensor antes e após a hibridização, respectivamente.

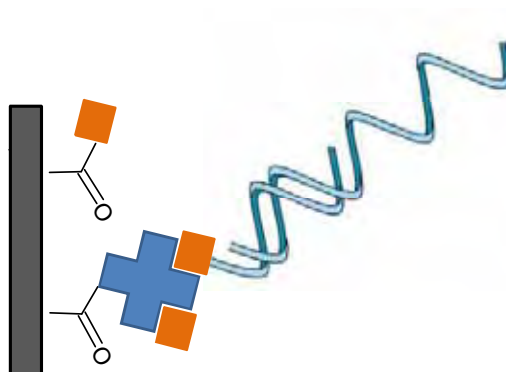


Figura 42: Diagrama esquemático do genossensor após a incubação com o material genético viral amplificado (do autor).

Pelos resultados apresentados na Figura 41 nota-se que após o evento de hibridização houve um aumento significativo na corrente de oxidação da guanina. O fragmento de DNA liberado após a digestão com a enzima de restrição *NheI* possui um tamanho de 41 pb, ou seja, é maior do que a sonda de captura imobilizada na superfície do eletrodo. O fragmento

possui, então, um maior número de bases nitrogenadas guanina para sofrer oxidação (Figura 42). Desta forma, o aumento de 20 μA na corrente de oxidação comprova a ocorrência do evento de hibridização.

Detectado o evento de hibridização, procedeu-se a transcrição reversa e amplificação de mais 5 amostras HCV positivas e 6 HCV negativas. Após a amplificação, a incubação na superfície do eletrodo foi conduzida da mesma forma que a amostra anteriormente citada. Os valores de intensidade corrente obtidos depois da incubação são apresentados na Figura 43.

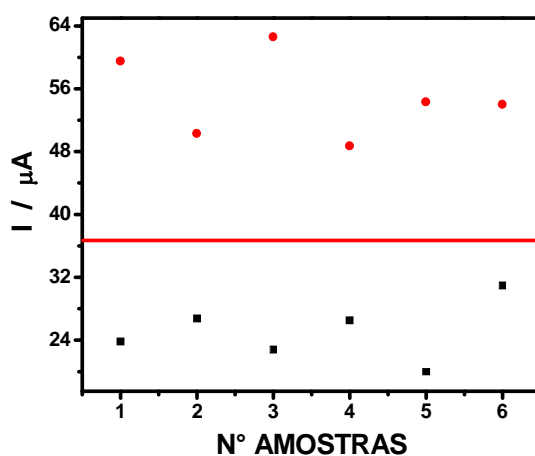


Figura 43: Valores de intensidade de corrente para as amostras HCV (●) positivas e (■) negativas, e o valor de cut-off para o genossensor construído.

Utilizando os valores de intensidade de corrente correspondentes às amostras negativas, foi possível a obtenção de um valor de 37 μA como *cut-off*. Este valor foi calculado pelo acréscimo de três vezes o valor do desvio padrão ao valor médio de intensidade de corrente das amostras negativas. O valor do *cut-off* determina quais amostras podem ser consideradas negativas e quais são positivas em uma primeira triagem. Sendo que as amostras que possuem um valor de intensidade de corrente abaixo do valor do *cut-off* são classificadas como negativas e aquelas com valor de corrente acima são classificadas como positivas (FOGUEL, 2011).

2.7. Aplicação do genossensor desenvolvido na genotipagem viral

O procedimento de genotipagem viral, em se tratando da Hepatite C, é de fundamental importância, visto que o tratamento a ser ministrado à pessoas infectada é dependente desta informação. Diante deste panorama, avaliou-se a possibilidade de realização da genotipagem viral utilizando-se o genossensor construído. Embora existam 6 genótipos virais da Hepatite

C, no Brasil a prevalência é dos genótipos 1 e 3 (RICCARDI, 2008; TEIXEIRA, 2005). Desta forma quatro amostras foram avaliadas utilizando-se sondas de captura complementares aos genótipos 1 e 3. Incubou-se o genossensor construído em solução tampão SSC contendo as amostras e seguindo o mesmo procedimento utilizado na determinação do valor de *cut-off*. As amostras foram classificadas como HCV1 ou HCV3 comparando-se o valor de intensidade de corrente observado com o valor de *cut-off* anteriormente calculado. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores médios de intensidade de corrente observados para as amostras quando incubadas no genossensor modificado com as diferentes sondas de captura. Procedimento para genotipagem viral. (n=3)

Amostra \ Sonda	I / μA	
	HCV1	HCV3
1	65	35
	46	34
2	42	30
	57	32
3	35	44
	34	56
4	25	39
	32	45

As amostras foram classificadas como HCV1 quando a intensidade de corrente observada após a incubação com o genossensor modificado com a sonda de captura para HCV1 foi igual ou superior ao valor do *cut-off*. Este mesmo procedimento foi aplicado para a classificação das amostras como HCV3. Dentre as amostras estudadas, duas puderam ser classificadas como HCV1 e as outras duas como HCV3. Os resultados observados são concludentes quanto a capacidade do genossensor construído em identificar amostras provenientes de pacientes HCV positivos do tipo 1 e 3, além de promover a realização de um diagnóstico em um tempo reduzido.

3. CONCLUSÃO PARCIAL

A modificação do eletrodo de carbono impresso para a construção do genossensor foi realizada com sucesso, visto que a utilização do genossensor construído viabilizou a detecção do evento de hibridização por meio do sinal de oxidação da base nitrogenada guanosina.

Os estudos realizados demonstraram que o genossensor construído apresenta alta seletividade, possibilitando desde a diferenciação entre sequências com poucas bases nitrogenadas não complementares até a distinção entre o vírus da Hepatite C e suas viroses coinfectantes HBV e HIV.

O genossensor desenvolvido foi aplicado com sucesso na discriminação entre amostras HCV positivas e negativas, por meio do qual foi possível a determinação do valor de *cut-off* da metodologia aplicada. O procedimento de genotipagem viral também se apresentou viável.

O genossensor desenvolvido indica ser viável no diagnóstico e genotipagem do vírus da Hepatite C, porém número maior de amostras deve ser examinado.

CAPÍTULO IV: CÉLULA DE DETECÇÃO

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

1.1. Materiais e Métodos

1.1.1. Construção da célula de detecção

O compartimento de detecção da célula microfluídica foi construído utilizando a cerâmica LTCC 951 (do inglês, *Low Temperature Co-fired Ceramic*) com espessura de 245 µm fabricada pela DuPont. O leiaute das camadas de cerâmica foi gerado em programa Auto-CAD. O desenho de cada camada foi feito de maneira que a sobreposição destas camadas resultasse em um dispositivo com geometria tridimensional. Um laser de infravermelho foi utilizado para transferir os desenhos das camadas para as fitas cerâmicas obtendo assim as estruturas desejadas (microcanais e cavidades). Em seguida foi realizada a laminação por meio de termo-compressão, a qual foi realizada utilizando uma prensa hidráulica uniaxial. As fitas de cerâmica foram, então, empilhadas e aquecidas a 80 °C por 10 minutos a uma pressão de 1000 PSI. Em seguida a pressão foi elevada até 3000-3500 PSI, ainda a 80 °C, por mais 20 minutos. Finalmente, foi realizada a queima cuidadosa do dispositivo laminado a 350 °C com uma taxa de aquecimento de 10 °C min.⁻¹, com um patamar de 10 minutos, seguida por uma sinterização a 850 °C, com a mesma taxa de aquecimento, com um patamar de 30 minutos. Este dispositivo foi construído no IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) de São Paulo pelo Dr. Mário Ricardo Góngora-Rubio.

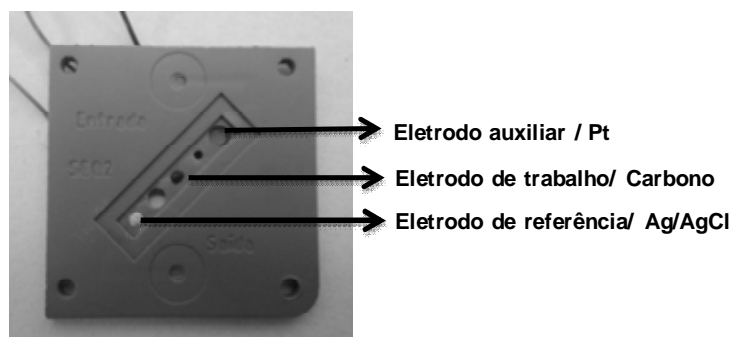


Figura 44: Fotografia da célula de detecção construída.

O dispositivo final era composto por um canal único de 3 mm de largura, 17 mm de comprimento e 0,5 mm de profundidade. Neste canal foram feitos 5 cavidades, sendo duas com 2 mm de diâmetro e as demais com 1 mm, as quais foram preenchidas com as tintas referentes aos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, como pode ser visto na Figura 44.

Após a confecção da célula, esta foi limpa com solução aquosa de EDTA $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, foram depositadas as tintas de grafite, de Ag/AgCl (R-414 DPM-68 - ERCON) e de platina (R-474 DPM-80 - ERCON) para a confecção dos eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente.

1.1.2. Metodologia de modificação dos nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono de camadas múltiplas (Sigma-Aldrich) foram empregados na modificação do eletrodo de carbono impresso depositado dentro da célula de detecção. Os nanotubos foram utilizados para promover um aumento na corrente de oxidação, visto que a área do eletrodo foi diminuída em $10 \times (0,0078 \text{ cm}^2)$ aproximadamente. Antes da sua deposição, os nanotubos foram modificados de maneira a promover a geração de grupamentos carboxílicos em sua estrutura. Esta modificação foi realizada adicionando-se os nanotubos em uma solução contendo uma mistura de HNO_3 (Sigma-Aldrich) e H_2SO_4 (J. T. Baker) na proporção 3:1. Esta mistura, juntamente com os nanotubos foi deixada em banho ultrassônico por 4 h. Em seguida foram lavados com água até pH neutro (KERMAN, 2005).

Após o procedimento de modificação os nanotubos foram suspensos em etanol (J. T. Baker) em concentração $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, sonicados por 30 minutos e $10 \mu\text{L}$ desta solução foram adicionados na superfície do eletrodo de carbono e seco em temperatura ambiente.

1.2. Instrumentação

1.2.1. Análise Voltamétrica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula convencional de três eletrodos utilizando um sistema potenciostato/galvanostato $\mu\text{Autolab}$ tipo III interfaciado a um computador. O eletrodo de referência empregado foi um eletrodo de calomelano saturado (ECS) e como eletrodo auxiliar foi utilizado um fio de platina. Como eletrodo de trabalho foi utilizado o eletrodo de carbono impresso construído, com área geométrica de $0,071 \text{ cm}^2$.

As medidas eletroquímicas dentro da célula de detecção foram realizadas utilizando o mesmo sistema potenciostato/gavanostato. Os eletrodos componentes da célula de detecção foram confeccionados com as tintas condutoras, tinta de grafite (G 449 I - ERCON), tinta de Ag/AgCl (R – 414-DPM 68 – ERCON) e tinta de platina (R – 474-DPM 80 – ERCON).

Os processos de transferência de carga foram avaliados por meio de medidas de voltametria cíclica em janela de potencial de -0,9 a 1,0 V com velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. A oxidação da base nitrogenada guanina foi monitorada em meio de solução tampão fosfato por meio da técnica de voltametria de onda quadrada em janela de potencial de 0,2 e 1,5 V. Os valores de incremento de potencial, frequência e amplitude de pulso utilizados foram 16mV, 250 Hz e 55 mV, respectivamente.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Construção e caracterização eletroquímica dos eletrodos de platina e Ag/AgCl

Os ensaios preliminares da célula foram realizados construindo-se os eletrodos de trabalho, referência e auxiliar sobre a cerâmica LTCC. Primeiramente os substratos de LTCC foram limpos em solução de EDTA, sob agitação constante, por 20 h, devido à presença de chumbo na cerâmica. A solução foi trocada a cada 1 h, permanecendo, durante a noite, a mesma solução.

Em seguida, realizou-se a deposição da tinta de carbono sobre a cerâmica utilizando a mesma metodologia de deposição sobre alumina (descrita na seção 3.1.1 do Cap. 2). Imergiu-se, então, o eletrodo de carbono impresso em uma solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, utilizando como eletrólito suporte solução tampão fosfato, e registrou-se medidas de voltametria cíclica. Os voltamogramas obtidos são apresentados na Figura 45A.

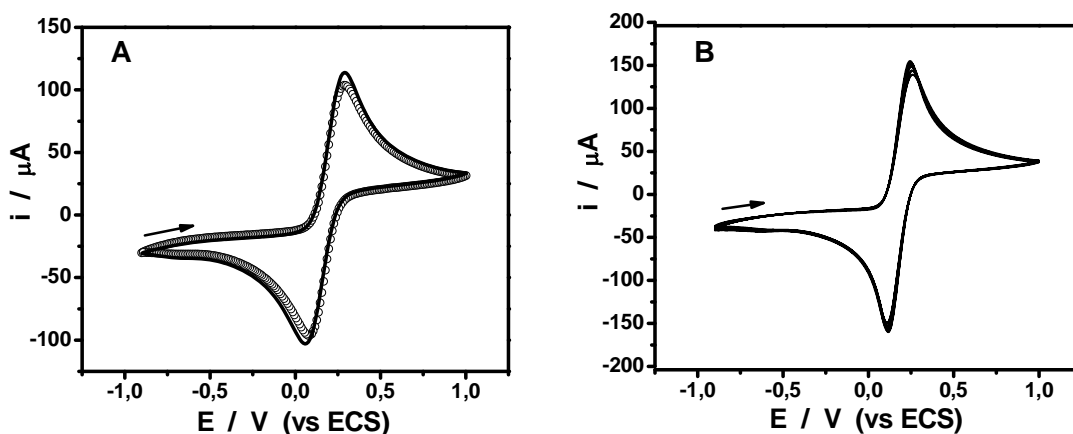


Figura 45 - (A) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono impresso construído sobre substrato de (○) alumina e (—) LTCC, registrados em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$. (B) Avaliação da repetibilidade dos eletrodos de carbono impressos construídos com LTCC. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. $n = 10$

Os voltamogramas cíclicos da Figura 45A demonstram que o comportamento eletroquímico da tinta de carbono não se altera quando esta é depositada sobre o substrato de LTCC. Em seguida, avaliou-se a repetibilidade destes eletrodos de carbono, registrando-se medidas de voltametria cíclica, em solução contendo o par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, para 10 eletrodos diferentes construídos sob as mesmas condições. Os resultados obtidos e apresentados na Figura 45B, demonstraram uma alta repetibilidade destes eletrodos, visto que o desvio padrão relativo (RSD) das correntes de pico anódicas foi de 1,06 %.

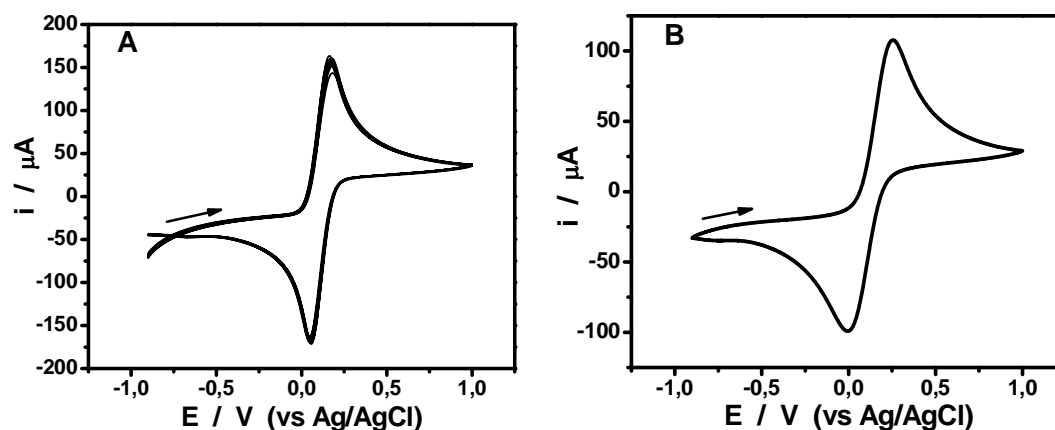


Figura 46 - Voltamogramas cíclicos registrados em solução 1×10^{-2} mol L⁻¹ de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ utilizando uma célula composta por (A) eletrodo de carbono vítreo, fio de platina e eletrodo impresso de Ag/AgCl, (B) eletrodos impressos de carbono, platina e Ag/AgCl, como eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, respectivamente. $v = 50$ mV s⁻¹.

Devido à impossibilidade de inserção dos eletrodos auxiliar e de referência à célula construída, também foram confeccionados eletrodos utilizando-se tinta de platina e de Ag/AgCl. Essas tintas foram depositadas em substrato de LTCC seguindo o mesmo procedimento da tinta de grafite, sendo a área do eletrodo de platina (0,031 cm²) a única diferença.

Construiu-se, então, 10 eletrodos de platina e mais 10 eletrodos de Ag/AgCl. Estes foram avaliados em célula eletroquímica contendo os demais eletrodos convencionais. Os eletrodos de platina demonstraram um bom funcionamento sem a necessidade de aplicação de nenhum tipo de tratamento prévio para ativação da tinta. Para os eletrodos de Ag/AgCl também foi observado um bom funcionamento (Figura 46A), o qual pôde ser confirmado por meio da diferença de 50 mV entre o pico de oxidação (e redução) do par $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ quando utilizado como referência o eletrodo de calomelano saturado.

Após a confirmação do bom funcionamento dos eletrodos confeccionados com as tintas, realizaram-se medidas de voltametria cíclica em célula eletroquímica contendo os três eletrodos impressos com tinta. Os resultados obtidos e apresentados na Figura 46.B, demonstram o perfeito funcionamento das tintas em conjunto, estando estas aptas a serem utilizadas nas próximas etapas do trabalho.

2.2. Caracterização eletroquímica da célula de detecção

Em seguida as tintas foram depositadas nos orifícios da célula de detecção construída em LTCC. O procedimento utilizado no preenchimento dos orifícios foi o mesmo de

deposição das tintas nos substratos. Inseriu-se na célula uma solução de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ e realizou-se medidas de voltametria cíclica. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 47.

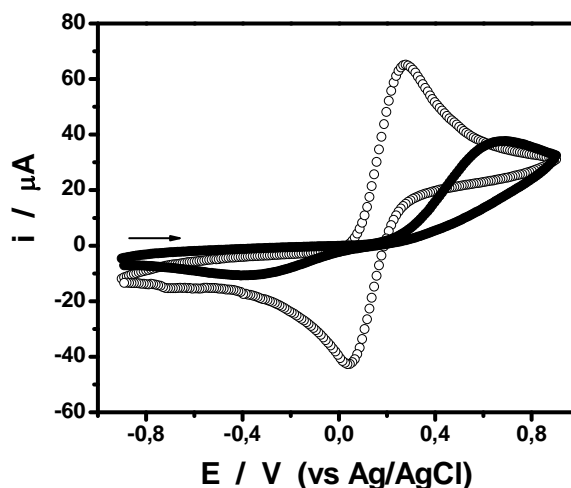


Figura 47 - Voltamograma cíclico registrado na célula de detecção contendo os três eletrodos de tinta em solução $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (●) antes e (○) após o processo de anodização. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se, pelos resultados encontrados, que a transferência eletrônica, assim como nos eletrodos construídos em substrato de alumina, também está sendo influenciada pela composição da tinta e pelos processos de cura. Portanto, inseriu-se, na célula, uma solução de carbonato de sódio saturada para a anodização do eletrodo de trabalho. Observou-se que o tratamento eletroquímico da superfície utilizado na ativação da tinta de carbono pôde ser realizado na célula com sucesso. Nota-se também o perfeito funcionamento dos eletrodos depositados na célula de detecção, indicando a funcionalidade da célula em si.

2.3. Construção do genossensor na célula de detecção

Após a avaliação do procedimento de ativação da tinta de carbono na célula, estudou-se a possibilidade de detecção da oxidação da guanosina 5' monofosfato. Desta forma, inseriu-se na célula uma solução de guanosina 5' monofosfato $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e registrou-se voltamogramas de onda quadrada. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 48. Observa-se que a intensidade da corrente de oxidação da guanosina, na célula, apresentou-se 4x menor que no eletrodo construído em alumina, devido à diminuição das dimensões do eletrodo de trabalho. Porém mesmo assim foi possível a visualização da oxidação da

guanosina, indicando uma possibilidade de detecção do evento de hibridização após a imobilização da sonda de captura.

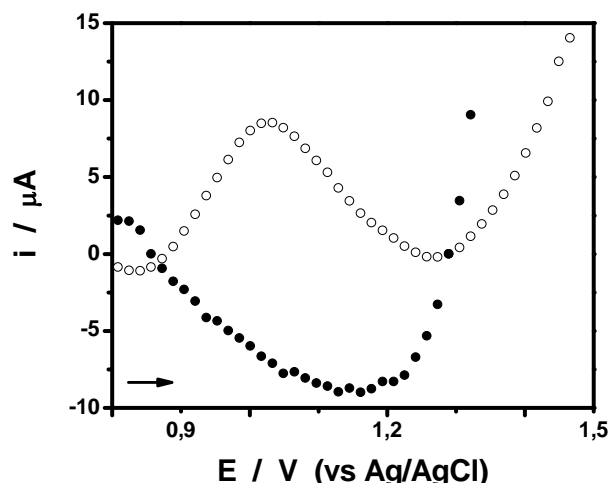


Figura 48 – Voltamogramas de onda quadrada da célula de detecção registrados em (●) solução tampão fosfato e em (○) solução de guanosina 5' monofosfato 0,5 mmol L⁻¹. $\nu = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV.

Em seguida, procedeu-se a imobilização da sonda de captura na superfície do eletrodo. Para que fosse possível a modificação da superfície do eletrodo, esta, primeiramente foi submetida ao pré tratamento em solução saturada de carbonato de sódio. Durante a realização deste procedimento em diferentes células observou-se uma sobrecarga durante as medidas na maioria delas. Ao medir a condutividade das tintas depositadas nos orifícios da célula, utilizando-se um multímetro, constatou-se que a tinta de platina não estava conduzindo corrente elétrica. Devido ao comportamento isolante da tinta de platina, esta foi substituída pela tinta de carbono para a confecção do eletrodo auxiliar.

Substituída a tinta de platina, procedeu-se a imobilização da sonda de captura na superfície do eletrodo de carbono. O procedimento de imobilização da sonda inclui uma etapa de oxidação da superfície em solução ácida de dicromato de potássio. Quando inserida esta solução na célula de detecção o eletrodo de referência (Ag/AgCl) reagiu com a solução, havendo formação de óxido de prata. Observou-se, portanto, a necessidade de mudar a metodologia de inserção de grupamentos carboxílicos na superfície do eletrodo. Visando solucionar esta problemática juntamente com o inconveniente da diminuição da intensidade de corrente de oxidação da guanosina devido a menor área do eletrodo de trabalho, optou-se por utilizar nanotubos funcionalizados com grupamentos carboxílicos para a modificação da superfície do eletrodo de carbono.

Desta forma, a funcionalização dos nanotubos foi realizada como descrito na seção do procedimento experimental, e em seguida estes foram suspensos em etanol. Na superfície do eletrodo foram adicionados 10 μL desta suspensão. Após a adição o eletrodo foi seco ao ar. Então, os grupamentos carboxílicos foram ativados pela incubação em solução contendo uma mistura de ECD/NHS. Em seguida a proteína STA e a sonda de captura foram imobilizadas. Os grupamentos carboxílicos remanescentes foram bloqueados incubando-se o eletrodo em solução de biotina.

Imobilizada a sonda de captura procedeu-se a sua oxidação. Registrou-se voltamogramas de onda quadrada, os quais são apresentados na Figura 49. Observa-se que foi possível a identificação da oxidação das bases nitrogenadas guanina presentes na sonda de captura.

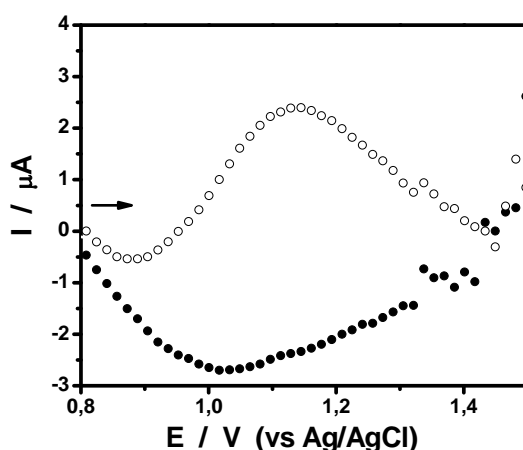


Figura 49: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, depositado dentro da célula de detecção, (●) limpo e (○) modificado com a sonda de captura, em solução tampão fosfato. $\nu = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV.

Em seguida procedeu-se a incubação do genossensor em solução contendo a sequência complementar à sequência da sonda de captura. Registrou-se um voltamograma de onda quadrada, apresentado na Figura 50, no qual, observou-se, após a incubação, uma diminuição da intensidade de corrente, demonstrando a viabilidade da detecção do material genético viral utilizando a célula de detecção em estudo.

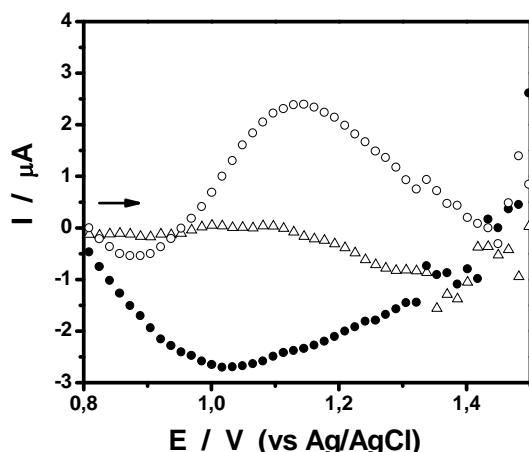


Figura 50: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, depositado dentro da célula de detecção, (●) limpo, (○) modificado com a sonda de captura e (Δ) modificado com a sonda e incubado em solução contendo a sequência complementar, em solução tampão fosfato. $\nu = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV.

Em seguida, assim como avaliado para o genossensor construído em substrato de alumina, estudou-se a seletividade do genossensor construído dentro na célula de detecção. O genossensor construído com a sonda de captura para o genótipo 1 do vírus da hepatite C foi, então, incubado em solução contendo a sequência complementar ao genótipo 3. Após a incubação foram registrados voltamogramas de onda quadrada, os quais são mostrados na Figura 51.

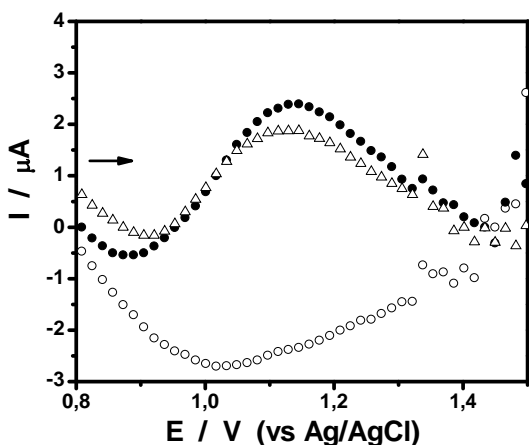


Figura 51: Voltamograma de onda quadrada do eletrodo de carbono impresso, depositado dentro da célula de detecção, (○) limpo, (●) modificado com a sonda de captura HCV1 e (Δ) modificado com a sonda HCV1 e incubado em solução contendo a sequência complementar HCV3, em solução tampão fosfato. $\nu = 250$ Hz, $\Delta E = 16$ mV, $\alpha = 55$ mV.

No intuito de se fazer uma melhor análise da seletividade do genossensor construído dentro da célula de detecção, este também foi incubado em solução contendo sequências utilizadas no diagnóstico de HIV e HBV. Estas sequências foram avaliadas, pois estas viroses são co-infectantes do HCV por possuírem as mesmas formas de transmissão (PERRIN, 2003).

Após o procedimento de incubação foram registrados voltamogramas de onda quadrada, e os valores de intensidade de corrente de oxidação da guanina são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Intensidade de corrente em potencial 1,13 V do genossensor construído dentro da célula de detecção e incubado com as sequências complementar HCV1 e HCV3 e com as sequências de vírus coinfecantes (HIV e HBV).

		I / μA
Sequência	Sonda	HCV 1
---		2,41
Complementar		0,00
Complementar HCV3		1,90
HBV / HIV		1,50

Observando-se os valores de intensidade de corrente de oxidação apresentados na Tabela 8, nota-se que o genossensor construído na célula de detecção é seletivo para a identificação da sequência nucleotídica proveniente do vírus da Hepatite C. Estes resultados demonstram a viabilidade de se realizar o diagnóstico utilizando-se o dispositivo desenvolvido.

3. CONCLUSÃO PARCIAL

Demonstrou-se a viabilidade de construção do genossensor para diagnóstico e genotipagem de Hepatite C dentro da célula de detecção.

O genossensor construído dentro da célula de detecção apresentou bom funcionamento, possibilitando o monitoramento do evento de hibridização. Assim como a distinção entre sequências HCV específicas e sequências provenientes de viroses coinfectantes.

Desta forma, a célula de detecção construída composta pelo genossensor desenvolvido apresenta-se como uma ferramenta analítica promissora para o desenvolvimento de dispositivos a serem utilizados em análises de diagnóstico “*in situ*”.

4. CONCLUSÃO FINAL

O eletrodo de carbono impresso construído manualmente demonstrou um perfeito funcionamento e uma excelente repetibilidade, de tal forma que viabilizou a sua aplicação no desenvolvimento de um genossensor para o diagnóstico do HCV.

O genossensor estudado demonstrou alta seletividade e boa sensibilidade, pois possibilitou a identificação do HCV mesmo em presença de sequências referentes à viroses coinfectantes. Com o genossensor estudado foi possível a diferenciação entre amostras provenientes de pacientes HCV positivos e negativos, assim como a genotipagem das amostras classificadas como positivas.

O genossensor estudado, quando comparado aos demais biossensores de DNA, relatados na literatura e listados na Tabela 2, mostrou-se uma ferramenta analítica promissora, sendo capaz de realizar o diagnóstico e a genotipagem do HCV de maneira simples, rápida e com grandes possibilidades de miniaturização deste dispositivo para a realização de análises *in situ*.

A célula de detecção proposta viabilizou a construção do genossensor no eletrodo de trabalho miniaturizado mantendo sua eficiência e seletividade de detecção do HCV.

5. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Avaliar as melhores condições para a construção do genossensor dentro da célula de detecção para tal, otimizar a deposição dos nanotubos para a imobilização da sonda de captura e também os parâmetros da voltametria de onda quadrada que serão utilizados na detecção da hibridização.

Investigar a possibilidade de esta célula de detecção compor o sistema microfluídico que realize a transcrição reversa e a amplificação do material genético via RT-PCR.

REFERÊNCIAS

- AHOUR, F.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; HEJAZI, M. S. An electrochemical approach for direct detection and discrimination of fully match and single base mismatch double-stranded oligonucleotides corresponding to universal region of hepatitis C vírus. **Analytical Methods**, v. 4, p. 967- 972, Jan. 2012.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons, 2001. 833 p.
- BENEDETTI, A. V. **Contribuição ao estudo eletroquímico do cobre e de suas ligas com alumínio e alumínio + prata em solução aquosa de NaCl 0,5 mol dm⁻³ + HCl 10⁻³ mol dm⁻³**. 1994. 291 f. (Memorial) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1994.
- BIDAN, G. et al. Conducting polymers as a link between biomolecules and microelectronics. **Synthetic Metals**, v. 102, p. 1363-1365, June 1999.
- BIDAN, G. et al. Electropolymerization as a versatile route for immobilizing biological species onto surfaces. Application to DNA biochips. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 89, p. 183-193, Dec. 2000.
- BRABEC, V.; DRYHURST, G. Electrochemical behavior of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode. A new probe for studies of polynucleotide structure and reactions. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 89, p. 161-173, Jan. 1978.
- BRANDÃO, A. B. M. et al. Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 9, n. 3, p. 161-168, mar. 2001
- BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 366, p. 225-231, Jan. 1994.
- CHEVALIEZ, S.; PAWLOTSKI, J- M. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World Journal of Gastroentology**, v. 13, n. 17, p. 2461-2466, May 2007.
- CHOO, Q. L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, p. 359-361, Apr. 1989.
- COSTI, C. et al. Colorimetric microwell plate reverse-hybridization assay for detection and genotyping of hepatitis C virus. **Journal of Virological Methods**, v. 162, p. 75-80, July 2009.
- CUI, G. et al. Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes. **The Analyst**, v. 126, p. 1399-1403, July 2001.
- DASTAGIR, T. et al. Electrical detection of hepatitis C virus RNA on single wall carbon nanotube-field effect transistors. **Analyst**, v. 132, p. 738-740, June 2007.

- DONET, J. B. The chemical reactivity of carbons. **Carbon**, v. 6, p. 161-176, Jan. 1968.
- DREXLER, J. F. et al. A novel diagnostic target in the hepatitis C virus genome. **PLOS Medicine**, v. 6, n. 2, p. 210-220, Feb. 2009.
- DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1192-1199, Oct. 2003.
- FERREIRA, A. A. P. et al. Preparation and characterization of immunosensors for disease diagnosis. In: SERRA, A. P. (Ed.). **Biosensors for health, environment and biosecurity**. Rijeka: In Tech, 2011. Cap. 8, p. 183-214.
- FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.
- FOGUEL, M. V. et al. Amperometric immunosensor for chagas disease using gold CD-R transducer. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2555-2561, 2011.
- FRANCISCUS, A. **HCV education & support**: a brief history of hepatitis C. Version 5.1, 2010. (Hepatitis C Support Project). Disponível em: <http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/factsheets_pdf/Brief_History_HCV_10.pdf>. Acesso em: 24 jun. 2013.
- GIRAUD, G. et al. Fluorescence lifetime biosensing with DNA microarrays and a CMOS-SPAD imager. **Biomedical Optics Express**, v. 1, n. 5, p. 1302-1308, Dec. 2010.
- GLYNOU, K. et al. Oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles as probes in a dry-reagent strip biosensor for DNA analysis by hybridization. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 4155-4160, Aug. 2003.
- GORNALL, D. D.; COLLYER, S. D.; HIGSON, S. P. J. Investigations into the use of screen-printed carbon electrodes as templates for electrochemical sensors and sonochemically fabricated microelectrode arrays. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 141, p. 581-591, July 2009.
- GRETCH, D. Diagnostic tests for hepatitis C. **Hepatology**, v. 26, n. 3, p. 43S-47S, Sept. 1997.
- HARRIS, A. R. et al. Efficient strategy for quality control of screen-printed carbon ink disposable sensor electrodes based on simultaneous evaluation of resistance, capacitance and faradaic current by fourier transform AC voltammetry. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 12, p. 1301-1315, 2008.
- HEJAZI, M. S.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 399, p. 118-124, 2010.
- HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 38, p. 8916-8920, Sept. 1997.

IBANEZ-GARCIA, N. et al. Continuous flow analytical microsystems based on low-temperature co-fired ceramic technology. Integrated potentiometric detection based on solvent polymeric ion-selective electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 9, p. 2985-2992, May 2006.

KELLEY, S. O. et al. Single-base mismatch detection based on charge transduction through DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 24, p. 4830-4837, Oct. 1999.

KERMAN, K.; KOBAYASHI, M.; TAMIYA, E. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. **Measurement Science and Technology**, v. 15, p. R1-R11, Jan. 2004.

KERMAN, K. et al. *Escherichia coli* single-strand binding protein-DNA interactions on carbon nanotube-modified electrodes from a label-free electrochemical hybridization sensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1114-1121, Mar. 2005.

KIM, J. A. et al. Fabrication and characterization of a PDMS-glass hybrid continuous-flow PCR chip. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 91-97, Jan. 2006.

KINTZIOS, S. et al. The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 467-480, Sept. 2001a.

KINTZIOS, S. et al. Bioelectric recognition assay (BERA). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 325-336, June 2001b.

KONDEPATI, V. R. et al. Detection of structural disorders in pancreatic tumour DNA with Fourier-transform infrared spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 40, p. 33-39, Jan. 2006.

KONRY, T. et al. Optical fiber immunosensor based on a poly(pyrrole-benzophenone) film for the detection of antibodies to viral antigen. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 6, p. 1771-1779, Mar. 2005.

KOOP, M. U. et al. Chemical amplification: continuous-flow PCR on a chip. **Science**, v. 280, p. 1046-1048, May 1998.

LEE, S. et al. Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, p. 47-52, Apr. 2007.

LI, W. et al. Catalytic signal amplification of gold nanoparticles combining with conformation-switched hairpin DNA probe for hepatitis C virus quantification. **Chemical Communications**, v. 48, p. 7877-7879, June 2012.

LISOWSKI, L. et al. The anti-genomic (negative) strand of hepatitis C virus is not targetable by shRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 6, p. 3688-3698, Feb. 2013.

LIU, A. et al. Development of electrochemical DNA biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101-111, Aug. 2012.

- LIU, S. et al. Electrochemical detection of hepatitis C virus based on site-specific DNA cleavage of BamH1 endonuclease. **Chemical Communications**, v. 13, p. 1635-1637, Apr. 2009.
- LOZACH, P. Y. et al. DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 22, p. 20358-20366, May 2003.
- LUCARELLI, F. et al. Electrochemical DNA biosensor for analysis of wastewater samples. **Bioelectrochemistry**, v. 58, p. 113-118, Jan. 2002.
- LUO, X.; HSING, I-M. Electrochemical techniques on sequence-specific PCR amplicon detection for point-of-care applications. **Analyst**, v. 134, p. 1957-1964, Aug. 2009.
- MA, C. et al. Label-free sandwich type of immunosensor for hepatitis C virus core antigen based on the use of gold nanoparticles on a nanostructured metal oxide surface. **Microchimica Acta**, v. 178, p. 331-340, June 2012.
- MACHIDA, A. et al. Two distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies direct to the putative core protein. **Hepatology**, v. 16, n. 4, p. 886-891, Oct. 1992.
- MARQUES, P. B. O. **Construção de genossensor amperométrico para diagnóstico da hepatite C**. 2009. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- MILLAN, K. M.; SARAULLO, S.; MIKKELSEN, S. R. Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 18, p. 2943-2948, Sept. 1994
- MINUNNI, M. et al. Detection of β -thalassemia by a DNA piezoelectric biosensor coupled with polymerase chain reaction. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, n. 1, p. 55-64, Mar. 2003.
- MONOSIK, R.; STRED'ANSKY, M.; STURDIK, E. Application of electrochemical biosensors in clinical diagnosis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 26, n. 1 p. 22-34, Jan. 2012.
- NADEEM, A. et al. Interferon-alpha induced and ribavirin induced thyroid dysfunction in patients with chronic hepatitis C. **Hepatitis Monthly**, v. 10, n. 2, p. 132-140, June 2010.
- NAKANO, T. et al. An updated analysis of hepatitis C virus genotypes and subtypes based on the complete coding region. **Liver International**, v. 32, n. 2, p. 339-345, Feb. 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 3rd ed. New York : Worth Publishers, 1942. 1152 p.
- ODENTHAL, K. J.; GOODING, J. J. An introduction to electrochemical DNA biosensors. **Analyst**, v. 132, n. 7, p. 603-610, July 2007.

OKAMOTO, H. et al. Typing hepatitis C virus by polymerase chain reaction with type-specific primers: application to clinical surveys and tracing infectious sources. **Journal of General Virology**, v. 73 n. Pt 3, p. 673-679, Mar. 1992.

OLIVEIRA, I. A. G. **Testes moleculares qualitativos para confirmação diagnóstica da hepatite C: uma revisão sistemática e estimativa de gastos pelo SUS segundo modalidade técnica.** 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

O'MEARA, D. et al. Capture of single-stranded DNA assisted by oligonucleotide modules. **Analytical Biochemistry**, v. 255, p. 195-203, Sept. 1998.

OTHMAN, A. M. et al. Potentiometric determination of α -L-fucosidase enzyme by using 2-chloro-4-nitrophenol-rhodamine B ion pair chemical recognition in PVC membrane sensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, p. 787-795, Mar. 2011.

PAREDES, C. M.; GARCIA, M. B. G.; GARCIA, A. C. Screen-printed electrodes for electrochemical DNA detection. In: OZSOZ, M. (Ed.). **Electrochemical DNA biosensors.** Penthouse Level: Pan Stanford Publishing, 2012. Cap. 9, p. 291-327.

PARK, J. Y. et al. Label-free impedimetric sensor for a ribonucleic acid oligomer specific to hepatitis C virus at a self-assembled monolayer-covered electrode. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 8342-8348, Oct. 2010.

PERRIN, A. et al. A combined oligonucleotide and protein microarray for the co-detection of nucleic acids and antibodies associated with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections. **Analytical Biochemistry**, v. 322, p. 148-155, Nov. 2003.

PIUNNO, P. A. E. et al. Fiber optic biosensor for fluorimetric detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**, v. 288, n. 3, p. 205-214, Apr. 1994.

PIVIDORI, M. I.; MERÇOÇI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, p. 291-303, May 2000.

POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F.; HEJAZI, M. S. Differential pulse voltammetric detection of Hepatitis C Virus 1a oligonucleotide chain by a label-free electrochemical DNA hybridization biosensor using consensus sequence of Hepatitis C Virus 1a probe on the pencil graphite electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 16, p. 1822-1828, 2009.

POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F.; HEJAZI, M. S. Direct detection and discrimination of double-stranded oligonucleotide corresponding to hepatitis C virus genotype 3a using an electrochemical DNA biosensor based on peptide nucleic acid and double-stranded DNA hybridization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, p. 3581-3587, June 2010.

QURESHI, S. A. et al. Hepatitis C therapy – the future looks bright. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 1409-1413, Aug. 2009.

- RICCARDI, C. S. et al. Immobilization of streptavidin in sol-gel films: application on the diagnosis of hepatitis C virus. **Talanta**, v. 70, p. 637-643, Feb. 2006.
- RICCARDI, C. S. et al. Label-free DNA detection of hepatitis C virus based on modified conducting polypyrrole films at microelectrodes and atomic force microscopy tip-integrated electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 237-245, Jan. 2008.
- ROH, C.; KIM, S. E.; JO, S. K. Label free inhibitor screening of hepatitis C virus (HCV) NS5B viral protein using RNA oligonucleotide. **Sensors**, v. 11, p. 6685-6696, June 2011.
- ROH, C.; KIM, S. E.; JO, S. K. A simple and rapid detection of viral protein using RNA oligonucleotide in a biosensor. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 67, n. 11, p. 925-929, Jan. 2012.
- ROH, C. et al. A highly sensitive and selective viral protein detection method based on RNA oligonucleotide nanoparticle. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, p. 323-329, Apr. 2010a.
- ROH, C. et al. Quantum-dots-based detection of hepatitis C virus (HCV) NS3 using RNA aptamer on chip. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, p. 1130-1134, Apr. 2010b.
- SAWATA, S. et al. Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 14, p. 397-404, Apr. 1999.
- SHEN, F. et al. Multiplexed quantification of nucleic acids with large dynamic range using multivolume digital RT-PCR on a rotational SlipChip tested with HIV and hepatitis C viral load. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 17705-17712, Oct. 2011.
- SHEN, K. et al. A microchip-based PCR device using flexible printed circuit technology. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 105, p. 251-258, Jan. 2005.
- SILVERSTEIN, R. M. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 387 p.
- SIMMONDS, P. et al. Sequence variability in the 5' non-coding region of hepatitis C virus: identification of a new virus type and restrictions on sequence diversity. **Journal of General Virology**, v. 74, n. Pt 4, p. 661-668, Apr. 1993.
- SKLADAL, P. et al. Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. **Journal of Virological Methods**, v. 117, p. 145-151, Jan. 2004.
- SOCHOL, R. D. et al. A dynamic bead-based microarray for parallel DNA detection. **Journal of Micromechanics and Microengineering**, v. 21, p. 1-8, Apr. 2011.
- STEEL, A. B.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Electrochemical quantitation of DNA immobilized on gold. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 22, p. 4670-4677, Nov. 1998.

STUYVER, L. et al. Typing of hepatitis C virus isolates and characterization of new subtypes using a line probe assay. **Journal of General Virology**, v. 74, n. Pt 6, p. 1093-1102, June 1993.

SUZUKI, T. et al. Hepatitis C viral life cycle. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 1200-1212, Aug. 2007.

TANG, D. et al. Electrochemical detection of hepatitis C virus with signal amplification using BamHI endonuclease and horseradish peroxidase-encapsulated nanogold hollow spheres. **Chemical Communications**, v. 47, p. 9477-9479, July 2011.

TANG, D. et al. Simultaneous determination of five-type hepatitis virus antigens in 5 min using an integrated automatic electrochemical immunosensor array. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1658-1662, Mar. 2010.

TEIXEIRA, R.; MARTINS FILHO, O. S.; OLIVEIRA, G. C. **Hepatite C**: aspectos críticos de uma epidemia silenciosa. Belo Horizonte: FIOCRUZ, 2005. 192 p.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, p. 606-623, July 2008.

TIMURDOGAN, E. et al. MEMS biosensor for detection of Hepatitis A and C viruses in serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 28, p. 189-194, July 2011.

TOMBELLI, S.; PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Nucleic acids-based biosensors. In: JIN, J.; GROTE, J. (Ed.). **Materials science of DNA**. Boca Raton: CRC Press, 2012. Cap. 10, p. 291-310.

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

ULIANA, C. V.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Application of factorial design experiments to the development of a disposable amperometric DNA biosensor. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2607-2615, Aug. 2011.

ULIANA, C. V. et al. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of hepatitis C virus using fractional factorial designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 782-787, May 2008.

WANG, C. H.; LEE, G. B. Automatic bio-sampling chips integrated with micro-pumps and micro-valves for disease detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 419-425, Jan. 2005.

WANG, J. H. et al. A miniaturized quantitative polymerase chain reaction system for DNA amplification and detection. **Sensors and Actuators B**, v. 141, p. 329-337, June 2009.

WANG, Z. et al. Study in adsorption and oxidation of Calf Thymus DNA at glassy carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 12, n. 7, p.1419-1421, Mar. 2000.

WEI, N. et al. An electrochemical biosensor for detection of PML/RARA fusion gene using capture probe covalently immobilized onto poly-calcon carboxylic acid modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 78, p. 1227-1234, Jan. 2009.

WIRTH, C. F.; RENAULT, N. J.; COSTE, J. Detection of blood-transmissible agents: can screening be miniaturized? **Transfusion**, v. 50, p. 2032-2045, Sept. 2010.

WORLD HEPATITIS ALIANCE. **World hepatitis day**. 2010. Disponível em: <<http://www.worldhepatitisalliance.org/WorldHepatitisDay.aspx>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

WU, W-Y. et al. Flexible PDMS-based three-electrode sensor. **Electrochemistry Communications**, v. 12, p. 1600-1604, Sept. 2010.

ZHANG, C. et al. PCR microfluidic devices for DNA amplification. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 243-284, Jan. 2006.

ZHANG, Y.; OZDEMIR, P. Microfluidic DNA amplification – a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 638, p. 115-125, Mar. 2009.

ZYBIN, A. et al. Double-wavelength technique for surface plasmon resonance measurements: basic concept and applications for single sensors and two-dimensional sensor arrays. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 2393-2399, Apr. 2005.