



Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR
AMPEROMÉTRICO PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA
HEPATITE C**

Carolina Venturini Uliana

Araraquara

2009

Carolina Venturini Uliana

**Desenvolvimento de um Biossensor Amperométrico para a
Detecção do Vírus da Hepatite C**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka

Araraquara

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

U39d	Uliana, Carolina Venturini Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a detecção do vírus da Hepatite C / Carolina Venturini Uliana. - Araraquara : [s.n], 2009 100 f. : il. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Hideko Yamanaka 1. Química analítica. 2. Hepatite C. 3. Detecção. 4. Biossensores. 5. Amperometria. I. Título.
------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CAROLINA VENTURINI ULIANA

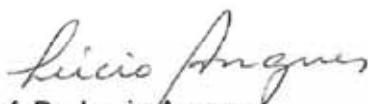
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 20 de janeiro de 2009.

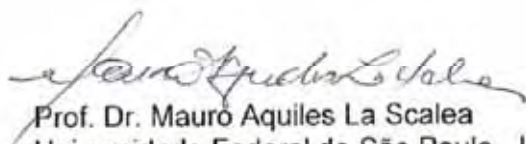
BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Lucio Angnes
Instituto de Química – USP, São Paulo



Prof. Dr. Mauro Aquiles La Scalea
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Cláudia, pelo amor incondicional e ensinamentos que sempre me acompanham.

Ao meu noivo Gustavo, pelo incentivo, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, minha fortaleza;

À Profª Drª Hideko Yamanaka, pela confiança, orientação, disponibilidade e também pela amizade;

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pela infra-estrutura;

Aos Professores Nelson R. Stradiotto, Maria Valnice B. Zanoni e Maria Del Pilar T. Sotomayor pelos ensinamentos, discussões e convívio;

Ao Prof. Assis V. Benedetti e Profª Pilar pelas valiosas sugestões no exame de qualificação;

Ao Grupo de Estudo das Hepatites Virais da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pelo fornecimento das amostras de HCV;

Aos integrantes do grupo de Eletroanalítica, Daniela, Diana, Lahys, Michelle Castilho, Priscila, Ricardo, Nemo, Tina, Rodrigo, Dani, Juliano, Luciano, Magno, Marcelo Faber, Michelle, Thais Tasso e aos ex-integrantes, pela convivência;

Aos amigos Marcos (Harry), Paulo Tomaz, Glauco, Miller, Fabiana Paschoal, Leonardo Paim, Paulo Brasil e Antônio, pelas animadas conversas no dia-a-dia;

À Carla S. Riccardi por ter sido sempre tão receptiva e prestativa, e fazer parte da minha formação acadêmica;

À minha querida amiga Eliza Siqueira, por me ajudar a entender coisas tão preciosas;

Às pessoas especiais que já são parte da minha família: Sônia, Henrique, Vitor, Graziela, D. Dina e Sr. Alfeu;

À minha avó Antônia, meus tios Tita e Fortuna e minhas primas Fernanda, Isabela e Sheila, por estarem sempre presentes, de uma forma ou de outra;

Ao meu irmão João Henrique, pelos momentos de descontração;

Ao meu pai, João, por sempre me incentivar e dar apoio em todas as minhas decisões;

À minha mãe, Cláudia, por ser tão amiga, compreensiva, companheira e por ter me ajudado tanto em todos os aspectos da minha vida;

Ao meu noivo Gustavo, por ser tão maravilhoso, por me ensinar tantas coisas, pela paciência, amor e carinho, e por me fazer rir nos momentos menos prováveis;

Ao CNPq pela bolsa concedida.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Carolina Venturini Uliana

Data de Nascimento: 05 de maio de 1981

Naturalidade: Tambaú – SP

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Solteira

Filiação:

pai – João Batista Uliana

mãe – Cláudia Donizetti Venturini

Profissão: Licenciada em Química

Documento de Identidade: 33.470.582-4

Endereço para Correspondência:

Rua Militão Nogueira de Carvalho, 668 – Bairro Alvorada – Cep: 13710-000

Tambaú – SP

e-mail: ca_uliana@yahoo.com.br

FORMAÇÃO

Básica

Ensino Fundamental I: E. E. “Padre Donizetti Tavares de Lima”, Tambaú – SP

Ensino Fundamental II: E. E. “Padre Donizetti Tavares de Lima”, Tambaú – SP

Ensino Médio: E. E. “Padre Donizetti Tavares de Lima”, Tambaú – SP

Acadêmica

GRADUAÇÃO

Licenciada em Química junto ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP.

Iniciação Científica realizada 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 Profª. Drª. Hideko Yamanaka.

Projeto: “Desenvolvimento de genossensor para detecção do vírus da Hepatite C”

Concluído em dezembro de 2006.

PÓS GRADUAÇÃO

Mestrado 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 Profª. Drª. Hideko Yamanaka.

Projeto: “Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a detecção do vírus da Hepatite C”

Concluído em janeiro de 2009.

DISCIPLINAS CURSADAS NA PÓS-GRADUAÇÃO

Disciplinas Cursadas	Créditos	Carga Horária	Frequência	Conceito
Técnicas eletroanalíticas I	12	180	87	A
Metrologia em química e qualidade	12	180	100	A
Método potenciométricos e espectrofotométricos aplicados à análise de substâncias orgânicas de importância nutricional em medicamentos, bebidas e alimentos.	12	180	100	A
Tópico especiais: metodologias e procedimentos analíticos utilizados no estudo de amostras de interesse ambiental	12	180	100	A
Sensores químicos	12	180		
Seminário geral	05		100	

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

01. ULIANA, C.V.; YAMANAKA, H. Utilização da monocamada auto-organizada de ácido lipóico para imobilização da enzima peroxidase sobre CDtrodo de ouro. **IN: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 26 a 29 de maio de 2008.
02. TOMAZ, P.R.U.; ULIANA, C.V.; YAMANAKA, H. Imobilização da enzima peroxidase sobre eletrodo de grafite utilizando sol-gel de titânia. **IN: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 26 a 29 de maio de 2008.
03. TOMAZ, P.R.U.; ULIANA, C.V.; YAMANAKA, H. Estudo da estabilidade da enzima HRP imobilizada sobre eletrodo de grafite. **IN: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, São José dos Campos-SP, 29 e 30 de outubro de 2008.
04. TOMAZ, P.R.U.; ULIANA, C.V.; YAMANAKA, H. Avaliação da deposição de filme de sol-gel sobre a superfície de eletrodos de grafite por meio da voltametria cíclica. **IN: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Presidente Prudente-SP, 22 a 26 de outubro de 2007.
05. ULIANA, C.V.; GARBELLINI, G.S.; YAMANAKA, H. Determinação voltamétrica do ácido 5-aminossalicílico sobre eletrodo de grafite. **IN: XVI Encontro da SBQ Regional**, Franca-SP, 13 e 14 de novembro de 2007.
06. ULIANA, C.V.; TOGNOLLI, J.O.; YAMANAKA, H. Desenvolvimento de genossensor amperométrico para Hepatite C utilizando planejamento fatorial fracionado. **IN: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Águas de Lindóia-SP, 15 a 19 de abril de 2007.
07. ULIANA, C.V.; TOGNOLLI, J.O.; YAMANAKA, H. Aplicação de planejamento fatorial fracionado no desenvolvimento de biossensor para Hepatite C. **IN XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Bauru-SP, 06 de novembro de 2006.

08. ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Estudo comparativo dos mediadores ácido 5-aminossalicílico e iodeto de potássio para monitoramento da enzima peroxidase. **IN: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 22 de maio de 2006.
09. ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; SANTILLI, C.V.; YAMANAKA, H. Imobilização de peroxidase em matriz híbrida siloxano-poli(propileno óxido). **IN: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Londrina-PR, 04 a 07 de dezembro de 2005.
10. ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Imobilização da enzima peroxidase em eletrodos modificados com filme sol-gel. **IN: XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Araraquara -SP, 08 e 09 de novembro de 2005.
11. OLIVEIRA, M.S.; ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroanalítico do ácido 5-aminossalicílico na presença de peróxido de hidrogênio e da enzima peroxidase. **IN: XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Teresópolis-RJ, 08 a 12 de agosto de 2004.
12. ULIANA, C.V.; OLIVEIRA, M.S.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Utilização do sistema ácido 5-aminossalicílico e peróxido de hidrogênio para detecção da enzima peroxidase. **IN: XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Ilha Solteira-SP, 04 a 10 de dezembro de 2004.
13. ULIANA, C.V.; OLIVEIRA, M.S.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Utilização do sistema ácido 5-aminossalicílico / peróxido de hidrogênio para detecção da enzima peroxidase. **IN: XXXIV Semana da Química do Instituto de Química da Unesp de Araraquara**, Araraquara-SP, 24 a 29 de outubro de 2004.

PUBLICAÇÕES

01. ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; TOGNOLLI, J.O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of Hepatitis C virus using fractional factorial designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 782-787, 2008.
02. ULIANA, C.V.; RICCARDI, C.S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Eclética Química** (Araraquara), v. 33, n. 1, p. 57-62, 2008.
03. GARBELLINI, G.S.; ULIANA, C.V. Toxidez, degradação no meio-ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas** (UFPR), v. 17, p. 29-36, 2007.
04. ULIANA, C.V.; GARBELLINI, G.S.; YAMANAKA, H. Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry at pencil graphite electrodes. **Analytical Letters**, submetido.

05. ULIANA, C.V.; GARBELLINI, G.S.; YAMANAKA, H. On the use of 5-aminosalicylic acid as electron mediator for Horseradish peroxidase: an electrochemical and spectrophotometric approach mechanism. **Bioelectrochemistry**, submetido.
06. FOGUEL, M.V.; ULIANA, C.V.; MARQUES, P.R.B.O.; FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H. Avaliação da limpeza de CDtrodo confeccionados a partir de CD graváveis/fita adesiva de galvanoplastia. **Eclética Química**, submetido.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

01. XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 26 a 29 de maio de 2008.
02. XVI Encontro da SBQ Regional, Franca-SP, 13 e 14 de novembro de 2007.
03. II Comemoração do Dia do Químico, 18 de junho de 2007.
04. XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Águas de Lindóia-SP, 15 a 19 de abril de 2007.
05. XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Bauru-SP, 06 de novembro de 2006.
06. XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia-SP, 22 de maio de 2006.
07. XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Londrina-PR, 04 a 07 de dezembro de 2005.
08. I Comemoração do Dia do Químico, 21 de junho de 2005.
09. XXXV Semana da Química do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, Araraquara-SP, 16 a 21 de outubro de 2005.
10. XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara -SP, 08 e 09 de novembro de 2005.
11. IV TEJ – Treinamento Empresarial Júnior, Araraquara-SP, 12 de outubro de 2005.
12. III TEJ – Treinamento Empresarial Júnior, Araraquara-SP, 28 de janeiro de 2005.
13. XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Ilha Solteira-SP, 04 a 10 de dezembro de 2004.
14. II Encontro da Empresas Juniores da UNESP, Araraquara-SP, 05 a 07 de novembro de 2004.
15. XXXIV Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 24 a 29 de outubro de 2004.
16. XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, Teresópolis-RJ, 08 a 12 de agosto de 2004.
17. VII FEP – Feira de Profissões da UNESP, Araraquara-SP, 27 a 29 de julho de 2004.
18. II Seminário Rumos da Educação em São Paulo: Qualidade de Ensino no Município, Araraquara-SP, 06 de abril de 2004.
19. II TEJ – Treinamento Empresarial Júnior, Araraquara-SP, 27 de setembro de 2003.
20. Mostra de tecnologia e de projetos do IQ- UNESP na Facira, Araraquara-SP, 18 de agosto de 2003.
21. I Show de ciências e artes do Ateneu Araraquara, 30 de outubro de 2002.
22. II Congresso de Extensão Universitária da UNESP, Bauru-SP, 10 de novembro de 2002.
23. I CEI – Curso de Especialização de Inverno, Araraquara-SP, 15 a 18 de julho de 2002.
24. XXXII Semana da Química do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, Araraquara-SP, 20 a 25 de outubro de 2002.

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS

01. “Chemical Sensors”, duração 30 h.
02. “Revelação fotográfica”, duração 3 h.
03. “Elaboração de resumos”, duração 1 h.
04. “Empreendedorismo”, duração 3h 30 min.
05. “Filmes Finos”, duração 16 h.
06. “Referências bibliográficas: como fazer”, duração 1h.
07. “Gestão de Qualidade”, duração 8h.
08. “Planejamento de vida”, duração 8 h 30 min.
09. “Gestão estratégica para Empresa Júnior”, duração 8 h.
10. Tools – MS Project, duração 4 h.
11. “Estratégias de ensino – aprendizagem em química”, duração 12 h.
12. “Análise de resíduos de pesticidas” duração 16 h.
13. “Fundamentos para prática de leitura e produção de textos, com ênfase no texto científico”, duração 12 h.
14. “Química forense”, duração 8 h.
15. II Seminário Rumos da Educação em São Paulo: Qualidade de Ensino no Município, duração 8 h.
16. “Políticas educacionais brasileiras e a realidade escolar”, duração 12 h.
17. “Acesso a periódicos científicos eletrônicos – Portal CAPES”, duração 1 h.

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

01. Apresentação da palestra “Enzimas: algumas aplicações tecnológicas” na E.M. Adelino Bordignon, Matão-SP, 04 de novembro de 2008.
02. Apresentação da palestra “Empreendedorismo” para alunos do curso de bacharelado em química do Instituto de Química de Araraquara como parte das atividades da disciplina Iniciação à Pesquisa Científica, 30 de maio de 2006.
03. Gerente do Departamento de Marketing da Química Júnior, Empresa Júnior do Instituto de Química de Araraquara, setembro de 2004 a junho de 2006.
04. Participação no projeto de Extensão Universitária Grupo Alquimia, com Bolsa de Extensão Universitária (BAE), junho de 2002 a setembro de 2004.
05. Diretora do Departamento Jurídico-Financeiro da Química Júnior, Empresa Júnior do Instituto de Química de Araraquara, setembro de 2003 a junho de 2004.
06. Gerente do Departamento Jurídico-Financeiro da Química Júnior, Empresa Júnior do Instituto de Química de Araraquara, setembro de 2002 a junho de 2003.

ESTÁGIOS, BOLSAS E AUXÍLIOS

Bolsa de Iniciação Científica (IC) concedida pela FAPESP (Processo 04/09535-5).
Bolsa de Mestrado (MS) concedida pela CAPES e CNPq.

RESUMO

O presente trabalho relata o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para detecção do vírus da Hepatite C (HCV) por meio da reação de hibridização do DNA imobilizado na superfície do eletrodo com o DNA complementar proveniente de amostras de soro de pacientes. Neste dispositivo, a reação da enzima peroxidase com o substrato peróxido de hidrogênio e com o mediador de elétrons ácido 5-aminossalicílico é utilizada como marcadora da reação de hibridização.

Estudos eletroquímicos e espectrofotométricos foram empregados na investigação do produto da oxidação do mediador pela enzima, sugerindo-se que este seja um complexo formado entre o Fe^{4+} presente no grupo heme da peroxidase e o grupo $-\text{NH}_2$ do ácido 5-aminossalicílico. Este complexo sofre redução na superfície do eletrodo resultando na resposta analítica do sistema proposto.

Na construção do biossensor, os eletrodos de ouro, obtidos a partir de CDs graváveis denominados CDtrodos, foram modificados com monocamadas auto-organizadas de ácido lipóico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ por 120 minutos. Estudos quimiométricos, por meio do planejamento fatorial completo e fracionado, foram aplicados para obtenção das melhores condições de imobilização das biomoléculas, compreendendo a concentração e o tempo de incubação dos CDtrodos nas soluções da proteína estreptavidina, da sonda de DNA específica para o HCV genótipos 1 e 3, do DNA complementar e do conjugado avidina-peroxidase, marcador da reação de hibridização. O valor de *cut-off* foi determinado como sendo de $-0,599 \mu\text{A}$ e biossensor foi então aplicado em amostras positivas para HCV.

Os resultados mostraram que o biossensor desenvolvido é adequado para aplicação em amostras dos genótipos 1 e 3, os quais prevalecem no Brasil.

ABSTRACT

This work presents the development of an amperometric biosensor for the detection of Hepatitis C virus (HCV) through the reaction of hybridization of DNA immobilized on the electrode surface with the complementary DNA (c-DNA) from serum samples of patients. In this device, the reaction of the enzyme peroxidase with the substrate hydrogen peroxide and with the electron mediator 5-aminosalicylic acid is used as hybridization label.

Electrochemical and spectrophotometric studies were carried out to investigate the oxidation product of the mediator by the enzyme, suggesting that one is a complex formed between the Fe^{4+} of heme peroxidase group and $-\text{NH}_2$ group of 5-aminosalicylic acid. This complex undergoes reduction in the electrode surface resulting in the analytical response of the proposed system.

For the construction of the biosensor, the gold electrodes, obtained from recordable CDs namely CDtrodes, were modified with self-assembled monolayers of lipoic acid $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ for 120 minutes. Chemometric studies, through the full and fractional factorial design, were applied to obtain the best conditions for the biomolecules immobilization, including the concentration and the incubation time of CDtrodes in the solutions of the protein streptavidin, the DNA probe specific for the HCV genotypes 1 and 3, c-DNA and the avidin-peroxidase conjugate, label of the reaction of hybridization. The cut-off value was determined as $-0.599 \mu\text{A}$ and the biosensor was applied for HCV positive samples.

The results showed that the developed biosensor is suitable for application in samples of genotypes 1 and 3, which are those that prevail in Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização genômica do HCV, adaptado de Wiesch et al. ⁸	24
Figura 2: Esquema de construção do biossensor para o HCV.....	40
Figura 3: Esquema da confecção de CDtrodos: 1) área recortada do CD; 2) fita de galvanoplastia para delimitação da área do eletrodo; 3) contato elétrico e revestimento com fita de teflon.	41
Figura 4: Voltamograma cíclico traçado em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0 contendo K ₄ Fe(CN) ₆ 1,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ antes da limpeza da superfície do CDtrodo de ouro; v= 50 mV s ⁻¹	52
Figura 5: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0 contendo K ₄ Fe(CN) ₆ 1,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ antes (A) e após (B) limpeza da superfície do CDtrodo de ouro utilizando aplicação de potencial fixo em +0,5 V em solução de NaCl 0,5 mol L ⁻¹ por 5 min. (v= 50 mV s ⁻¹).	53
Figura 6: Voltamograma cíclico traçado em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ sobre CDtrodo de ouro, v= 100 mV s ⁻¹	54
Figura 7: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0 contendo K ₄ Fe(CN) ₆ 1,0 x 10 ⁻² mol L ⁻¹ antes (A) e após (B) limpeza da superfície do CDtrodo de ouro por ciclagens sucessivas em H ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ . (v=50 mV s ⁻¹).	54
Figura 8: Voltamogramas de onda quadrada traçados em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0 contendo 5-ASA 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , obtidos após diferentes tempos a partir do preparo. Inserção: intensidades de corrente de pico obtidas em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 em função do tempo, na ausência (□) e na presença (■) de 5-ASA. Parâmetros voltamétricos: f: 150 Hz, a: 0,05 V e ΔE _s : 0,002 V.	55
Figura 9: Espectros UV-Vis da solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L ⁻¹ pH 5,0 contendo 5-ASA 5,0 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ obtidos após diferentes tempos a partir do preparo. Inserção: valores de A ₂₉₈ em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 em função do tempo, na ausência (□) e na presença (■) de 5-ASA.	56
Figura 10: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 5-ASA 1,0 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ à velocidade de varredura de (1) 20; (2) 50; (3) 100, (4) 200; (5) 300 e (6) 500 mV s ⁻¹	57
Figura 11: Gráficos da I _{pa} vs. v ^{1/2} (A) e log I _{pa} vs. log v (B).	58

Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 5-ASA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ após (1) primeira, (2) segunda, (3) terceira, (4) quarta e (5) quinta varredura sucessiva a 200 mV s^{-1}	58
Figura 13: Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) do 5-ASA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 na ausência (A) e na presença (B) de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. Inserção: Voltamogramas cíclicos no intervalo de 0,30 a -0,30 V do 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (A) e presença (B) de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$	59
Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução contendo 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ após tempos de reação de 2 (1); 5 (2); 7 (3); 10 (4); 15 (5); 20 (6); 25 (7) e 30 minutos (8). Condições voltamétricas: f: 50 Hz, a: 0,050 V e ΔE_s : 0,010 V. Inserção: Dependência da corrente de pico com o tempo de reação.	60
Figura 15: Espectros UV-Vis das soluções contendo 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ após tempos de reação de 0,5 (1); 1 (2); 2 (3); 3 (4); 5 (5); 7 (6); 10 (7); 15 (8); 20 (9); 25 (10); 30 (11) e 45 minutos (12). Inserção: Variação da absorbância em 470 nm com o aumento do tempo de reação.	61
Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada da solução contendo 5-ASA/ H_2O_2 /HRP em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 após tempo de reação de 5 minutos (1) e para concentrações de benzoquinona analisadas: 0,1 (2); 0,3 (3); 0,5 (4); 0,7 (5) e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (6). Inserção: resposta individual da benzoquinona. Condições voltamétricas: f: 50 Hz, a: 0,050 V e ΔE_s : 0,010 V.....	62
Figura 17: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP contendo benzoquinona $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Curva experimental (—) e curvas resultantes da deconvolução para a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP (•••) e para a benzoquinona (---).	62
Figura 18: Espectros de UV-Vis da solução 5-ASA (—), benzoquinona (---) e ácido gentísico (•••) em concentrações $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparados individualmente em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e da mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP (-•-•-) após 5 minutos de reação.	63
Figura 19: Espectros UV-Vis da solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 (1) e da mistura de ácido gentísico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ após tempos de reação de 0; 1; 2; 5 e 10 minutos (2-6).....	64
Figura 20: Voltamogramas cíclicos obtidos em: (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; (B) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (C) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4}$ na presença de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (D) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$; $v=50 \text{ mV s}^{-1}$	65

- Figura 21: Efeito do valor de potencial aplicado no monitoramento amperométrico do sistema 5-ASA/ H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, na ausência (○) e na presença (●) de $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ da enzima HRP. 65
- Figura 22: Voltamogramas cíclicos traçados em (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e (B) ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; utilizando o CDtrodo de ouro, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 69
- Figura 23: Voltamogramas cíclicos obtidos em (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e (B) ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; utilizando o CDtrodo de ouro, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 69
- Figura 24: Voltamogramas cíclicos obtidos em (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; (B) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ antes da modificação e (C) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ após modificação as superfície com ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ por 120 minutos; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 70
- Figura 25: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ referentes a: 1) (A) antes da modificação e (B) após modificação com ácido lipóico por 15 minutos. 2) (C) antes da modificação e (D) após modificação com ácido lipóico por 30 minutos. 3) (E) antes da modificação e (F) após modificação com ácido lipóico por 60 minutos. 4) (G) antes da modificação e (H) após modificação com ácido lipóico por 120 minutos. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ 71
- Figura 26: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ após modificação do CDtrodo de ouro com a SAM de ácido lipóico por (1) 15 minutos e (2) 120 minutos aplicando a velocidade de varredura de $0,1 \text{ mV s}^{-1}$ 73
- Figura 27: Intensidades de corrente obtidas por amperometria nas condições: 1) CDtrodo sem monocamada: (□) solução tampão fosfato-citrato pH 5,0; (○) 5-ASA/ H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; (☆) sistema 5-ASA/ H_2O_2 na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. 2) CDtrodo com monocamada em diferentes tempos de formação: (▼) solução tampão fosfato-citrato pH 5,0; (▲) 5-ASA/ H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; (★) sistema 5-ASA/ H_2O_2 na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. O sistema operou a $-0,050\text{V}$ vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}$ 74
- Figura 28: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização da STA sobre CDtrodo de ouro modificado com SAM. C_{STA} =concentração da estreptavidina; C_{EDC} =concentração da carbodiimida, t_{incub} = tempo de incubação. 76

Figura 29: Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável. C _{STA} = concentração da estreptavidina; C _{EDC} = concentração da carbodiimida, t _{incub} = tempo de incubação.....	77
Figura 30: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização das sondas de DNA e do conjugado a-HRP. t _{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP; C _{a-HRP} = concentração de a- HRP; t _{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; t _{b-DNA} = tempo de incubação de b-DNA.....	80
Figura 31: Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável. t _{b-DNA} = tempo de incubação de b-DNA; t _{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; C _{a-HRP} = concentração de a-HRP; t _{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP.....	81
Figura 32: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do DNA complementar e do conjugado a-HRP. C _{a-HRP} = concentração de a-HRP; t _{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; t _{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP.....	82
Figura 33: Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável. t _{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; C _{a-HRP} = concentração de a-HRP; t _{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP.....	83
Figura 34: Variação da intensidade de corrente frente ao aumento da concentração do conjugado a-HRP utilizado como marcador da reação de hibridização na ausência (○) e na presença (●) do DNA complementar.....	84
Figura 35: Cronoamperogramas obtidos utilizando o biossensor aplicado em amostras negativas (---) e positivas (—) para HCV genótipo 1.....	85
Figura 36: Intensidades de corrente obtidas na aplicação do biossensor amperométrico em amostras negativas (○) e positivas (●) para HCV 1 após 6 dias de armazenamento a -4 °C.	86
Figura 37: Intensidades de corrente obtidas na aplicação do biossensor amperométrico em amostras negativas (○) e positivas (●) para HCV 3 após 8 dias de armazenamento a -4 °C.	86
Figura 38: Intensidades de corrente obtidas na aplicação do biossensor amperométrico em amostras negativas (○) e positivas (●) para HCV 1 após 16 dias de armazenamento a -4 °C.	87

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reações de oxidação do 5-ASA sobre eletrodo de carbono vítreo. ⁹⁴	57
Esquema 2: Formação do Composto I por meio da oxidação da HRP pelo H ₂ O ₂ , adaptado de Filizola et al. ¹⁰¹	66
Esquema 3: Proposta do mecanismo de oxidação do 5-ASA pela enzima HRP na presença de H ₂ O ₂	67
Esquema 4: Adsorção do ácido lipóico sobre o CDtrodo de ouro após 15, 30 e 120 minutos de exposição.	72
Esquema 5: Reação de acoplamento da molécula de STA à SAM de ácido lipóico por meio da EDC. Adaptado de Hermanson et al. ¹⁰⁷	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis e dois níveis	48
Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial fracionado de seis variáveis e dois níveis.....	49
Tabela 3: Matriz de planejamento fatorial fracionado de quatro variáveis e dois níveis.....	50
Tabela 4: Porcentagem de perda do recobrimento da superfície dos CDtrodos de ouro pela SAM de ácido lipóico após ciclagens sucessivas em $K_4Fe(CN)_6$ para diferentes tempos de modificação.	73
Tabela 5: Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 e intensidades de corrente obtidas	75
Tabela 6: Intensidades de corrente obtidas para as diferentes modificações dos CDtrodos....	78
Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial fracionado 2^{6-3} e intensidades de corrente obtidas	79
Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} e intensidades de corrente obtidas	81
Tabela 9: Resumo das condições otimizadas para a construção do biossensor para Hepatite C	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HCV – Vírus da Hepatite C

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

RNA – Ácido Ribonucleico

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

RT-PCR – Reação Transcriptase Reversa seguida de Reação de Polimerase em Cadeia

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

HRP – Horseradish Peroxidase

SAM – Self-Assembled Monolayer

STA – Streptavidina

BSA – Albumina de Soro Bovino

b-HRP –Horseradish Peroxidase marcada com biotina

a-HRP –Horseradish Peroxidase marcada com avidina

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

b-DNA – DNA marcado com biotina

c-DNA – DNA complementar

5-ASA – Ácido 5-Aminossalicílico

5-ASA-QI – Quinona-Imina

CD-R – Compact Disc Recordable (CD gravável)

PGE – Pencil Graphite Electrode

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. A HEPATITE C	22
1.2. O VÍRUS DA HEPATITE C (HCV).....	24
1.3. DIAGNÓSTICOS PARA O HCV.....	25
1.3.1. Testes sorológicos para o diagnóstico da infecção por HCV.....	25
1.3.1.1. Testes de rastreamento do HCV	25
1.3.1.2. Testes suplementares para anti-HCV	26
1.3.2. Ensaio molecular de detecção do HCV.....	27
1.3.2.1. Testes qualitativos.....	27
1.3.2.2. Testes quantitativos.....	28
1.3.3. Determinação do genótipo do HCV	28
1.4. ALTERNATIVAS PARA A DETECÇÃO DA HEPATITE C.....	30
1.5. BIOSSENSORES	31
1.5.1. Tipos de imobilização de biomoléculas sobre a superfície de transdutores	33
2. OBJETIVOS	37
3. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	38
3.2. INSTRUMENTAÇÃO	39
3.3. METODOLOGIA	39
3.3.1. Construção do biossensor	39
3.3.2. PARTE 1: ESTUDO DO MECANISMO DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR UTILIZANDO A ENZIMA HRP NA PRESENÇA DE 5-ASA E H ₂ O ₂	41
3.3.2.1. Construção dos eletrodos a partir de CDs graváveis	41
3.3.2.2. Avaliação da limpeza da superfície dos eletrodos de ouro	41
3.3.2.3. Construção dos eletrodos de grafite de lapiseira (PGE)	42
3.3.2.4. Estudo da estabilidade da solução de 5-ASA	42
3.3.2.5. Comportamento eletroquímico do 5-ASA sobre eletrodo de grafite.....	43
3.3.2.6. Avaliação da interação do 5-ASA com a HRP na presença de H ₂ O ₂	43
3.3.2.7. Estudo da adição de benzoquinona e ácido gentísico ao sistema 5- ASA/H ₂ O ₂ /HRP	44

3.3.2.8. Comportamento eletroquímico do sistema 5-ASA/H ₂ O ₂ /HRP sobre CDtrodo de ouro	45
3.3.2.9. Proposta de mecanismo de interação entre o 5-ASA e a HRP	45
3.3.3. PARTE 2: DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR.....	45
3.3.3.1. Comportamento eletroquímico do ácido lipóico em solução sobre CDtrodo de ouro.....	45
3.3.3.2. Avaliação da formação da monocamada de ácido lipóico sobre a superfície do CDtrodo de ouro.....	46
3.3.3.3. Influência da SAM sobre a atividade catalítica da enzima HRP em solução	46
3.3.3.4. Imobilização da proteína STA via EDC sobre a SAM de ácido lipóico.....	47
3.3.3.5. Imobilização das sondas de DNA e do conjugado a-HRP	48
3.3.3.6. Determinação do valor cut-off e aplicação do biossensor em amostras positivas para HCV	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
<i>4.1. PARTE 1: ESTUDO DO MECANISMO DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR</i>	
<i>UTILIZANDO A ENZIMA HRP NA PRESENÇA DE 5-ASA E H₂O₂.....</i>	<i>52</i>
4.1.1. Avaliação da limpeza da superfície dos CDtrodos de ouro	52
4.1.2. Estudo da estabilidade da solução de 5-ASA.....	55
4.1.3. Comportamento eletroquímico do 5-ASA sobre eletrodo de grafite de lapiseira (PGE).....	56
4.1.4. Avaliação da interação do 5-ASA com HRP na presença de H ₂ O ₂	59
4.1.5. Estudo da adição de benzoquinona e ácido gentísico ao sistema 5-ASA/H ₂ O ₂ /HRP	61
4.1.6. Comportamento eletroquímico do sistema 5-ASA/H ₂ O ₂ /HRP sobre CDtrodo de ouro.....	64
4.1.7. Proposta de mecanismo de interação entre 5-ASA e HRP	66
<i>4.2. PARTE 2: DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR</i>	<i>68</i>
4.2.1. Comportamento do ácido lipóico em solução	68
4.2.2. Avaliação da formação da monocamada auto-organizada de ácido lipóico sobre a superfície dos CDtrodos de ouro.....	69
4.2.4. Imobilização da proteína estreptavidina (STA) via EDC sobre a SAM de ácido lipóico	75
4.2.5. Imobilização das sondas de DNA e do conjugado a-HRP.....	78

4.2.6. Determinação do valor cut-off e aplicação do biossensor em amostras positivas para HCV	84
5. CONCLUSÕES.....	88
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	89
REFERÊNCIAS.....	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. A HEPATITE C

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Hepatite C atinge cerca de 170 milhões de pessoas no mundo, sendo 3,2 milhões somente no Brasil. Com a descoberta do vírus da Hepatite C (HCV) em 1989 por Michael Houghton e colaboradores, o número de casos agudos de Hepatite C diminuiu em torno de 80%. Porém, como age silenciosamente, a doença raramente provoca sintomas específicos, torna a Hepatite C um dos mais sérios problemas de saúde pública.¹

Apesar do HCV ser um agente de baixa infectividade e replicação lenta, 50 a 80% dos pacientes que apresentam a forma aguda de hepatite, evoluem a uma infecção persistente, assintomática e, em torno de 10 anos, teriam uma hepatite crônica ativa e com progressão para cirrose hepática. Diversos fatores podem influenciar na evolução doença, tais como, carga viral, genótipo, idade avançada, co-infecção de HIV, alto índice de massa corporal e consumo de álcool. Com o quadro definido de evolução para cirrose hepática, em média de 13 anos este paciente poderá apresentar um quadro de hepatocarcinoma. Estudos revelam que a expectativa de vida é de 5 a 10 anos para 91% dos pacientes com cirrose hepática compensada (quando o fígado tem lesões, mas funciona normalmente), enquanto nos pacientes com cirrose hepática descompensada (o fígado tem lesões e não funciona normalmente), que pode conduzir a ascite, peritonite, varizes esofágicas, complicações neurológicas como encefalopatia hepática e coma hepático, a expectativa de vida não chega a 5 anos.²

Após a exposição ao vírus, o indivíduo infectado passa por um período de incubação que pode variar de um a cinco meses. Entre 30% a 40% dos adultos com infecção aguda pelo HCV apresentam sintomas leves, predominando febre, mal-estar, fadiga, náuseas, vômitos e discreta dor abdominal. Assim, a evolução da fase aguda para a crônica pode passar despercebida.³

Os fatores de contaminação são o uso de drogas injetáveis, que representam 2/3 das novas infecções, e acidentes com instrumentos perfurocortantes (agulhas, tesouras, bisturis, lâminas e alicates de unha) quando não esterilizados corretamente, pois o vírus é resistente e pode sobreviver fora do organismo por até 72 horas. O contágio da Hepatite C também pode ocorrer por transfusão de sangue, colocação de *piercing*, pela agulha e tinta utilizadas em tatuagem e também em hemodiálises. Não há comprovação de contaminação por fluidos

corporais, como saliva, suor, lágrima, sêmen ou leite materno. Abraços, beijos, compartilhar pratos, copos, talheres, sabonetes ou roupas não contaminam. A eventual transmissão sexual, geralmente é associada à presença de feridas causadas por doenças sexualmente transmissíveis.

O tratamento da Hepatite C objetiva deter a progressão da doença hepática pela inibição da replicação viral. A combinação de dois medicamentos, o interferon convencional ou interferon peguilado mais a ribavirina, representa hoje o tratamento padrão para pacientes com Hepatite C crônica.

O interferon é uma proteína produzida pelo organismo em resposta a um agente infeccioso, inibindo ou interferindo na replicação dos vírus e protegendo as células sadias. Foi denominado interferon justamente por interferir, de modo a ajudar, nos mecanismos de defesa. O interferon para uso terapêutico é produzido sinteticamente e foi o primeiro tratamento para Hepatite C crônica aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*). O uso do interferon provoca um estímulo no sistema imunológico que passa a agir contra o HCV, obtendo, assim, uma resposta natural.⁴

Pesquisas mostram que o interferon pode também melhorar as funções do fígado, diminuindo a fibrose, mesmo que após o tratamento o vírus não tenha sido eliminado. Além disso, impede que novas células sejam infectadas e reduz o risco de evolução para câncer de fígado nos pacientes que têm cirrose causada pela infecção do HCV.⁵ No entanto, a efetividade do interferon é limitada por fatores como baixa estabilidade e meia-vida curta. A bioatividade do interferon nativo pode ser melhorada por meio do processo de peguilação, que consiste em acoplar uma molécula de polietilenoglicol (PEG) a uma molécula de interferon. A molécula de polietilenoglicol não tem ação sobre organismo, sendo usada apenas para modificar o interferon convencional. O PEG envolve a molécula de interferon fazendo com que o organismo não o reconheça como um agente estranho, tornando todo o processo que ocorre dentro do organismo (desde o momento em que o medicamento é aplicado até sua eliminação) mais lento, fazendo com que o interferon permaneça por mais tempo agindo antes de ser eliminado. Dessa maneira, há um maior contato entre o interferon peguilado e o vírus, podendo o medicamento ser administrado apenas uma única vez por semana.⁴

Em 1998 houve um avanço no tratamento contra a Hepatite C com a associação da ribavirina, que proporcionou significativa melhora nas respostas. A ribavirina é um medicamento que exibe atividade *in vitro* contra uma gama de vírus, e quando usada em conjunto com o interferon ou interferon peguilado, melhora a resposta do paciente à terapia.⁶

A incidência de Hepatite C pode ser reduzida pelo rastreamento adequado de doadores de sangue nas últimas décadas, sendo que 5% dos novos casos são adquiridos dessa forma. A melhor maneira de prevenção reside no combate ao uso de drogas endovenosas.

1.2. O VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)

A Hepatite C é causada pelo vírus do gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*, sendo seu genoma constituído por uma hélice simples de RNA de polaridade positiva medindo 9,7 kilobases de comprimento. Na poliproteína, com uma única sequência codificadora (ORF: “Open Reading Frame”) com aproximadamente 3100 aminoácidos, distinguem-se as proteínas estruturais: core, E1 e E2 e as não estruturais ou NS (1 a 5), essas últimas responsáveis pela replicação viral⁷ (Figura 1). A região não codificadora (UTR) de 324-341 nucleotídeos no final da região 5' e uma 3' UTR de comprimento variável incluindo uma cauda poli U. A 5' UTR contém um IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) que faz a mediação da ligação do RNA com o ribossoma.⁸

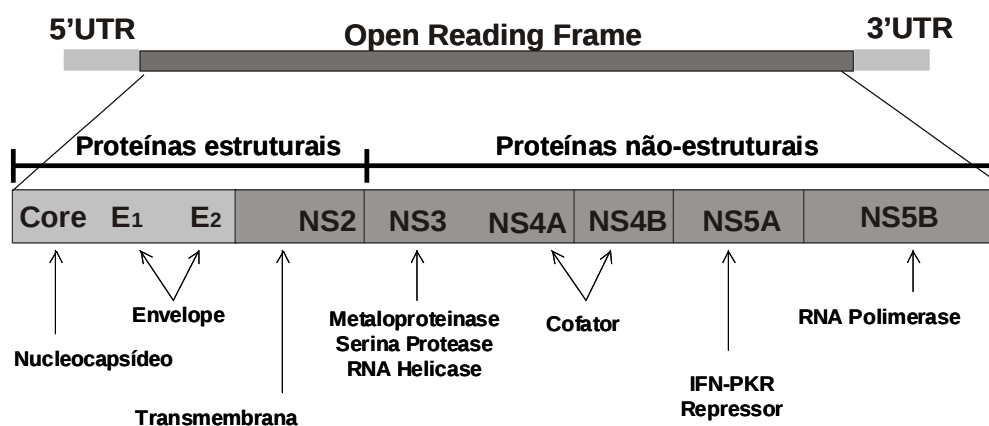


Figura 1: Organização genômica do HCV, adaptado de Schulze zur Wiesch et al.⁸

A análise filogenética das sequências genômicas permitiu a caracterização de 6 genótipos (1 a 6) que são subdivididos em grupos a, b, c, etc. Dentro de um mesmo genótipo e subtipo podemos ainda ter variações do HCV, que são denominadas quasispecies. Isso é possível devido à replicação imperfeita do vírus, com o surgimento de pequenas e constantes mutações. Como consequência, ainda não há perspectiva em médio prazo de uma vacina eficiente. A maior ou menor diversidade das quasispecies parece estar relacionada com a pressão imunológica, geralmente pequena nas fases iniciais da doença, com aminotransferases

normais, sendo de alta heterogeneidade nos casos de doença hepática mais avançada e/ou baixa resposta terapêutica.⁹

A replicação do vírus dentro da célula ocorre por meio da ligação de suas proteínas não-estruturais à membrana do retículo endoplasmático. Esse mecanismo forma um complexo de replicação que otimiza o processo de produção de novas partículas virais, protegendo-as da degradação intracelular.

1.3. DIAGNÓSTICOS PARA O HCV

Clinicamente, os pacientes com suspeita de infecção pelo vírus HCV são monitorados por diversos indicadores bioquímicos e, ainda, saber o genótipo prevalecente em determinada população é fundamental para direcionar a duração da terapia usando interferon e ribavirina.

Os testes de diagnósticos da Hepatite C podem ser divididos em duas categorias principais: 1) sorologia que detecta anticorpos contra o HCV (anti-HCV) e 2) ensaios moleculares, que detectam, quantificam e/ou caracterizam o RNA do HCV.¹⁰

1.3.1. Testes sorológicos para o diagnóstico da infecção por HCV

1.3.1.1. Testes de rastreamento do HCV

Partículas de HCV geralmente persistem no sangue, fígado, e linfócitos apesar da presença de resposta de imunidade humoral para a maioria das proteínas de HCV. A detecção de anticorpos contra antígenos específicos do HCV é a maneira mais frequentemente empregada para identificar a infecção. Para isso, são utilizados testes de rastreamento, que apresentam alta sensibilidade, e testes suplementares, também denominados confirmatórios, com maior especificidade.¹¹

Muitos dos testes de rastreamento empregam o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), que são testes imunoenzimáticos que permitem a detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo. O método consiste em adsorver o antígeno em uma placa de poliestireno, seguido da adição do soro teste na placa, permitindo que os anticorpos específicos liguem-se aos antígenos. Após um período de incubação, a placa é lavada para retirar os anticorpos não ligados. Para detectar os anticorpos ligados aos antígenos é utilizado um conjugado (anticorpo antiimunoglobulina ligado quimicamente a uma enzima). É adicionado um substrato cromogênico para detectar a presença da ligação antígeno-anticorpo

e a intensidade da cor desenvolvida pelo substrato é proporcional à quantidade de anticorpos (específicos para o antígeno) presente no soro. Essa intensidade de cor pode ser analisada por um espectrofotômetro, permitindo uma análise quantitativa.¹²

O teste ELISA I de primeira geração para o HCV (não mais utilizado na prática clínica), tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3, da região não-estrutural NS4. Três gerações de testes de anti-HCV têm sido desenvolvidos para aumentar a sensibilidade e especificidade. A segunda geração do teste ELISA (ELISA II) surgiu em 1992 nos Estados Unidos, tendo incorporado duas proteínas recombinantes do HCV: c22-3 (derivada da região estrutural, ou core) e c33-c (derivada da região não estrutural NS3). A proteína c33-c foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200. Em relação ao ELISA I, o ELISA II aumentou tanto a sensibilidade quanto a especificidade, reduzindo a taxa de falso-positivos, identificando cerca de 95% dos pacientes infectados com o HCV e reduziu de 16 para 10 semanas o tempo médio de soroconversão, ou seja, o tempo transcorrido entre a infecção e o surgimento do anticorpo.¹⁰ O teste ELISA de terceira geração (ELISA III) incluiu antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e adicionou um antígeno da região NS5. A principal vantagem dessa nova geração do teste foi a redução do tempo médio de soroconversão, que passou para 7 a 8 semanas,¹⁰ além de um aumento na sensibilidade de até 97%.^{13,14} Apesar da grande melhora na sensibilidade e a redução na taxa de falso-positivos a partir da primeira geração, os testes ELISA não confirmam todas as pessoas infectadas com o HCV. Deste modo, testes confirmatórios têm sido empregados.

1.3.1.2. Testes suplementares para anti-HCV

A baixa especificidade dos testes ELISA determinou o desenvolvimento de testes suplementares para a confirmação diagnóstica da infecção pelo HCV em indivíduos com resultados positivos. Nos testes suplementares, a especificidade indica a proporção de indivíduos com resultado negativo quando a infecção está ausente (padrão negativo inequívoco). Contudo, um resultado positivo mesmo em um teste suplementar, nem sempre é indicativo de infecção, visto que os pacientes que se recuperam da infecção podem apresentar o anti-HCV positivos durante anos.¹¹

Entre os testes suplementares ou confirmatórios, encontram-se os testes comerciais RIBA (*Recombinant Immunoblot Assay*) e LIA (*Line Imunoassay*). Os testes são interpretados

como positivo, indeterminado, ou negativo e a interpretação depende do tipo e a versão do ensaio e os critérios do fabricante.¹³ No entanto, um resultado positivo no teste RIBA ou LIA confirma a reatividade de anti-HCV específica. O problema surge quando o resultado é indeterminado ou até mesmo um resultado negativo. É provável que o paciente possa estar dentro do período de soroconversão ou pode ter uma resposta de anticorpos insuficiente, como observado em pacientes que passaram por transplante de órgão. Nestes casos, testes moleculares do RNA do HCV são necessários.

1.3.2. Ensaio molecular de detecção do HVC

1.3.2.1. Testes qualitativos

Uma viremia é uma indicação direta da replicação do RNA do HCV que pode ser detectado no soro e plasma sanguíneo. O padrão para o diagnóstico de infecção pelo HCV é a determinação do RNA do HCV através de RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*).¹³ O método utiliza sondas de ácido nucléico (sondas genéticas, ou *primers*), que são fragmentos de DNA ou RNA com estrutura complementar a uma sequência do ácido nucléico a ser detectado. A PCR possibilita amplificar sequências genéticas específicas, de tal modo que uma única molécula de DNA possa ser detectada na presença de milhões de outras.¹¹ A enzima transcriptase reversa utilizada na técnica de RT-PCR catalisa a síntese do DNA complementar (c-DNA) a partir da região 5'UTR do RNA viral. Em seguida ocorre a amplificação do c-DNA, produzindo quantidades suficientes para serem detectadas em gel de agarose. A RT-PCR é uma técnica que requer cuidados extremos para evitar resultados falso-positivos devido à contaminação.

Outro método empregado para a detecção qualitativa do RNA do HCV é a amplificação mediada pela transcriptase TMA (*Transcription-Mediated Amplification*). Este ensaio consiste em três passos, sendo a captura, na qual o RNA do HCV é liberado das partículas viróticas, a amplificação, etapa na qual são adicionados a enzima transcriptase reversa e os *primers* e, finalmente, a detecção por meio de ensaios de hibridização.¹⁵ É um método rápido e capaz de detectar menos de 50 cópias/mL dos principais genótipos do HCV.

Na prática clínica, na maioria dos pacientes o diagnóstico começa pela pesquisa de anticorpos contra o HCV através do teste ELISA. No entanto, em pacientes com hepatite crônica que são negativos para a presença de anti-HCV (como os pacientes em hemodiálise ou submetidos a transplante de órgãos) é necessário utilizar o teste PCR qualitativo. O teste é

também preconizado para hepatite aguda no período de janela imunológica, quando o RNA do HCV pode ser detectado uma semana após a exposição.

1.3.2.2. Testes quantitativos

A medida do nível de RNA do HCV (ou a carga viral) no soro ou no plasma é uma importante ferramenta para avaliar e administrar as taxas de replicação viral e de eliminação do vírus pelo hospedeiro. Foram desenvolvidas basicamente duas técnicas para a quantificação do HCV, sendo que uma utiliza a tecnologia da PCR quantitativa e a outra a do *branched*-DNA (bDNA).¹⁰ Esta última se baseia na amplificação de um sinal, e não do DNA alvo, como ocorre na PCR. O ácido nucléico 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 a enzimas com atuação sobre um substrato quimiluminescente.¹⁶ Assim, o “sinal de amplificação” é obtido sem amplificação do ácido nucléico do vírus.

Dois ensaios comercialmente disponíveis, muito utilizados para avaliação da carga virótica do HCV são o Quantiplex[®] HCV RNA, baseado na quantificação por amplificação do sinal (bDNA) e o Amplicor[®] HCV Monitor Test, que se baseia na técnica de RT-PCR.¹³

Outras técnicas para a quantificação do HCV estão sendo desenvolvidas, sendo que uma das mais promissoras utiliza sistemas de detecção em tempo real.¹⁴

1.3.3. Determinação do genótipo do HCV

Como visto, há pelo menos 6 genótipos e mais de 50 subtipos conhecidos do vírus HCV, e no Brasil os mais frequentes são os genótipos 1 e 3.¹⁷ O genótipo dominante na infecção ajuda a definir a epidemiologia da Hepatite C e o conhecimento do genótipo do HCV é fundamental para o aconselhamento terapêutico da doença. Pacientes com genótipos 1 e 3 são de 2 a 3 vezes mais propensos a responder a uma terapia com interferon do que os pacientes com genótipo 2. Outro fator importante está no emprego de uma combinação de terapias, em que a dose recomendada e a duração do tratamento são dependentes do genótipo presente. Por exemplo, para pacientes com genótipos 2 e 3, um tratamento combinando doses diárias de interferon e 800 miligramas de ribavirina durante 24 semanas é adequado, porém para pacientes com genótipo 1, é recomendado um tratamento de 48 semanas e alta dosagem de ribavirina (1000 a 1200 mg diárias). Por essas razões, o teste para o genótipo do HCV é

cl clinicamente recomendado. Uma vez identificado o genótipo, não é necessário refazer o teste, os genótipos não são alterados durante o curso da infecção.¹⁸

Uma variedade de métodos tem sido desenvolvida para determinar o genótipo de uma infecção por um específico vírus HCV, podendo ser separados em duas categorias: (1) testes que utilizam sequenciamento nucleotídico e análise filogenética de genes específicos do HCV (2) e testes de rastreamento, que detectam pontos de mutações dentro do genoma do HCV.¹⁹

O método mais adequado para determinar o genótipo do vírus HCV inclui o sequenciamento de regiões específicas do genoma do vírus e comparação com sequências obtidas pelo mapeamento filogenético de genótipos conhecidos. Os genes do envelope (E1) e região NS5B têm sido os genes mais utilizados para este objetivo. Apesar desses métodos oferecerem a maneira mais precisa para determinar o genótipo do HCV, são técnicas demoradas e requerem alto custo operacional para uso em rotina clínica.¹⁹

Os testes de rastreamento dos genótipos do HCV são mais rápidos e baratos para a determinação do HCV, sendo viáveis em laboratórios clínicos. Três desses métodos aplicam o uso da técnica de PCR: (1) uma técnica usa iniciadores construídos com sequências únicas para um genótipo específico. Apenas espécimes de HCV que contém essas sequências específicas de determinado genótipo são amplificados. Os iniciadores genótipo-específico para ambas as regiões do core e NS5B têm sido usados neste tipo de ensaio. (2) Uma outra maneira baseia-se nos sítios únicos de restrição para a maioria dos genótipos do HCV. O genótipo do vírus pode ser inferido pela digestão dos produtos amplificados por PCR através de enzimas específicas de restrição e determinação da migração diferencial dos fragmentos de ácidos nucleicos resultantes por eletroforese em gel de agarose. (3) A outra possibilidade para o rastreamento do genótipo do HCV usa sondas genótipo-específica, que são imobilizadas em tiras de nitrocelulose. Os produtos amplificados por PCR proveniente da região 5'UTR do genoma do HCV hibridizam-se com as sondas presentes na tira de nitrocelulose apenas quando a sequência amplificada é complementar à sequência de uma sonda genótipo-específica imobilizada. Este ensaio é denominado como "line probe" ou hibridização "dot-blot" reversa, estando disponível comercialmente para a genotipagem do HCV em laboratórios de análises clínicas (INNO-LiPA, Immunogenetics®, Belgium). Contudo todos esses métodos para determinação do genótipo do HCV presente em determinada população são relativamente caros.¹⁹

O genótipo do HCV também pode ser determinado por anticorpos genótipo-específicos. Esses anticorpos são identificados pela reação do soro do paciente com antígenos genótipo-específicos presentes num teste em imunoblot. A região NS4 mostrou ser a melhor

forma de sorotipagem, pois este gene codifica epitopos que podem ser usados para distinguir os genótipos de 1 a 3. Porém esse método não é tão sensível como os métodos baseados em PCR. Além disso, a sorotipagem não é capaz de diferenciar subtipos do HCV, como os genótipos 1a e 1b. Ainda assim, devido ao baixo custo e facilidade operacional, o teste de sorotipagem é muito utilizado em pesquisa científica.²⁰

1.4. ALTERNATIVAS PARA A DETECÇÃO DA HEPATITE C

Os métodos tradicionais de detecção e genotipagem da Hepatite C, embora bastante sensíveis, exigem tempo, complexos tratamentos da amostra, equipamentos especiais, além de, muitas vezes, apresentarem alto custo. Em geral, o objetivo de uma estratégia de detecção é a simplificação da metodologia analítica a um nível prático e rotineiro, com uma demanda mínima de habilidades do operador. Deste modo, novos métodos de detecção, que apresentam desempenhos comparáveis aos tradicionais, têm sido desenvolvidos.

Pyun et al.²¹ desenvolveram um detector amperométrico para ser diretamente aplicado a um imunoensaio enzimático (EIA) convencional empregando a peroxidase (HRP) como uma enzima conjugada e tetrametilbenzidina (TMB) como substrato, usando medidas de densidade ótica como parâmetro de referência. Neste trabalho, amostras de TMB com densidades óticas diferentes foram estudadas por voltametria cíclica e medidas amperométricas, obtendo-se uma correlação entre o sinal voltamétrico e os valores de absorbância. A sensibilidade da análise amperométrica foi determinada em 24 nA por absorbância e o limite de detecção foi estimado em 2 nA. A aplicabilidade do detector amperométrico ao imunoensaio foi demonstrada usando kits EIA disponíveis comercialmente para o diagnóstico de AIDS, HBV e HCV.

Muerhoff et al.²² descreveram um ensaio para detecção do core do antígeno do HCV em soro e plasma humano baseado em micropartículas quimioluminescentes. Os resultados mostraram que o dispositivo exibe uma especificidade de 99,9% na detecção do core do antígeno do HCV em amostras de 1004 doadores de sangue e foram detectados 69 das 70 amostras positivas para HCV, coletadas de 15 indivíduos. Com o dispositivo desenvolvido, foi possível detectar o vírus com uma janela sorológica de 32 dias, em média, enquanto que os ensaios de detecção de anticorpos necessitam de uma janela sorológica de 70 dias, tornando-o uma alternativa viável para detecção do HCV.

Um outro dispositivo de detecção do core do antígeno do HCV em amostras de soro de pacientes infectados com a Hepatite C foi desenvolvido por Lee et al.²³ Os autores

demonstraram que os aptameros (oligonucleotídeos curtos, de fita simples, com estruturas tridimensionais) imobilizados em matrizes de sol-gel, reconhecem especificamente o core do antígeno do HCV, mas não o antígeno de NS5 (proteína não-estrutural), podendo ser aplicado na detecção sensível e específica na presença de múltiplos antígenos do HCV.

Mao et al.²⁴ desenvolveram um arranjo de oligonucleotídeos baseado na detecção colorimétrica de genótipos da Hepatite C. Sondas específicas de cada genótipo/subtipo do HCV foram imobilizadas em superfícies de vidro e hibridizadas com genes complementares amplificados do HCV. O diagnóstico da infecção e a identificação dos genótipos/subtipos foram realizados diretamente em amostras clínicas sem a necessidade de pré-tratamentos. O método combinou a sensibilidade do PCR com a especificidade da hibridização, aliado à simplicidade na execução dos procedimentos, obtendo resultados que justificam a aplicação em análises clínicas.

Tagliavini et al.²⁵ prepararam discos de siloxano-poli(propileno óxido) a partir do método sol-gel para aplicação como fase sólida em um ensaio do tipo ELISA para detecção de anticorpos anti-HCV. Os discos de sol-gel contendo um fragmento da proteína do core do HCV imobilizado foram incubados em soro de pacientes contaminados com HCV, seguido de incubação em solução contendo o anticorpo marcado com a enzima HRP. O monitoramento da reação de afinidade foi realizado espectrofotometricamente utilizando tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio. A metodologia foi aplicada em amostras positivas e negativas para HCV e os resultados mostraram-se satisfatórios.

Entre as áreas de crescente interesse, os biossensores surgem como uma ferramenta de grande confiabilidade analítica com menores tempos de análises. De acordo com a literatura, os biossensores aparecem em quarto lugar na classificação das áreas de detecção de agentes patogênicos, atrás de PCR, contagem de colônia e ELISA.²⁶ Biossensores oferecem diversas vantagens como a habilidade para analisar fluidos complexos, alta sensibilidade, compatibilidade com tecnologia de microfabricação e instrumentações compactas, compatíveis com dispositivos portáteis.

1.5. BIOSSENSORES

Os biossensores podem ser definidos como um sensor que utiliza um material biológico, como por exemplo, enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido animal e vegetal, células, organelas, etc, imobilizado junto a um transdutor adequado (dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) o qual converte um sinal biológico em sinal

mensurável.²⁷ São classificados de acordo com o mecanismo de reconhecimento do analito, podendo ser eletroquímicos, óticos, térmicos ou sensíveis à variação de massa. Os biossensores eletroquímicos podem, ainda, ser classificados como potenciométricos, amperométricos e condutométricos, dependendo do sinal utilizado para monitorar a concentração do analito.²⁸

Os biossensores eletroquímicos que utilizam DNA, também chamados de genossensores, aparecem como uma alternativa viável em determinações de diferentes analitos em diversas amostras. A molécula de DNA apresenta características estruturais que permitem sua imobilização nas superfícies de eletrodos na forma simples,^{29,30} dupla³¹ ou tripla hélice³². Diversos materiais eletródicos podem ser modificados com DNA, entre eles, ouro,^{33,34} prata,³⁵ grafite,^{36,37} pasta de carbono,³⁸ carbono vítreo³⁹ e diamante dopado com boro.⁴⁰

Uma das finalidades dos biossensores de DNA é a análise e determinação de sequências de bases de DNA com o intuito de diagnosticar doenças,^{41,42} entre elas, a Hepatite C. A seguir são apresentados alguns trabalhos que usam esse tipo de dispositivo para detectar o HCV.

Skládal et al.⁴³ modificaram cristais de quartzo piezelétricos com oligonucleotídeos, estruturas que compõem o DNA, para detecção do vírus da Hepatite C em soro. Os eletrodos de ouro foram modificados com proteínas estreptavidina ou avidina para imobilização do DNA biotinilado. Os biossensores piezelétricos foram usados para monitoramento do DNA resultante da amplificação da reação em cadeia de polimerase ligada a transcriptase reversa (RT-PCR). As amostras de pacientes com Hepatite C foram analisadas e os resultados comparados com o procedimento padrão RT-PCR (kit de teste Amplicor[®] da Roche).

Riccardi et al.⁴⁴ imobilizaram a estreptavidina em matrizes híbridas de siloxano poli(propileno óxido). Probes de DNA biotiniladas específicas para Hepatite C foram, então, imobilizadas e a reação de hibridização foi monitorada por meio da amperometria a potencial constante, utilizando a enzima HRP como marcadora da reação e iodeto de potássio e peróxido de hidrogênio como substratos.

Um método de detecção eletroquímica da hibridização de DNA para detecção do HCV foi proposto por Riccardi et al.⁴⁵ As sondas de DNA do genótipo 1 do HCV, obtidas por meio de RT-PCR, foram imobilizadas em filmes de polipirrol depositados sobre microeletrodos. O monitoramento da hibridização com o DNA complementar foi realizado por meio de mudanças nas propriedades do filme, que causam uma diminuição da corrente em voltamogramas cíclicos.

Em experimentos prévios,⁴⁶ estudos quimiométricos foram aplicados no desenvolvimento de um biossensor para Hepatite C utilizando eletrodo de grafite. O monitoramento da hibridização da sonda de DNA imobilizada na superfície do eletrodo com o DNA complementar, presente nas amostras de soro de pacientes, foi realizado utilizando a enzima HRP como marcadora da reação de hibridização. As medidas de intensidade de corrente foram obtidas por meio da técnica de amperometria a potencial constante, utilizando peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) como substrato e mediador de elétrons, respectivamente.

No processo de hibridização, o eletrodo modificado com o ácido nucléico identifica a sequência de bases complementar por meio da formação de dupla hélice híbrida. Esta identificação é eficaz e específica na presença de outras sequências não complementares.⁴¹

Esse processo de hibridização pode ser detectado: a) pela variação de um sinal de corrente de um indicador redox, tais como complexos de metais catiônicos, daunomicina e corantes como o azul de metileno⁴⁷⁻⁴⁹ que tem diferentes afinidades pela dupla fita de DNA (formada após o processo de hibridização) quando comparada a simples fita de DNA; b) alterações no sinal eletroquímico relacionado à eletroatividade da guanina (detecção sem uso de marcador),⁵⁰⁻⁵² ou c) utilizando um marcador enzimático. Alguns trabalhos estão publicados na literatura usando as enzimas peroxidase⁵³⁻⁵⁶ ou fosfatase alcalina^{57,58} como marcadores do processo de hibridização. O uso de enzimas tem mostrado uma boa sensibilidade para as detecções eletroquímicas de DNA.^{56,59}

A habilidade para imobilizar a sonda de DNA de uma maneira previsível enquanto mantém sua afinidade pelo DNA complementar é determinante no desenvolvimento do biossensor. Consequentemente, independente da identidade molecular e da conformação da sonda, alguns aspectos gerais devem ser considerados. O tipo de imobilização apropriado é estritamente dependente das características do transdutor, uma vez que cada uma das diversas estratégias de imobilização pode conduzir à orientação adequada das biomoléculas. Além disso, tais aspectos permitem controlar a liberdade conformacional das sondas, tornando-as acessíveis para a interação com o DNA alvo, oferecendo impedimentos estéricos mínimos.

1.5.1. Tipos de imobilização de biomoléculas sobre a superfície de transdutores

O tipo de modificação de superfícies eletródicas é de grande importância, uma vez que modificações específicas a um determinado tipo de analito promovem um alto grau de seletividade, possibilitando o desenvolvimento de sensores de fácil manipulação e construção,

baixo custo, potencial de miniaturização e detecção rápida.

Diversas são as formas de imobilização de biomoléculas, com a vantagem de substituir a utilização desses materiais na forma solúvel, diminuindo o custo por análise e aumentando a rapidez e exatidão do processo. A seguir são destacados alguns tipos de imobilização.^{27,60}

A oclusão em gel consiste em aprisionar o material biológico nos espaços intersticiais de um polímero insolúvel. A estrutura do polímero não deve permitir a difusão das moléculas grandes, mas as moléculas menores dos substratos difundem-se livremente. As desvantagens são as possibilidades da biomolécula se lixiviar da rede polimérica (gel) e as propriedades não condutoras do gel.

Microencapsulação envolve o confinamento em pequenas esferas (micro cápsulas) de membranas semipermeáveis com poros que permitem somente a livre permeação de substratos e produtos da reação.

Outro método de interação, a adsorção física, normalmente é de caráter iônico, polar, ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas. Consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral por imersão do eletrodo nessa solução. A vantagem desse método é a simplicidade e a variedade de suportes que podem ser utilizados. Porém, a desvantagem está na biomolécula ser dependente de fatores como pH, solvente e temperatura.

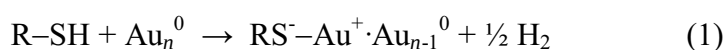
A imobilização por meio de ligação covalente ocorre por meio de ligação de grupos funcionais não ativos da biomolécula a grupos reativos ligados na superfície sólida do suporte insolúvel.

Uma forma de imobilização de diferentes moléculas que tem sido utilizada nas últimas décadas é por meio de monocamadas auto-organizadas. A formação de monocamadas auto-organizadas (SAM: *Self Assembled Monolayers*) emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização. São formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em uma solução constituída de moléculas anfífilas, ou seja, apresentam regiões polares e apolares. Enquanto que a adsorção deste tipo de molécula é um resultado da afinidade de um grupo funcional do adsorvente, que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato, a força motriz para a organização origina-se a partir de interações hidrofóbicas das cadeias ligadas ao grupo funcional. Uma variedade de materiais (como exemplo, superfícies de Pt, Au, Ag, Cu, etc.) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, álcoois, aminas, tióis, etc.) têm sido empregados na confecção de sistemas organizados.⁶¹

O uso das monocamadas auto-organizadas como plataforma para biomoléculas apresenta vantagens, tais como, flexibilidade para projetar vários grupos funcionais para formação de uma superfície hidrofóbica ou hidrofílica de acordo com o objetivo, quantidades mínimas de biomoléculas são requeridas para imobilização na SAM, razoável estabilidade por longos períodos, permitindo várias medidas, entre outras.⁶²

Dissulfetos, sulfetos e tióis são conhecidos por se coordenarem fortemente com ouro, prata, platina e cobre. No entanto, a maioria das monocamadas tem sido realizada utilizando o ouro como substrato devido seu caráter inerte e facilidade em se trabalhar em condições ambientes.⁶³

No caso de alcanotióis, o mecanismo de ligação com a superfície de ouro ocorre por uma adição oxidativa da ligação S-H, seguida por uma eliminação do hidrogênio, resultando, assim, na formação de uma espécie tiolada (1). Sugere-se que o hidrogênio eliminado combina-se com hidrogênio na forma molecular.



Uma adição oxidativa simples da ligação S-S que se une à superfície do ouro (2) é possivelmente o mecanismo da formação da monocamada auto-organizada de dissulfetos.⁶⁴



Soluções diluídas de tióis, dissulfetos ou sulfetos podem ser diretamente adsorvidas de solventes de alto grau de pureza, geralmente, etanol, tetrahidrofurano e diclorometano.

O tempo de reação exigido para obter uma SAM de tióis varia de alguns minutos a várias horas, enquanto dissulfetos e sulfetos requerem tempos mais longos. A cinética de formação de uma SAM é bifásica; primeiro uma adsorção controlada por difusão, seguido por um processo lento de reorganização. A adsorção rápida do tiol em ouro sugere que o primeiro passo é controlado cineticamente.⁶³

Diversas moléculas podem ser utilizadas para formação de SAMs para imobilização de DNA, tais como aminoetanotiol,⁶⁵ 2-mercaptobenzotiazol,⁶⁶ mercaptohexanol,⁶⁷ entre outras. O ácido lipóico se apresenta como uma molécula viável para formação de SAMs,⁶⁸ uma vez que apresenta dois átomos de enxofre, conferindo estabilidade à monocamada formada. O ácido lipóico é um dissulfeto cíclico que pode ser convertido à forma ditiol, solúvel em solventes orgânicos como etanol, DMSO e dimetilformamida. Há relatos, também, da utilização de derivados de ácido lipóico para formação de SAMs.^{69,70}

Apesar da grande versatilidade mostrada pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é usualmente limitada pela inativação da superfície. Tal problema pode ser solucionado pelo uso de eletrodos descartáveis. Algumas características básicas de um

eletrodo a serem consideradas são o baixo custo de construção, a reprodutibilidade da área e a possibilidade de produção em larga escala. Nesta situação, os eletrodos impressos (*screen-printed*)⁷¹ consistem nos eletrodos descartáveis mais populares, embora possam apresentar heterogeneidade e a irreprodutibilidade da superfície do eletrodo impresso.⁷² Exemplificando, no caso do ouro,⁷³ a qualidade da camada de metal depositada depende de muitos fatores, tais como o prévio depósito de outro material para melhor adesão. Bases metálicas preparadas por *sputtering*, na construção de biossensores, podem ser substituídas por substratos metálicos obtidos de discos compactos graváveis (CD-Rs).^{74,75} O processo de *sputtering* nos filmes de ouro em CDs graváveis é bastante conhecido por ser de simples construção e de baixo custo. Esses arranjos podem ser usados e descartados em casos de inativação, formação de óxidos nas superfícies, adsorções irreversíveis, etc, e têm mostrado performances analíticas comparáveis a eletrodos de ouro convencionais com maior versatilidade e menor custo.⁷²

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de uma metodologia de imobilização de sequências específicas de DNA na construção de um biossensor amperométrico para a detecção do vírus da Hepatite C.

Deste modo, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Elucidação do mecanismo de resposta do biossensor, baseado na interação entre a enzima peroxidase, marcadora da reação de hibridização entre o DNA imobilizado e o DNA complementar, e o mediador de elétrons ácido 5-aminossalicílico na presença do substrato peróxido de hidrogênio.
- Construção do eletrodo a partir de CDs graváveis de ouro (CDtrodo) e estudo da formação da monocamada auto-organizada de ácido lipóico sobre este eletrodo;
- Imobilização das biomoléculas (estreptavidina, sonda de DNA de HCV, DNA complementar e conjugado avidina-peroxidase) sobre o CDtrodo modificado com a monocamada auto-organizada, aplicando estudos quimiométricos;
- Aplicação do biossensor em amostras de soros de pacientes contaminados ou não com Hepatite C.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Enzima peroxidase (HRP, EC: 1.11.1.7, 987 U mg⁻¹), estreptavidina (STA), albumina de soro bovino (BSA), conjugado liofilizado biotina-peroxidase (b-HRP) tipo VI-A (264 U mg⁻¹) e conjugado avidina-peroxidase (a-HRP) foram fornecidos pela Sigma; fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄), fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e cloreto de sódio (NaCl) pela Mallinckrodt; peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e benzoquinona foram fornecidos pela Merck; ácido cítrico (HOC(COOH)(CH₂COOH)₂), ácido gentísico (C₇H₆O₄), ácido lipóico (C₈H₁₄O₂S₂) e ferrocianeto de potássio (K₄Fe(CN)₆) obtidos da Sigma-Aldrich; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foi fornecida pela Fluka, ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) foi fornecido pela Acros. Oligonucleotídeos 5'-biotinilados de 18-mer (b-DNA) (HCV 1: biotina-CGC TCA ATG CCT GGA GAT e HCV 3: biotina-CGC TCA ATA CCC AGA AAT) foram fornecidos pela Bioneer Oligo Synthesis Report, sendo a concentração da solução estoque de 200 µg mL⁻¹. As amostras de DNA complementar biotinilado (c-DNA) foram doadas pelo Laboratório do Grupo de Estudo das Hepatites Virais da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. O RNA do HCV foi extraído de soro de pacientes e um fragmento de DNA de 244 pares de base de uma sequência conhecida foi obtido por reação em cadeia de polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) na presença de primers biotinilados do ensaio comercial da Amplicor[®] Hepatitis C Virus Versão 2.0 da Roche.

As soluções tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 foram preparadas a partir dos sais Na₂HPO₄/NaH₂PO₄. As soluções tampão fosfato-citrato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 foram adequadamente preparadas a partir dos respectivos sais, segundo Gomori.⁷⁶

A proteína STA foi dissolvida em solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,0, (C_f = 1,0 mg mL⁻¹), a enzima HRP dissolvida em água na concentração de 1,0 mg mL⁻¹, sendo todas as soluções armazenadas em alíquotas no congelador a -4 °C como solução estoque.

O monitoramento da atividade da enzima HRP foi realizado empregando-se H₂O₂ e 5-ASA, sendo que a solução estoque de H₂O₂ 0,07 mol L⁻¹ foi preparada em água pura imediatamente antes do uso e a solução estoque de 5-ASA 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo o sólido em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0, seguido por aquecimento a 60 °C por 5 minutos para completa solubilização.

As soluções citadas foram preparadas empregando-se água purificada de qualidade Milli-Q ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$).

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Empregou-se o sistema Milli-Q Ultra Pure Water System da marca Millipore, para a obtenção de água ultrapura. As medidas eletroquímicas foram obtidas empregando-se os Potenciostatos-Galvanostatos da PAR EG&G modelo 263 e da Autolab modelo PGSTAT 30. Uma célula eletroquímica de compartimento único de volume de 5 mL foi utilizada para as medidas, juntamente com um sistema de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho (CDtrodos de ouro, perfazendo uma área geométrica de $0,0707 \text{ cm}^2$ e eletrodo de grafite com área geométrica de $0,0912 \text{ cm}^2$), eletrodo de referência ($\text{Ag}|\text{AgCl}(\text{KCl}_{\text{sat}})$) e o eletrodo auxiliar (Pt, área de 1 cm^2). A célula eletroquímica foi colocada em uma gaiola de Faraday e conectada a um sistema de terra próprio para o sistema eletroquímico ($R = 2,00 \Omega$). As medidas de absorvância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro da Hewlett Packard modelo 8453 e uma cubeta de quartzo. Todos os experimentos foram realizados a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. Construção do biossensor

A metodologia para a construção do biossensor para detecção do HCV é constituída pelas seguintes etapas:

- 1- construção do CDtrodo de ouro;
- 2- formação da monocamada auto-organizada (SAM) de ácido lipóico;
- 3- imobilização da proteína estreptavidina (STA) via carbodiimida (EDC);
- 4- bloqueio da superfície eletródica com albumina de soro bovino (BSA);
- 5- ligação das sondas de b-DNA específicas para Hepatite C genótipo 1 ;
- 6- reação de hibridização com produto amplificado contendo o c-DNA biotinilado genótipo 1;
- 7- reação do conjugado avidina-peroxidase (a-HRP);
- 8- monitoramento amperométrico da HRP.

Após cada uma das etapas, ilustradas na Figura 2, os eletrodos foram lavados em solução tampão fosfato pH 7,0 para remoção das moléculas fracamente adsorvidas. A

superfície de ouro na Figura 2 representa parte do eletrodo de trabalho, cujo diâmetro foi de 3,0 mm. A atividade enzimática foi monitorada por amperometria a potencial constante utilizando o sistema de substratos 5-ASA/H₂O₂.⁷⁷

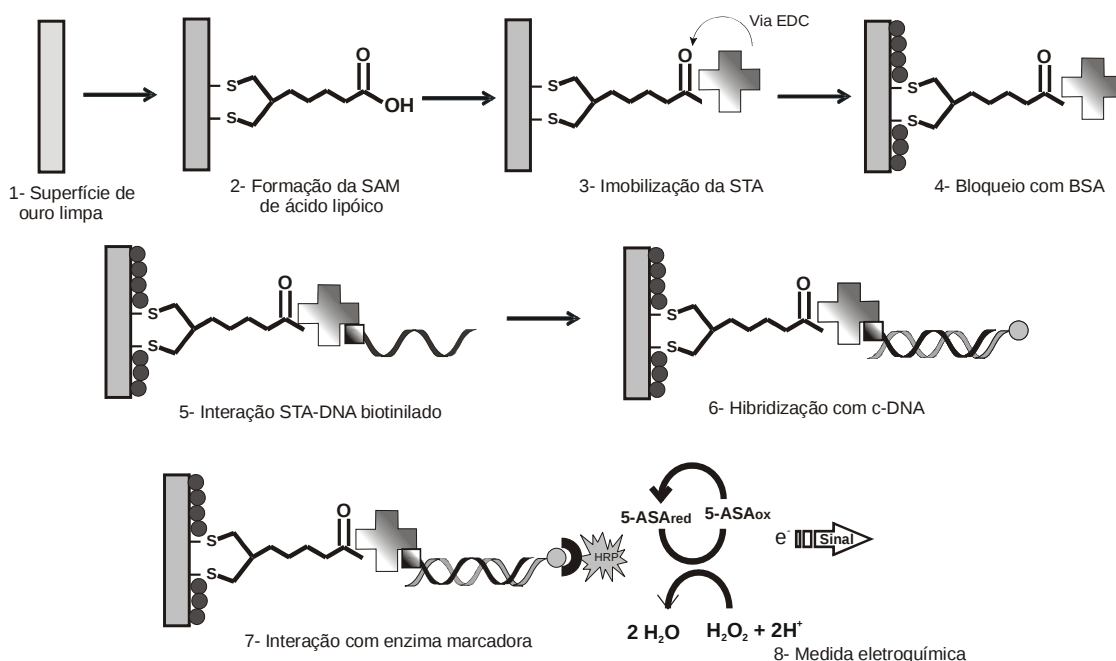


Figura 2: Esquema de construção do biossensor para o HCV.

Uma vez que a enzima HRP é a marcadora da reação de hibridização DNA-cDNA, a presença da enzima imobilizada é o que caracteriza a resposta positiva para Hepatite C. Na ausência do DNA complementar não ocorre a hibridização, consequentemente não há imobilização da HRP, correspondendo a uma resposta negativa para a doença. Deste modo, é necessário compreender a resposta eletroquímica da enzima na presença dos substratos.

Sendo assim, antes da construção do biossensor foi realizado um estudo da interação entre a enzima HRP em solução e o mediador de elétrons ácido 5-aminossalicílico, na presença do substrato peróxido de hidrogênio.

Na segunda parte, são apresentados os estudos sobre a otimização da construção e aplicação do biossensor para Hepatite C.

3.3.2. PARTE 1: ESTUDO DO MECANISMO DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR UTILIZANDO A ENZIMA HRP NA PRESENÇA DE 5-ASA E H₂O₂

3.3.2.1. Construção dos eletrodos a partir de CDs graváveis

Os CDs utilizados possuem, em sua constituição, uma fina camada de ouro de alta pureza e uniformidade, depositada por *sputtering*, a qual geralmente possui uma espessura de 50 a 100 nm e área total da ordem de 100 cm². Os CDs (marca Mitsui Archive Gold CD-R 100) foram submetidos à ação do ácido nítrico concentrado para a remoção da camada de policarbonatos que recobre o ouro da superfície do CD, tendo-se, então, acesso à camada metálica. Em seguida, lavou-se a superfície com água destilada em abundância, seguido de secagem à temperatura ambiente.⁷⁸ Posteriormente, área de trabalho foi delimitada utilizando-se fita de galvanoplastia (1KFA25 Kapton tape[®]) e encaixou-se o contato elétrico (fio de cobre) com auxílio de fita de teflon, obtendo-se o eletrodo de trabalho, como mostrado na Figura 3.

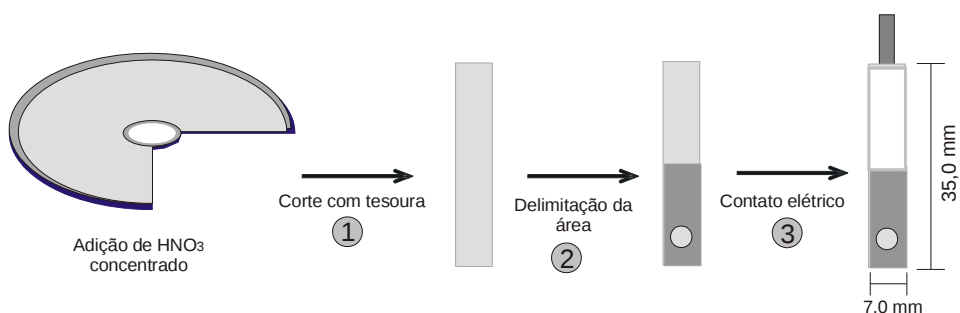


Figura 3: Esquema da confecção de CDtrodos: 1) área recortada do CD; 2) fita de galvanoplastia para delimitação da área do eletrodo; 3) contato elétrico e revestimento com fita de teflon.

3.3.2.2. Avaliação da limpeza da superfície dos CDtrodos de ouro

Um importante fator para que as medidas eletroquímicas sejam reprodutivas e confiáveis é que a superfície eletródica esteja completamente limpa, livre de quaisquer substâncias que possam atuar como interferentes, tais como óxido, gorduras, etc. Nesta etapa, foram testadas diferentes maneiras de limpeza dos eletrodos, após a retirada da película de policarbonatos por meio do ácido nítrico concentrado:

- 1- Limpeza mecânica com alumina;
- 2- Aplicação de ultra-som em meio de água ou etanol por 5 minutos;

3- Enxágue com água destilada e aplicação de potencial fixo em +0,5 V por 5 minutos em uma solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹;

4- Enxágue com água destilada e ciclagens sucessivas em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ de 0,0 a +1,5 V, $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$;

Após cada etapa, realizou-se um estudo por voltametria cíclica em solução de K₄Fe(CN)₆ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ de -0,4 a +0,7 V, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ para observação do perfil voltamétrico.

3.3.2.3. Construção dos eletrodos de grafite de lapiseira (PGE)

Eletrodos de grafite de lapiseira (PGE: *Pencil Graphite Electrode*) têm sido utilizados em diversos estudos eletroquímicos por apresentarem diversas vantagens, tais como, alta reatividade eletroquímica, rigidez mecânica, baixo custo, baixa corrente de fundo, amplo intervalo de potencial, facilidade na manipulação e modificação, além de miniaturização. Esses eletrodos, quando combinados com técnicas sensíveis e precisas, como voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, tornam-se atraentes para análises em baixas concentrações.⁷⁹

Neste trabalho, os estudos eletroquímicos para investigação da interação entre o 5-ASA e a HRP foram realizados utilizando eletrodos de grafite. Os resultados foram, na sequência, comparados com os obtidos sobre os CDtrodos de ouro.

Para a construção dos PGEs, utilizou-se grafites de lapiseira com 0,9 mm de diâmetro da marca Faber-Castell®. Inicialmente, os grafites foram limpos com papel absorvente para retirada de partículas sobre a superfície e, em seguida, a área geométrica foi delimitada com parafilme (American National CanTM) a uma altura de 3,0 mm, perfazendo uma área total de 0,0912 cm². O contato elétrico é feito diretamente entre o fio do equipamento e o eletrodo. Nenhum pré-tratamento foi necessário ao eletrodo antes das medidas.

3.3.2.4. Estudo da estabilidade da solução de 5-ASA

O 5-ASA é apresentado na forma sólida, de cor clara, com ponto de fusão de 275-280°C e pouco solúvel em água fria. No preparo da solução do 5-ASA, o sólido foi pesado e dissolvido em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 seguido de aquecimento a 60° C por 5 minutos, obtendo-se uma solução estoque de concentração 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹.

Para determinar a estabilidade da solução do reagente, realizou-se um estudo por voltametria de onda quadrada no intervalo de potencial de +0,3 a +0,8 V com frequência (f) de 150 Hz, amplitude (a) de 0,05 V e incremento de potencial (ΔE_s) de 0,002 V; e também por espectrofotometria UV-Vis, na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas imediatamente após o preparo e esfriamento da solução e após 2, 4, 6 e 8 horas, sendo que a solução foi mantida à temperatura ambiente no intervalo entre cada medida. As intensidades de corrente de pico de oxidação e as intensidades das bandas de absorção foram então comparadas. Deste modo, foi possível obter a estimativa da estabilidade da solução do ácido 5-aminossalicílico.

3.3.2.5. Comportamento eletroquímico do 5-ASA sobre eletrodo de grafite

O comportamento eletroquímico do 5-ASA sobre eletrodo de grafite foi avaliado por voltametria cíclica em um intervalo de potencial de -0,3 a +1,0 V. Estudou-se a influência da velocidade de varredura (v) na oxidação do 5-ASA a uma concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, sendo que as velocidades empregadas foram 20, 50, 100, 200, 300 e 500 mV s^{-1} .

Na sequência, varreduras sucessivas foram realizadas no mesmo intervalo de potencial, na velocidade de 200 mV s^{-1} para se observar a possível adsorção do analito na superfície do eletrodo e subsequente formação de produtos eletroativos.

3.3.2.6. Avaliação da interação do 5-ASA com a HRP na presença de H_2O_2

Peroxidasas são enzimas que catalisam a oxidação de uma gama de compostos através do peróxido de hidrogênio ou por peróxidos orgânicos (ROOH). A Horseradish Peroxidase (HRP) é um exemplo de enzima extracelular que participa no crescimento, diferenciação e polimerização de componentes da parede celular de plantas, além de atuar na oxidação de metabólitos secundários essenciais para reações de defesa contra agentes patogênicos. A enzima HRP tem sido amplamente empregada em química analítica por manter uma resposta estável por longos períodos de tempo a temperatura ambiente e em um amplo intervalo de pH, além de ser relativamente barata e encontrada, comercialmente, em diversos graus de pureza.

Uma das aplicações comuns da HRP tem sido na construção de biossensores utilizando mediadores de elétrons. Esses mediadores facilitam a transferência de elétrons do sítio ativo da enzima oxirredutase até a superfície do eletrodo de trabalho.⁸⁰

Em geral, um mediador de elétrons é uma partícula de baixo peso molecular e pode ser adicionado diretamente na solução do eletrólito ou ser imobilizado na superfície do eletrodo. No entanto, algumas moléculas usadas como mediador, por exemplo, corantes orgânicos como azul de metileno, ftalocianinas ou violeta de metila, são tóxicos, sensíveis à variação de pH e podem sofrer autooxidação. Portanto, há a necessidade da escolha de um mediador apropriado.

Uma variedade de moléculas doadoras de elétrons tem sido utilizada em ensaios com HRP, entre elas hidroquinona, ácido ascórbico, ferroceno e iodeto.^{81,82} O 5-ASA também tem sido utilizado como mediador para HRP em detecções óticas, potenciométricas e amperométricas.^{77,83,84}

A enzima peroxidase sofre oxidação pelo peróxido de hidrogênio e, para retornar à sua forma nativa, oxida uma molécula doadora de elétrons. Neste caso, a molécula que agirá como doadora de elétrons é o 5-ASA. O monitoramento da reação de oxidação do 5-ASA catalisada ou não pela HRP foi conduzido em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 na presença de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ por voltametria cíclica no intervalo de potencial de -0,3 a +1,0 V, com velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Medidas por voltametria de onda quadrada do 5-ASA na presença de H_2O_2 e HRP nas concentrações citadas foram realizadas após diferentes tempos de reação entre os reagentes, nas condições voltamétricas de f: 50 Hz, a: 0,050 V e ΔE_s : 0,010 V.

Similarmente aos estudos eletroquímicos, medidas espectrofotométricas foram realizadas para determinar a interação do 5-ASA com a HRP na presença de H_2O_2 . Espectros de UV-Vis foram obtidos para a solução contendo a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP nas concentrações citadas, após diferentes tempos de reação.

3.3.2.7. Estudo da adição de benzoquinona e ácido gentísico ao sistema 5-ASA/ H_2O_2 /HRP

Após a avaliação da interação do 5-ASA com a HRP na presença de H_2O_2 , estudos da adição de benzoquinona e ácido gentísico foram realizados. A solução contendo a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP foi mantida em contato com o eletrodo por um tempo de reação de 5 minutos e em seguida, diferentes concentrações de benzoquinona ou ácido gentísico ($0,0$ $1,0 \times 10^{-5}$; $3,0 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$; $7,0 \times 10^{-5}$; $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foram analisadas. O monitoramento da reação foi realizado por voltametria de onda quadrada com as condições da técnica fixadas em f: 50 Hz, a: 0,050 V e ΔE_s : 0,010 V.

Espectros UV-Vis foram obtidos sob as mesmas condições para avaliar o efeito da adição dos reagentes na interação entre 5-ASA e HRP.

3.3.2.8. Comportamento eletroquímico do sistema 5-ASA/H₂O₂/HRP sobre CDtrodo de ouro

Uma vez compreendido o comportamento do sistema 5-ASA/H₂O₂/HRP sobre o eletrodo de grafite, um estudo foi realizado sobre o CDtrodo de ouro por voltametria cíclica empregando o intervalo de potencial de +0,3 a -0,3 V; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Sequencialmente, avaliou-se o efeito do potencial aplicado no monitoramento da catálise enzimática por amperometria a potencial constante.

3.3.2.9. Proposta de mecanismo de interação entre o 5-ASA e a HRP

A partir dos resultados eletroquímicos e espectrofotométricos sobre a investigação da interação entre o 5-ASA e a enzima HRP e com informações advindas da literatura, propôs-se elucidar o mecanismo de reação entre essas moléculas, de modo a compreender como é obtida a resposta do biossensor para a detecção do HCV.

3.3.3. PARTE 2: DESENVOLVIMENTO DO BIOSENSOR

3.3.3.1. Comportamento eletroquímico do ácido lipóico em solução sobre CDtrodo de ouro

Um estudo do comportamento do ácido lipóico sobre o CDtrodo de ouro foi realizado. Uma solução estoque do ácido lipóico foi preparada em etanol em concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo, em seguida, diluída em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 usada como eletrólito suporte,⁷⁷ a uma concentração final de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Inicialmente, um estudo por voltametria cíclica foi realizado empregando-se o intervalo de potencial de -0,30 a +1,2 V; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ para análise da oxidação. Em seguida um estudo da redução do ácido lipóico foi realizado de 0,0 a -1,0 V; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

3.3.3.2. Avaliação da formação da monocamada de ácido lipóico sobre a superfície do CDtrodo de ouro

O ácido lipóico contém um grupamento S-S, que possui alta afinidade pelo ouro, o que possibilita a utilização desta molécula para a formação de monocamadas auto-organizadas.⁶⁸

Um estudo preliminar para formação da SAM foi realizado. O CDtrodo, após limpeza, foi imerso em uma solução etanólica de ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ por 120 minutos. Voltamogramas cíclicos do $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de -0,1 a +0,55 V, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ foram obtidos antes e após a formação da monocamada e os resultados foram comparados.

Em seguida, novos estudos foram realizados utilizando uma solução diluída do ácido lipóico. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol. Essa solução foi diluída em água a uma concentração final de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (ou seja, etanol/água 1:10 v/v) e os CDtrodos foram imersos nessa solução por 15, 30, 60 e 120 minutos. Após cada tempo para a formação da monocamada, os eletrodos foram lavados e novos estudos voltamétricos foram realizados em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Deste modo foi possível obter uma estimativa do recobrimento da superfície do ouro por meio da comparação dos voltamogramas do ferrocianeto de potássio antes e após a modificação da superfície. Foram realizadas ciclagens sucessivas na solução do $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ para analisar a estabilidade da monocamada formada a cada tempo de imersão.

O efeito da velocidade de varredura de $0,1 \text{ mV s}^{-1}$ utilizando os CDtrodos modificados com a SAM após 15 e 120 minutos foi avaliado.

3.3.3.3. Influência da SAM sobre a atividade catalítica da enzima HRP em solução

A atividade catalítica da enzima HRP foi avaliada sobre CDtrodos contendo ou não a SAM de ácido lipóico.

Os CDtrodos foram submetidos à formação da SAM de ácido lipóico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (etanol/água 1:10 v/v) por 15, 30, 60 e 120 minutos. Em seguida, realizaram-se medidas de corrente por amperometria a $E_i = +0,150 \text{ V}$ e $E_{\text{aplicado}} = -0,050 \text{ V}$ em soluções contendo:

- 1- Somente solução tampão fosfato-citrato pH 5,0;
- 2- 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$;
- 3- 5-ASA, H_2O_2 e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$.

O objetivo do estudo é verificar se a monocamada formada dificulta a transferência de elétrons entre as espécies e o CDtrodo.

3.3.3.4. Imobilização da proteína STA via EDC sobre a SAM de ácido lipóico

Atualmente a possibilidade de obtenção de uma grande quantidade de dados numéricos tem crescido em todos os campos da ciência, incluindo a química analítica, devido ao desenvolvimento de novas técnicas e instrumentação que permitem uma resposta de forma mais rápida. Neste contexto, a aplicação de ferramentas estatísticas é de fundamental importância, principalmente para explorar e entender uma gama crescente de dados e informações originadas de um sistema.

Técnicas envolvendo a otimização multivariada têm sido aplicadas em química analítica por permitirem, dentre outras vantagens, a otimização de todos os fatores envolvidos no sistema com menor número de experimentos, maior rapidez e principalmente maior eficiência. Dentre essas técnicas, o planejamento fatorial é classificado como um método simultâneo, no qual as variáveis de interesse que apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. O planejamento fatorial pode ser representado por b^k , onde k é o número de variáveis e b é o número de níveis escolhidos. Planejamentos fatoriais do tipo 2^k são os mais comuns,^{85,86} e o número de ensaios necessários aumenta rapidamente com k , o número total de fatores investigados.

Na etapa de imobilização da STA, após a formação da SAM de ácido lipóico, os CDtrodos foram modificados com as biomoléculas como se segue:

1- Imobilização da STA via EDC: Carbodiimidas são comumente usadas para modificar grupos carboxilas. Podem ser usadas em combinações com aminas para criar ligações amidas com a carboxila ativada. Deste modo, a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) foi utilizada para ativar o grupamento carboxila da SAM de ácido lipóico para imobilização da STA. A EDC foi dissolvida em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 e a STA foi preparada utilizando-se a solução de EDC. Nesta fase, aplicaram-se estudos quimiométricos por meio do planejamento fatorial completo do tipo 2^3 para otimização das variáveis: concentrações da STA e EDC e o tempo de incubação dos CDtrodos na solução desses reagentes. A Tabela 1 apresenta os níveis alto e baixo aplicados para as variáveis.

2- Bloqueio da superfície com albumina de soro bovino (BSA): o bloqueio da superfície eletródica é utilizado para evitar adsorções inespecíficas. Após a imobilização da STA, os CDtrodos foram imersos em uma solução contendo BSA 1,0% por 30 minutos.

Tabela 1: Matriz de planejamento fatorial completo de três variáveis e dois níveis

Variável	Nível alto	Nível baixo
$C_{STA} \text{ (mg mL}^{-1}\text{)}$	0,1	0,01
$C_{EDC} \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$1,0 \times 10^{-2}$	$5,0 \times 10^{-3}$
$t_{\text{incubação}} \text{ (minutos)}$	60	30

3- Imobilização do conjugado biotina-peroxidase (b-HRP): utilizou-se a enzima HRP marcada com uma molécula de biotina, sendo que a imobilização da HRP ocorre por meio da alta afinidade entre a biotina e a STA. Assim, os eletrodos contendo a STA imobilizada e devidamente bloqueados, foram imersos em uma solução contendo b-HRP $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ por um tempo de incubação de 30 minutos.

A cada etapa de imobilização, os CDtrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato pH 7,0 para remoção das biomoléculas fracamente adsorvidas. Deve-se ressaltar que estes parâmetros foram estipulados de acordo com estudos anteriores.⁴⁶

As medidas foram realizadas por amperometria a $E_i = +0,150 \text{ V}$ e $E_{\text{aplicado}} = -0,050 \text{ V}$ em solução contendo 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e H_2O_2 e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.3.5. Imobilização das sondas de DNA e do conjugado a-HRP

O planejamento fatorial completo necessita de 2^k ensaios para sua execução, portanto, sua principal desvantagem é o grande número de ensaios que devem ser realizados a cada fator adicionado ao estudo. No entanto, muitas vezes, com um número menor de experimentos é possível alcançar as informações mais importantes, obtendo-se as mesmas conclusões caso fosse realizado um fatorial completo. Os planejamentos que apresentam estas características são conhecidos como planejamentos fatoriais fracionados. Existem diferentes tipos de planejamentos fatoriais fracionados como, por exemplo, as frações 1/2, 1/4, 1/8, 1/16...1/2^p de um planejamento $2^{(k-p)}$, em que k é o número de variáveis e p é o tamanho da fração. O tamanho da fração influenciará no possível número de efeitos a serem estimados e, consequentemente, no número de experimentos necessários.⁸⁷

3.3.3.5.1. Planejamento fatorial fracionado 2^{6-3}

Nesta etapa do trabalho, estudos quimiométricos usando o planejamento fatorial fracionado foram aplicados na otimização da imobilização das sondas de DNA. As variáveis a serem definidas compreendem a diluição (a partir da solução estoque $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tempo de incubação das sondas de DNA biotinizadas específicas para HCV; diluição (a partir do soro fornecido pelo Laboratório da Unicamp) e tempo de incubação da amostra positiva de HVC e, finalmente, concentração e tempo de incubação do conjugado a-HRP, utilizado como marcador da reação de hibridização.

Sendo seis as variáveis a serem otimizadas, compreendendo dois níveis para cada uma, um planejamento fatorial completo constaria de 2^6 experimentos, ou seja, 64 experimentos. Daí a necessidade de se realizar um planejamento fatorial fracionado, optando-se pelo 2^{6-3} , que é o número mínimo de experimentos a serem realizados. A Tabela 2 mostra os níveis alto e baixo empregados para as diferentes variáveis.

Tabela 2: Matriz de planejamento fatorial fracionado de seis variáveis e dois níveis

Variável	Nível alto	Nível baixo
Diluição b-DNA	1:8	1:80
t_{incubação} b-DNA (minutos)	30	15
Diluição c-DNA	1:1	1:4
t_{incubação} c-DNA (minutos)	60	30
Concentração a-HRP (mg mL^{-1})	0,003	0,001
t_{incubação} a-HRP (minutos)	60	30

Uma vez realizado um estudo exploratório por meio deste planejamento fatorial fracionado, as variáveis que têm maiores efeitos sobre o sistema foram identificadas. Assim, novos estudos foram realizados com base nos resultados obtidos.

3.3.3.5.2. Planejamento fatorial fracionado 2^{4-1}

Após o primeiro planejamento fatorial, no qual foi possível estabelecer alguns dos parâmetros, notou-se a necessidade da realização de um novo planejamento fatorial fracionado para as variáveis que apresentaram maior influência sobre o sistema, sendo elas a diluição e tempo de incubação do c-DNA e a concentração e tempo de incubação do conjugado a-HRP. Deste modo, foi realizado um planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{4-1} , no qual foi estabelecida a diluição do b-DNA em 1:80 por um tempo de incubação de 30 minutos, de acordo com o estudo anterior. Os níveis alto e baixo empregados neste estudo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Matriz de planejamento fatorial fracionado de quatro variáveis e dois níveis.

Variável	Nível alto	Nível baixo
Diluição c-DNA	1: 0,5	1:1
t_{incubação} c-DNA (minutos)	60	30
Concentração a-HRP (mg mL⁻¹)	0,030	0,003
t_{incubação} a-HRP (minutos)	60	30

Na sequência, todos os parâmetros foram fixados, variando-se somente a concentração do conjugado a-HRP com o intuito de se obter o máximo da resposta em termos de intensidade de corrente. Nesta fase, os eletrodos foram modificados conforme descrito e as concentrações de a-HRP empregadas foram 0,03; 0,05; 0,10; 0,30 e 0,50 mg mL⁻¹. Os estudos foram realizados na ausência (considerado como branco) e na presença do DNA complementar.

Todos os experimentos foram realizados utilizando o sistema de substratos 5-ASA e H₂O₂ nas concentrações $5,0 \times 10^{-4}$ e $3,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, respectivamente.

3.3.3.6. Determinação do valor cut-off e aplicação do biossensor em amostras positivas para HCV

Após a otimização de todas as etapas de modificação do CDtrodo de ouro no desenvolvimento do biossensor, o dispositivo foi aplicado em vinte amostras negativas para HCV para determinação do valor cut-off, o valor mínimo de intensidade de corrente que indica a presença de HCV, por meio da fórmula:

Cut-off = (média da intensidade de corrente de 20 amostras negativas) + (3 x desvio padrão)

O biossensor foi aplicado em vinte amostras positivas do genótipo 1 e em dez do genótipo 3.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PARTE 1: ESTUDO DO MECANISMO DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR UTILIZANDO A ENZIMA HRP NA PRESENÇA DE 5-ASA E H_2O_2

4.1.1. Avaliação da limpeza da superfície dos CDtrodos de ouro

Após a construção do CDtrodo, sem qualquer tipo de limpeza da superfície eletródica, foram traçados voltamogramas cíclicos em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de -0,4 a +0,7 V, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Observa-se na Figura 4 que os picos de oxidação e redução encontram-se bem separados e deformados, ocasionados pela dificuldade da transferência eletrônica na superfície do eletrodo.

A causa desse comportamento pode ser devido à ação do HNO_3 concentrado durante a etapa de retirada da película protetora que recobre o ouro, levando à oxidação de resíduos do policarbonato e também à formação de óxido de ouro estável sobre a superfície do eletrodo, acarretando a deformação do perfil voltamétrico.

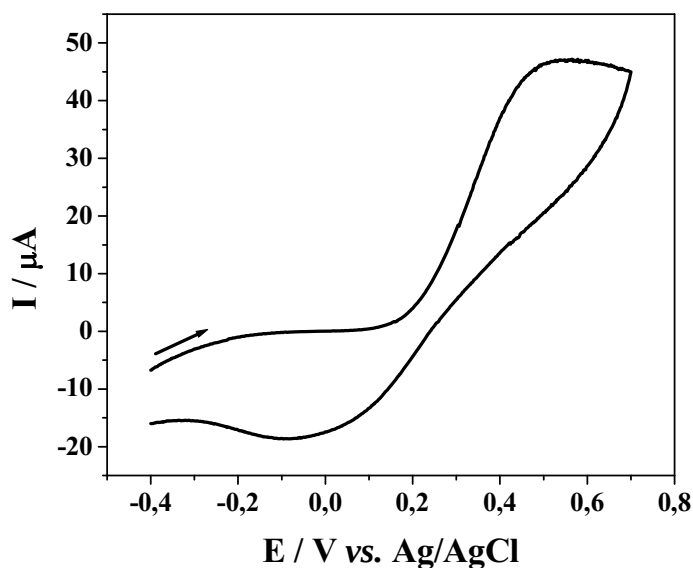


Figura 4: Voltamograma cíclico traçado em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ antes da limpeza da superfície do CDtrodo de ouro; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Para contornar essa dificuldade, diferentes métodos de limpeza da superfície do CDtrodo de ouro foram empregados. Inicialmente, foram investigados procedimentos de limpeza mecânica, com auxílio de flanela umedecida em solução de alumina ($0,05 \mu\text{m}$) ou aplicação de ultrassom em meio de água ou etanol. No entanto, visto que a camada de ouro

depositada sobre o suporte de policarbonato é muito fina, estes métodos ocasionaram o desprendimento do ouro da superfície do CDtrodo.

O método subsequente, na qual o CDtrodo foi submetido à aplicação de potencial fixo em +0,5 V por 5 minutos em solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹, apresentou uma melhora no perfil voltamétrico, como pode ser vista na Figura 5.

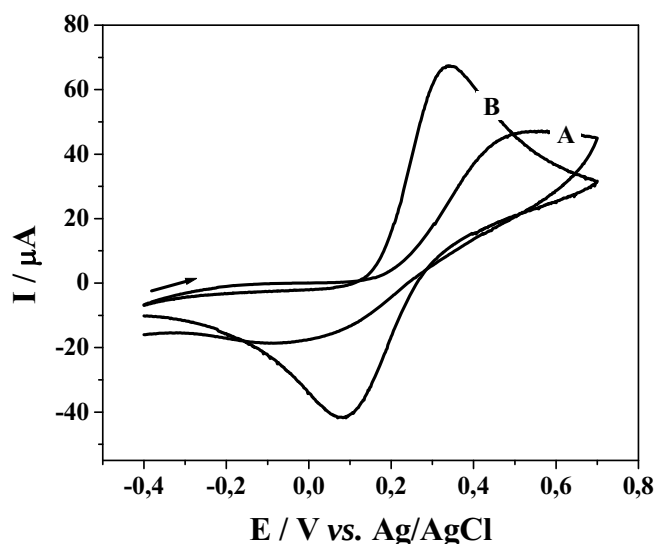
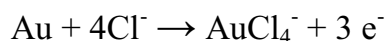


Figura 5: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 contendo K₄Fe(CN)₆ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ antes (A) e após (B) limpeza da superfície do CDtrodo de ouro utilizando aplicação de potencial fixo em +0,5 V em solução de NaCl 0,5 mol L⁻¹ por 5 min. (v= 50 mV s⁻¹).

Os picos de oxidação e redução ainda apresentaram significativa separação, com ΔE_{pico} de aproximadamente 335 mV. Quando é aplicado o potencial de +0,5 V em uma solução de NaCl, ocorre a redução do óxido formado na superfície do ouro devido ao uso de HNO₃ concentrado. No entanto, esse potencial não é suficientemente elevado para retirar todo o óxido da superfície, resultando na ligeira mudança do perfil voltamétrico. Outro fator relevante é que íons cloreto podem interagir com o ouro, formando complexos⁸⁸, como mostrado na reação abaixo:



Assim, a solução de NaCl não foi considerada apropriada para a limpeza da superfície eletródica, necessitando de um procedimento mais adequado.

O processo de limpeza seguinte consistiu em ciclagens sucessivas em solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹ no intervalo de potencial de 0,0 a +1,5V à uma velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ até obtenção do voltamograma cíclico típico, como mostrado na Figura 6. A adsorção de oxigênio sobre eletrodo de ouro ocorre entre 1,2V e 1,6V e a dessorção ocorre

entre 0,8V e 1,0V.⁸⁹ Este perfil voltamétrico é um indicativo de que a superfície do eletrodo encontra-se limpa.

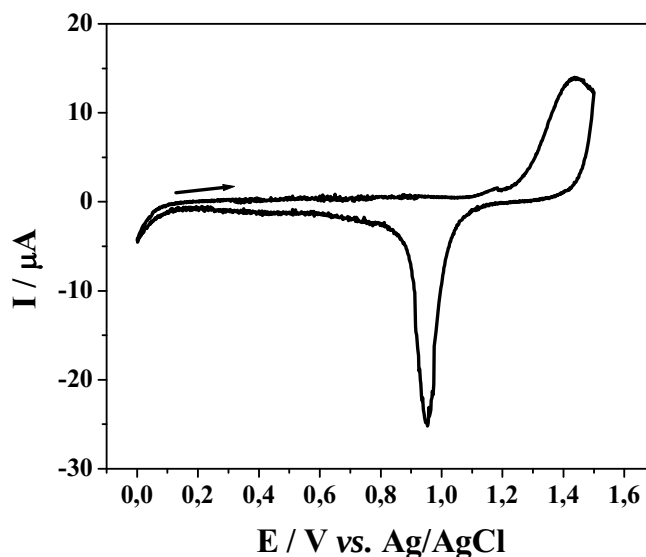


Figura 6: Voltamograma cíclico traçado em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} sobre CDtrodo de ouro, $v=100\text{mV s}^{-1}$.

Após esse pré-tratamento, realizou-se as medidas voltamétricas em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,0 x 10⁻² mol L^{-1} . Pode-se observar pela Figura 7 que houve significativa mudança no perfil voltamétrico do $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, com ΔE_{pico} de aproximadamente 105 mV. Embora não seja o valor esperado de 59,2 mV para um sistema reversível que envolve um elétron,⁹⁰ o resultado é satisfatório para o objetivo do estudo.

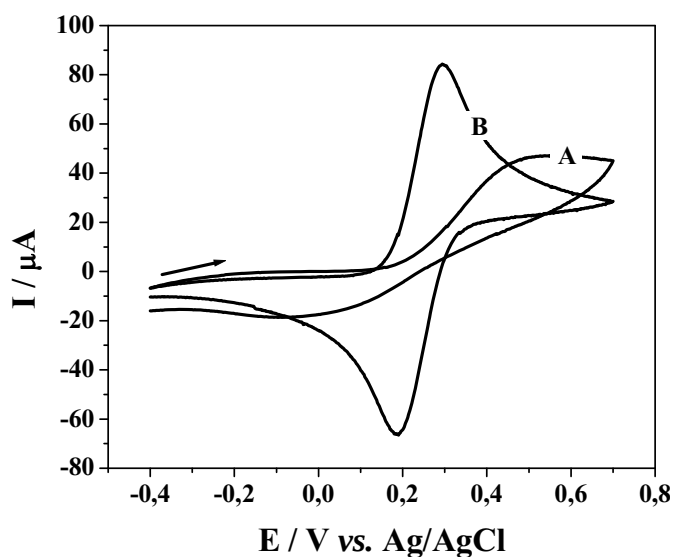


Figura 7: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L^{-1} pH 5,0 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1,0 x 10⁻² mol L^{-1} antes (A) e após (B) limpeza da superfície do CDtrodo de ouro por ciclagens sucessivas em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} . ($v=50\text{mV s}^{-1}$).

Sendo assim, a limpeza por meio de ciclagens sucessivas (10 ciclos em média) em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ foi definida para os experimentos subsequentes. A reprodutibilidade do procedimento empregado na construção dos eletrodos foi avaliada comparando-se os valores de picos de correntes anódica e catódica e o desvio padrão relativo obtido para 5 CDtrodos diferentes foi de 1,7%. Este resultado indica que as áreas dos eletrodos são muito similares.

4.1.2. Estudo da estabilidade da solução de 5-ASA

O 5-ASA é pouco solúvel em água, com solubilidade de $1,7 \text{ mg mL}^{-1}$ a 25°C . Os procedimentos para dissolução do 5-ASA encontrados na literatura incluem adição de HCl ou NaOH, e também o uso de metanol.⁹¹⁻⁹³ Esses procedimentos, no entanto, inviabilizam a utilização da solução do 5-ASA em ensaios com enzimas, uma vez que as biomoléculas podem sofrer desnaturação nessas condições. Como alternativa, quantidades adequadas do sólido de 5-ASA foram dissolvidas em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0, seguido de aquecimento a 60°C por 5 minutos para completa dissolução. Os estudos da estabilidade da solução foram conduzidos por voltametria de onda quadrada e por espectrofotometria imediatamente após o preparo e esfriamento da solução e após 2, 4, 6 e 8 horas de preparo.

A Figura 8 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos para os diferentes tempos. Observa-se que não houve significativa variação da intensidade de corrente de pico com o aumento do tempo, apresentando uma perda de 6,4% entre 0 e 4 horas, como pode ser visto na inserção da Figura 8.

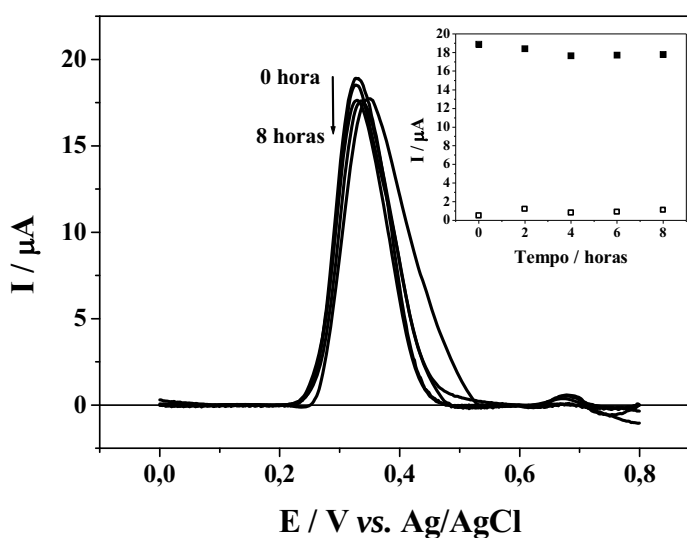


Figura 8: Voltamogramas de onda quadrada traçados em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 contendo 5-ASA $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, obtidos após diferentes tempos a partir do preparo. Inserção: intensidades de corrente de pico obtidas em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 em função do tempo, na ausência (□) e na presença (■) de 5-ASA. Parâmetros voltamétricos: f: 150 Hz, a: 0,05 V e ΔE_s : 0,002 V.

Medidas espectrofotométricas foram realizadas nas mesmas condições de meio reacional dos experimentos eletroquímicos e são mostradas na Figura 9. Do mesmo modo, a variação da intensidade da absorção nas bandas características do 5-ASA não foi significativa.

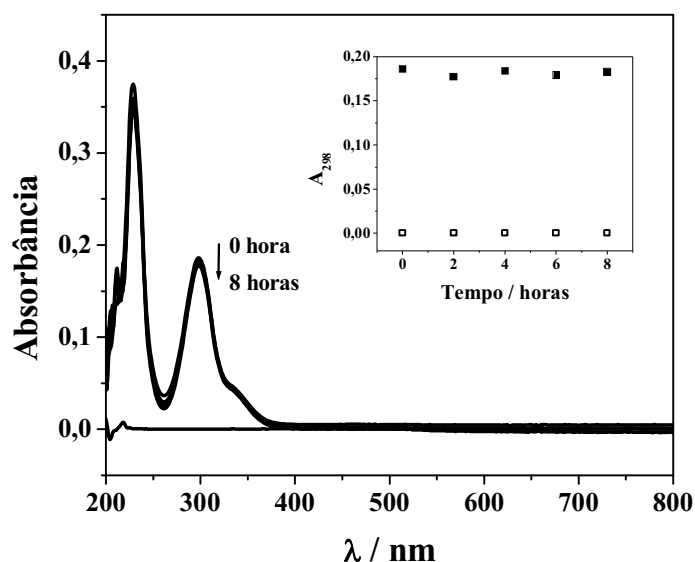
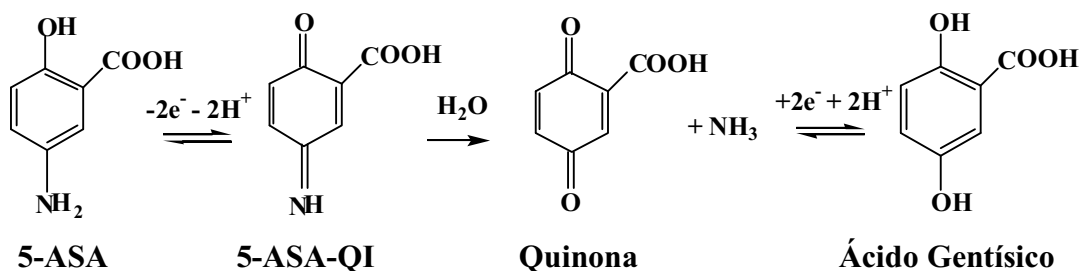


Figura 9: Espectros UV-Vis da solução tampão fosfato-citrato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 contendo 5-ASA 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ obtidos após diferentes tempos a partir do preparo. Inserção: valores de A₂₉₈ em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 em função do tempo, na ausência (□) e na presença (■) de 5-ASA.

Estes resultados indicam que não há degradação da solução do 5-ASA após até 8 horas do preparo. Uma vez que os experimentos utilizando o 5-ASA são realizados em menos de 4 horas, o procedimento para preparo da solução do reagente mostrou-se adequado.

4.1.3. Comportamento eletroquímico do 5-ASA sobre eletrodo de grafite de lapiseira (PGE)

De acordo com a literatura,^{93,94} a oxidação do 5-ASA é um processo com transferência de dois elétrons para formação da espécie eletroquimicamente ativa quinona-imina (5-ASA-QI) em uma reação quasi-reversível sobre eletrodo de carbono vítreo. Adicionalmente, em soluções aquosas, a imina sofre hidrólise formando a quinona correspondente. A quinona formada pode, então, se reduzir formando o ácido gentísico (Esquema 1).



Esquema 1: Reações de oxidação do 5-ASA sobre eletrodo de carbono vítreo.⁹⁴

Inicialmente, um estudo da oxidação do 5-ASA sobre PGE foi realizado por voltametria cíclica para confirmar a reação citada acima. A Figura 10 apresenta a influência da velocidade de varredura sobre a oxidação do 5-ASA. A baixas velocidades de varredura (20 e 50 mV s⁻¹), um pico de oxidação irreversível é observado, uma vez que não ocorre o pico de redução na direção catódica. Em altas velocidade de varredura (100 a 500 mVs⁻¹), o processo de oxidação se torna quasi-reversível, com o aparecimento de um pico em potencial em torno de +0,280 V na varredura catódica referente à redução da imina formada, visto que nessas velocidades, este processo ocorre mais rapidamente que a etapa de hidrólise.

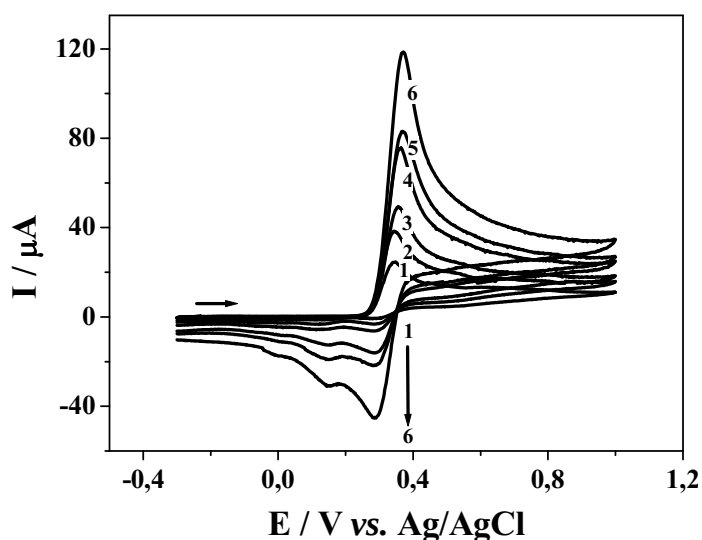


Figura 10: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 5-ASA $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ à velocidade de varredura de (1) 20; (2) 50; (3) 100, (4) 200; (5) 300 e (6) 500 mV s⁻¹.

Nos estudos da influência da velocidade de varredura na corrente de pico anódica (I_{pa}) observou-se uma dependência linear de I_{pa} com a raiz quadrada da velocidade ($v^{1/2}$) (Figura 11 A), com coeficiente de correlação linear (r) igual a 0,9939 e também ocorre uma relação linear do $\log I_{pa}$ com o $\log v$ (Figura 11 B) com $r = 0,9968$, evidenciando que o transporte de massa é controlado por difusão.

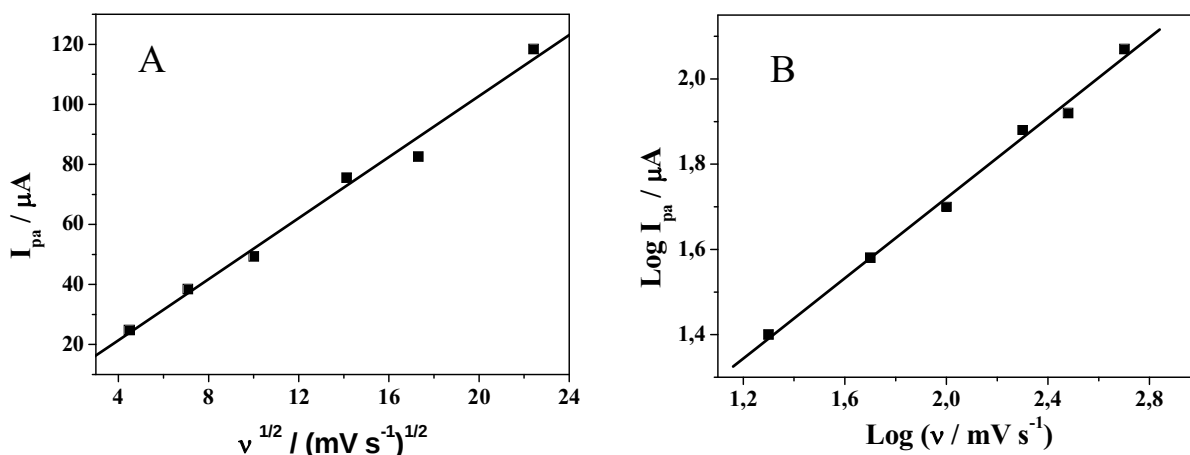


Figura 11: Gráficos da I_{pa} vs. $v^{1/2}$ (A) e $\log I_{pa}$ vs. $\log v$ (B).

A Figura 12 apresenta os voltamogramas obtidos após varreduras sucessivas do 5-ASA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em um intervalo de potencial de -0,3 a +1,0 V, com $v = 200 \text{ mV s}^{-1}$. Observa-se que há significativa diminuição da intensidade da corrente do pico em +0,37 V, possivelmente devido a adsorção de espécies formadas que dificultam a transferência eletrônica até a superfície do eletrodo. Nota-se também que, a partir da segunda varredura, há o aparecimento de dois picos em +0,65 V e em +0,80 V que diminuem com o aumento do número de varreduras. De acordo com a literatura⁹⁵, esses picos podem ser atribuídos à formação de filmes poliméricos eletroativos produzidos durante a oxidação do 5-ASA. Um ligeiro aumento na intensidade de corrente ocorre em potenciais em torno de 0,21 V na varredura anódica e em 0,0 V na varredura catódica, o que sugere o aparecimento de um par redox.

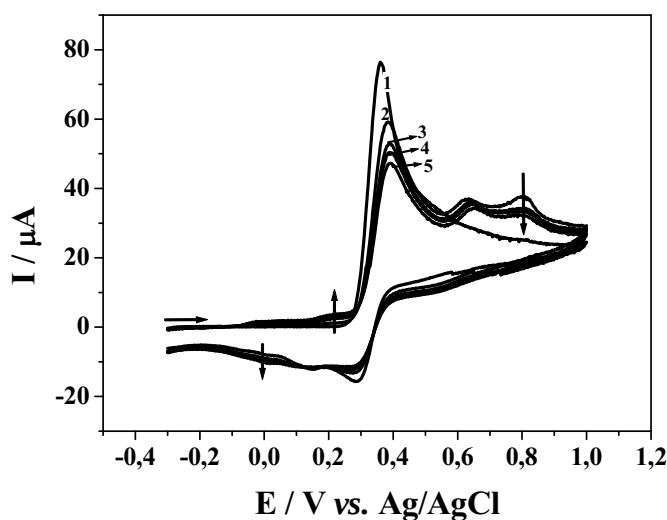


Figura 12: Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo 5-ASA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ após (1) primeira, (2) segunda, (3) terceira, (4) quarta e (5) quinta varredura sucessiva a 200 mV s^{-1} .

4.1.4. Avaliação da interação do 5-ASA com HRP na presença de H_2O_2

Uma vez estudada a reação de oxidação do 5-ASA sobre eletrodo de grafite, este processo foi avaliado na presença de H_2O_2 e HRP por voltametria cíclica (Figura 13). O pico em 0,35 V corresponde à oxidação do 5-ASA na ausência (linha A) e na presença (linha B) da enzima e de H_2O_2 . Observa-se que há significativa diminuição da intensidade de corrente do pico de oxidação (em torno de 49,3%) e um aumento na intensidade da corrente catódica (cerca de 2,7 vezes) em potencial ao redor de -0,065 V, mais claramente observado na inserção da Figura 13. O aumento da intensidade de corrente catódica na presença da enzima não é dependente da oxidação eletroquímica do 5-ASA. Esses resultados indicam que a enzima estaria consumindo uma fração do 5-ASA, consequentemente, diminuindo a corrente anódica e promovendo a formação de um produto que sofre redução no potencial mencionado.

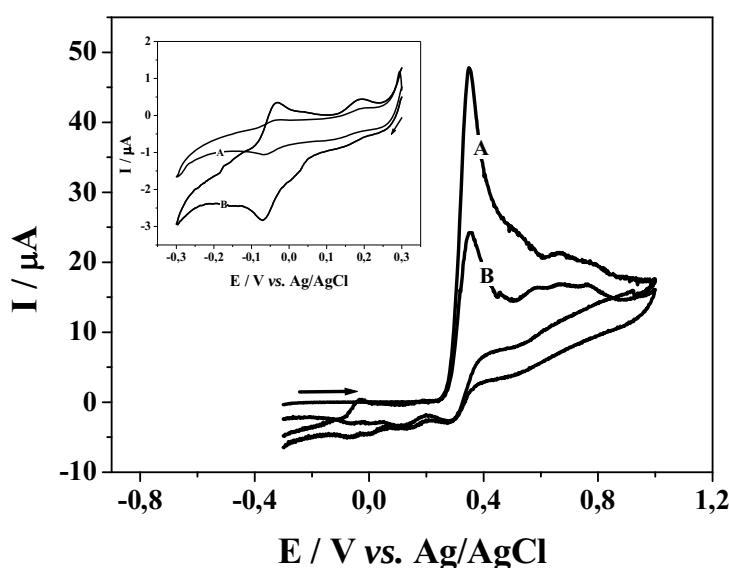


Figura 13: Voltamogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) do 5-ASA $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 na ausência (A) e na presença (B) de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. Inserção: Voltamogramas cíclicos no intervalo de 0,30 a -0,30 V do 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na ausência (A) e presença (B) de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$.

De acordo com Abdel-Hamid et al.⁹⁶ a oxidação do 5-ASA na presença da HRP também produz a 5-ASA-QI e, após sua hidrólise, a benzoquinona. No entanto, um conhecimento exato do produto desta reação de oxidação ainda é necessário.

Um acompanhamento da formação de produtos foi realizado por voltametria de onda quadrada, pois esta técnica apresenta maior sensibilidade na determinação de analitos e

produtos de reação. Os voltamogramas obtidos em solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 contendo a mistura 5-ASA/H₂O₂/HRP após diferentes tempos de reação são mostrados na Figura 14. Nota-se que há dependência da intensidade da corrente de pico com o aumento do tempo de reação até um tempo de 15 minutos. Após esse tempo, o aumento da intensidade de corrente não é significativo, indicando que não mais ocorre a formação de produtos.

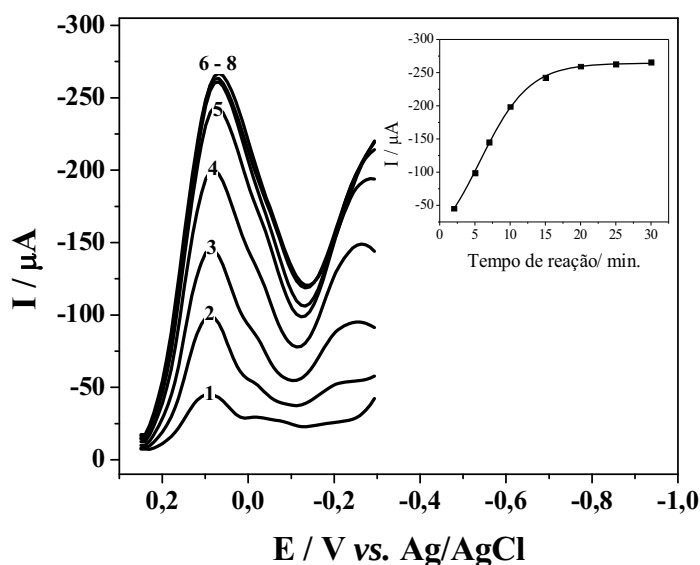


Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução contendo 5-ASA $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, H₂O₂ $3,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ e HRP $5,0 \times 10^{-4}$ U mL⁻¹ após tempos de reação de 2 (1); 5 (2); 7 (3); 10 (4); 15 (5); 20 (6); 25 (7) e 30 minutos (8). Condições voltamétricas: f: 50 Hz, a: 0,050 V e ΔE_s : 0,010 V. Inserção: Dependência da corrente de pico com o tempo de reação.

Uma indicação adicional da formação de produto é observada pela mudança na coloração da solução contendo a mistura dos reagentes 5-ASA, H₂O₂ e HRP. Inicialmente, a solução é incolor, no entanto, com o aumento do tempo de reação, a solução adquire uma coloração marrom-intenso. Tal variação de cor não ocorre na ausência de um dos reagentes.

Medidas de absorção baseadas em radiação ultravioleta e visível encontram vasta aplicação para identificação e determinação de espécies inorgânicas e orgânicas. Um espectro de absorção na região ultravioleta e visível é útil para detectar a presença de certos grupos funcionais que atuam como cromóforos.

Desta forma, espectros de UV-Vis foram obtidos para a solução contendo a mistura 5-ASA/H₂O₂/HRP após diferentes tempos de reação, similarmente aos estudos voltamétricos, e são apresentados na Figura 15. Observa-se o aparecimento de uma banda de absorção no comprimento de onda de 470 nm que aumenta com o aumento do tempo de reação, caracterizando a formação de produto. A partir de 10 minutos a absorbância torna-se

constante, sugerindo que há estabilização na formação de espécies. Na ausência de um dos reagentes, não há absorção nesta região do espectro.

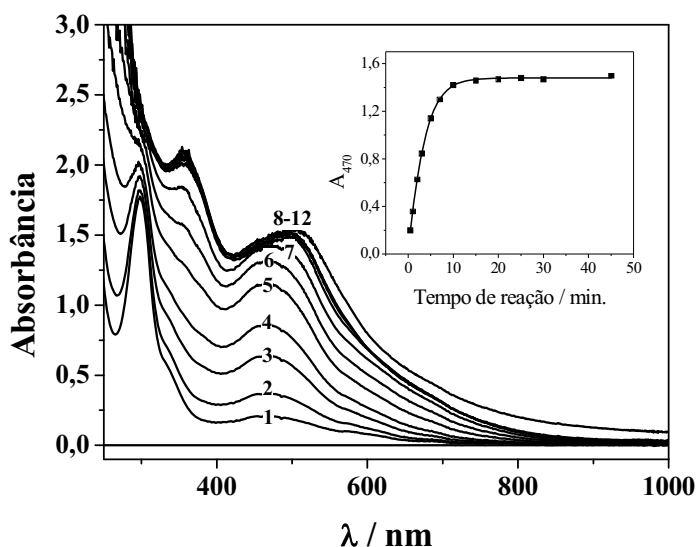


Figura 15: Espectros UV-Vis das soluções contendo 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ após tempos de reação de 0,5 (1); 1 (2); 2 (3); 3 (4); 5 (5); 7 (6); 10 (7); 15 (8); 20 (9); 25 (10); 30 (11) e 45 minutos (12). Inserção: Variação da absorbância em 470 nm com o aumento do tempo de reação.

4.1.5. Estudo da adição de benzoquinona e ácido gentísico ao sistema 5-ASA/ H_2O_2 /HRP

Como previamente mencionado, na oxidação eletroquímica do 5-ASA ocorre a formação de quinona e ácido gentísico. Desta maneira, para identificar se a benzoquinona ou o ácido gentísico é o produto da oxidação do 5-ASA pela HRP, voltamogramas individuais de tais compostos foram obtidos nas mesmas condições voltamétricas empregadas para a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP. Um pico largo em 0,020 V vs. Ag|AgCl foi obtido para a benzoquinona. Por outro lado, o ácido gentísico não é eletroativo quando é aplicado um intervalo de potencial na varredura catódica.

Sendo assim, alíquotas de solução padrão de benzoquinona foram adicionadas à solução contendo a mistura dos reagentes 5-ASA/ H_2O_2 /HRP após o tempo de reação de 5 minutos. A Figura 16 ilustra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para este estudo e a resposta individual da benzoquinona.

Observa-se que com o aumento da concentração de benzoquinona, há o aumento da intensidade de corrente. No entanto, ocorre o deslocamento do pico para potenciais menos positivos. Isto é devido ao largo pico da benzoquinona, indicando o possível acoplamento do pico de redução do sistema 5-ASA/ H_2O_2 /HRP e da benzoquinona adicionada. Por meio do

procedimento matemático de deconvolução do pico 6 da Figura 16, foi possível obter esses picos de redução separadamente, como podem ser vistos na Figura 17.

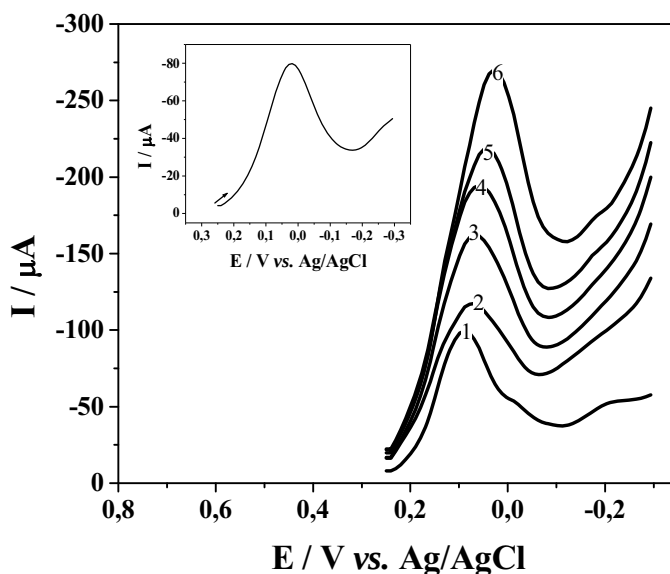


Figura 16: Voltamogramas de onda quadrada da solução contendo 5-ASA/ H_2O_2 /HRP em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 após tempo de reação de 5 minutos (1) e para concentrações de benzoquinona analisadas: 0,1 (2); 0,3 (3); 0,5 (4); 0,7 (5) e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (6). Inserção: resposta individual da benzoquinona. Condições voltamétricas: f: 50 Hz, a: 0,050 V e ΔE_s : 0,010 V.

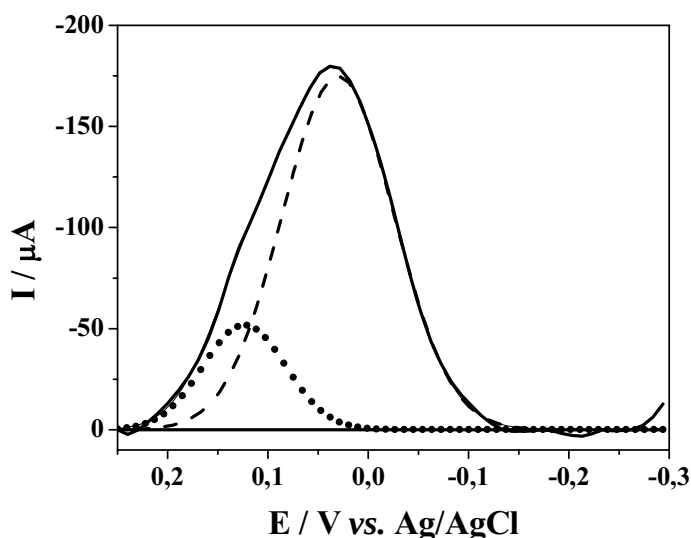


Figura 17: Voltamogramas de onda quadrada obtidos para a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP contendo benzoquinona $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Curva experimental (—) e curvas resultantes da deconvolução para a mistura 5-ASA/ H_2O_2 /HRP (•••) e para a benzoquinona (---).

Desta maneira sugere-se que o pico em 0,12 V na Figura 16 não seja correspondente ao processo redox da benzoquinona ou do ácido gentísico.

Estudos espectrofotométricos destes compostos também foram realizados para determinar se a banda de absorção em 470 nm é referente à formação de benzoquinona ou ácido gentísico. Aliquotas de solução destes reagentes foram adicionadas à solução contendo a mistura 5-ASA/H₂O₂/HRP após 5 minutos de reação. No entanto, a banda em 470 nm não apresentou aumento na intensidade da absorbância com a adição dos padrões, uma vez que os espectros de 5-ASA, benzoquinona e ácido gentísico puros apresentam bandas de absorção em valores de comprimentos de onda menores que a banda do produto (Figura 18).

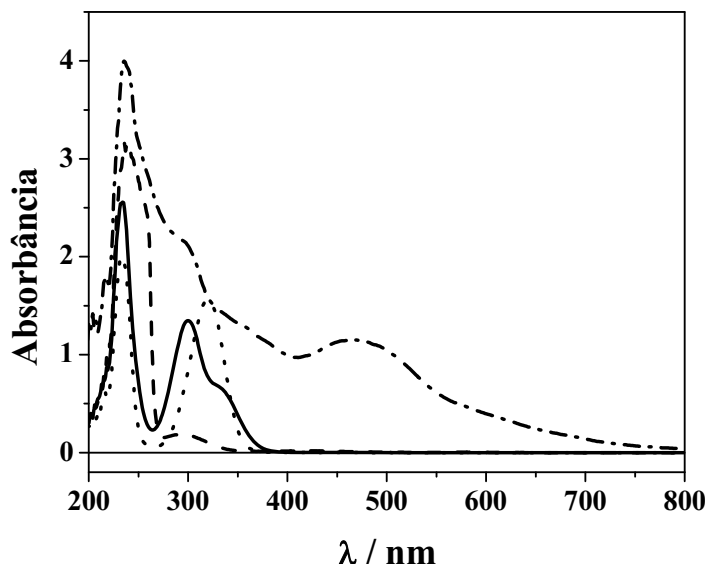


Figura 18: Espectros de UV-Vis da solução 5-ASA (—), benzoquinona (---) e ácido gentísico (···) em concentrações $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ preparados individualmente em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e da mistura 5-ASA/H₂O₂/HRP (-·-·-) após 5 minutos de reação.

Uma vez que a molécula de ácido gentísico é similar à do 5-ASA, um estudo foi realizado utilizando ácido gentísico/H₂O₂/HRP, em substituição ao 5-ASA. As medidas foram obtidas utilizando uma solução contendo ácido gentísico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H₂O₂ $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ após tempos de reação de 0, 1, 2, 5 e 10 minutos. No entanto, não houve variação na coloração da solução, além de não ocorrer mudança no perfil do espectro do ácido gentísico puro (Figura 19), indicando que não há interação deste composto com a enzima HRP e H₂O₂.

Este resultado sugere que a enzima HRP interage com o grupamento -NH₂ do 5-ASA, pois é a única diferença entre as moléculas do ácido 5-aminossalicílico e ácido gentísico.

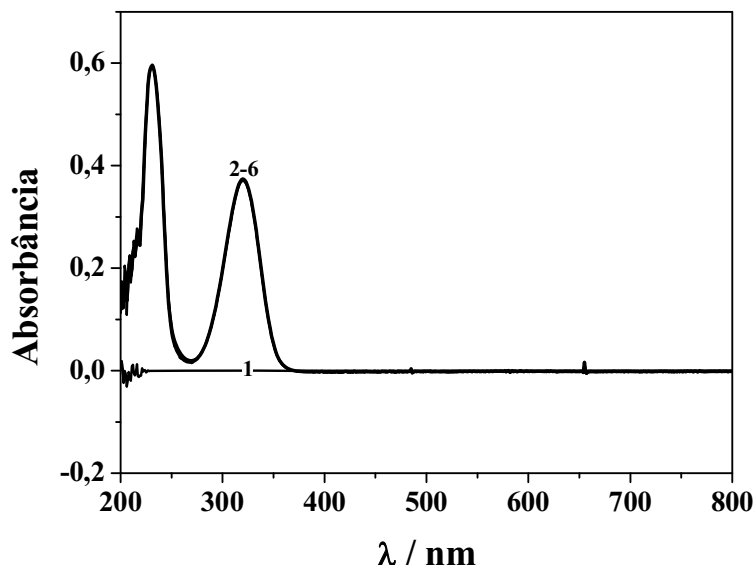


Figura 19: Espectros UV-Vis da solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 (1) e da mistura de ácido gentísico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ após tempos de reação de 0; 1; 2; 5 e 10 minutos (2-6).

4.1.6. Comportamento eletroquímico do sistema 5-ASA/ H_2O_2 /HRP sobre CDtrodo de ouro

Foram realizados estudos por voltametria cíclica utilizando os CDtrodos de ouro nas seguintes condições: 1) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, eletrólito suporte; 2) somente 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em solução tampão; 3) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e 4) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$.

A Figura 20 mostra que, na ausência da enzima, não ocorre processo eletroquímico sobre o CDtrodo (Figura 20, A-C). No entanto, quando a HRP está presente (Figura 20, D), ocorre uma significativa variação dos valores de intensidade de corrente catódica na região entre 0,0 e $-0,150 \text{ V}$, apresentando um comportamento similar ao obtido sobre o eletrodo de grafite (Inserção Figura 13).

Na sequência, realizou-se um estudo do efeito do potencial a ser aplicado na técnica amperométrica utilizando o CDtrodo de ouro, na ausência e na presença da HRP. Potenciais de $+0,100$ a $-0,250 \text{ V vs. Ag|AgCl}$ foram aplicados e avaliou-se o comportamento do sistema enzimático. A Figura 21 mostra que, na presença da enzima HRP, houve um aumento do valor de intensidade de corrente catódica em função do potencial aplicado em todo o intervalo estudado. No entanto, na ausência da HRP, a intensidade de corrente inicia um aumento a partir de $-0,075 \text{ V}$. Esse aumento se deve possivelmente à redução do H_2O_2 , não sendo viável

o monitoramento da atividade catalítica da enzima em potenciais maiores que $-0,050$ V. Deste modo, foi definido o potencial de $-0,050$ V para o monitoramento da atividade enzimática.

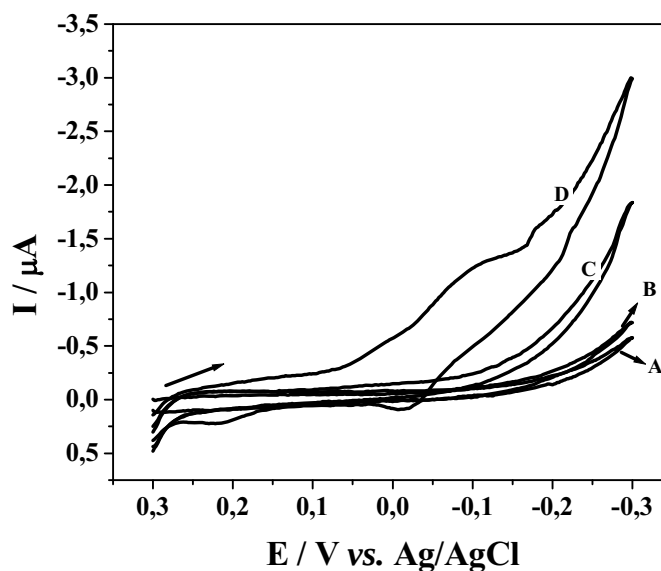


Figura 20: Voltamogramas cíclicos obtidos em: (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; (B) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; (C) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4}$ na presença de H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e (D) 5-ASA $5,0 \times 10^{-4}$, H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$; $v=50 \text{ mV s}^{-1}$.

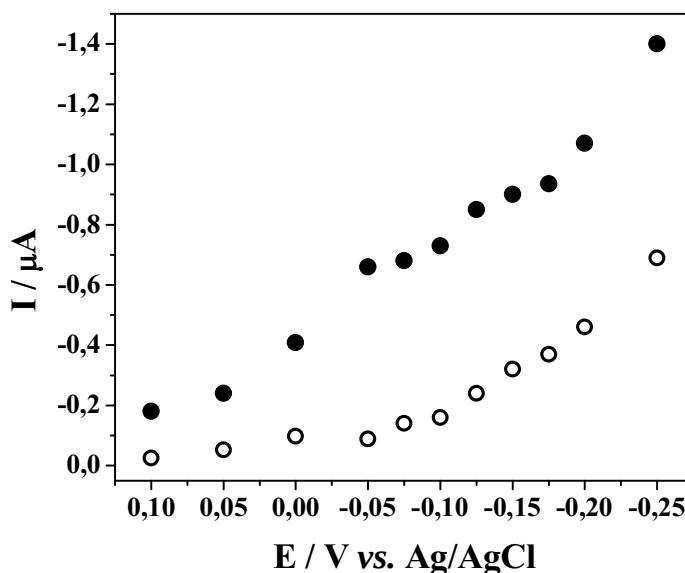
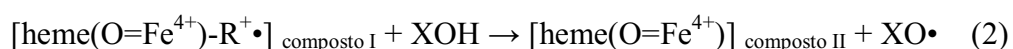
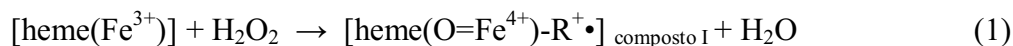


Figura 21: Efeito do valor de potencial aplicado no monitoramento amperométrico do sistema 5-ASA/ H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0, na ausência (○) e na presença (●) de $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$ da enzima HRP.

4.1.7. Proposta de mecanismo de interação entre 5-ASA e HRP

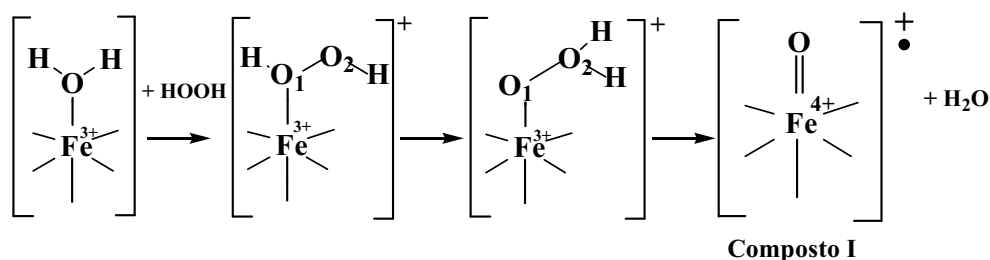
Algumas informações da literatura indicam que o 5-ASA e intermediários formam ligações covalentes com a hemoglobina,⁹⁷ uma biomolécula que contém um grupamento heme com Fe^{3+} . É conhecido também que o 5-ASA reage rapidamente na presença de H_2O_2 e baixas concentrações de Fe^{3+} ⁹³ e que, embora apresente dificuldades na síntese, o ferro pode formar complexos com ligantes como quinona-iminas.⁹⁸

A enzima HRP nativa contém um grupamento heme, geralmente uma ferroprotoporfirina IX, com quatro átomos de nitrogênio ligados a um Fe^{3+} . A quinta coordenação é por meio de um resíduo de histidina e a sexta coordenação permanece desocupada.⁹⁹ O ciclo catalítico da enzima HRP é dado por:¹⁰⁰



A equação 1 envolve a oxidação do grupo prostético heme da peroxidase pelo peróxido de hidrogênio (ou hidroperóxidos orgânicos) por dois elétrons e a formação de um composto intermediário, Composto I, consistindo do ferro oxiferril ($\text{O}=\text{Fe}^{4+}$) e do cátion radical π porfirínico. Na equação 2, o composto intermediário formado sofre uma reação de redução pela transferência de um elétron do doador XOH, formando um segundo composto intermediário, Composto II. Um elétron adicional pode ser transferido, proveniente de uma segunda molécula XOH (Equação 3), de forma que a enzima retorne a forma nativa (Fe^{3+}). Nas etapas 2 e 3, a espécie doadora de elétrons (XOH) é oxidada.

Filizola et al.¹⁰¹ sugere o mecanismo de formação do Composto I de acordo com o Esquema 2.

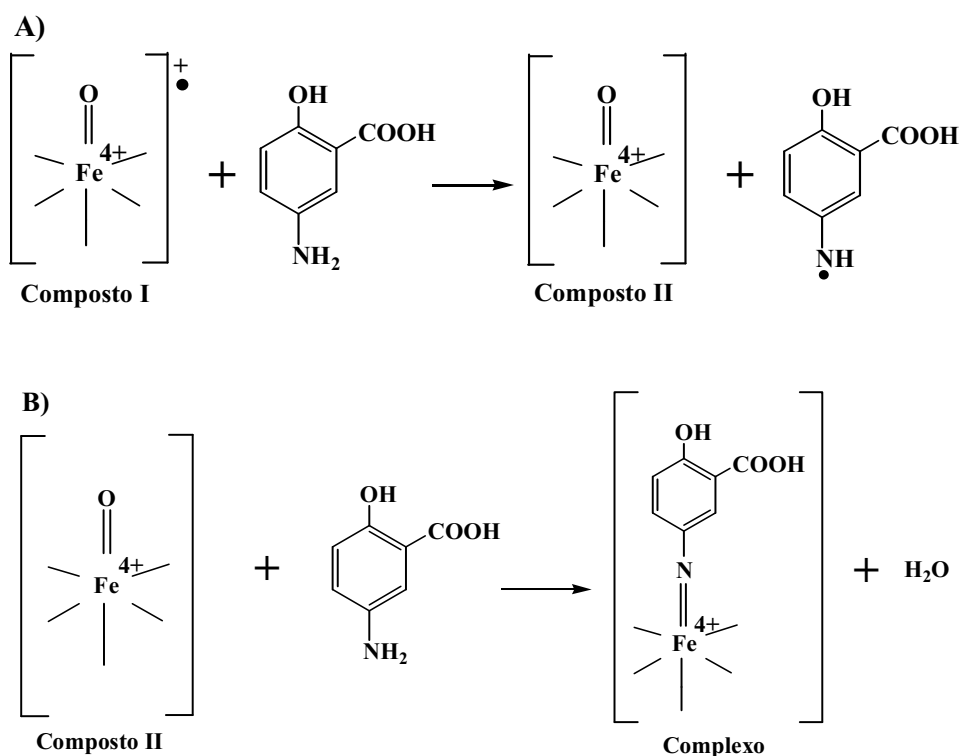


Esquema 2: Formação do Composto I por meio da oxidação da HRP pelo H_2O_2 , adaptado de Filizola et al.¹⁰¹

Uma vez que os estudos eletroquímicos e espectrofotométricos revelaram que o produto da reação entre o 5-ASA e a HRP não foi caracterizado como a benzoquinona ou o ácido gentísico, pretende-se elucidar o mecanismo de interação entre essas moléculas.

Propõe-se que, diferentemente do que foi descrito na literatura,⁹⁶ na reação com a HRP, o 5-ASA não forma o par redox quinona-imina/benzoquinona.

Sugere-se que, o 5-ASA, atuando como mediador de elétrons para a enzima HRP, possa ser oxidado no grupo -NH_2 pelo Composto I, com formação do Composto II (Esquema 3 A). Uma segunda molécula de 5-ASA reage com o Composto II e origina um complexo entre o Fe^{4+} e o grupo -NH_2 do 5-ASA (Esquema 3 B). A indicação desse sítio de interação é baseada no experimento no qual a enzima não apresentou interação com o ácido gentísico, cuja molécula diferencia do 5-ASA pela ausência do grupo amina. Outra indicação desta interação é que a formação do complexo poderia inibir a hidrólise da quinona-imina, impedindo a formação da benzoquinona e, finalmente, do ácido gentísico, como demonstrado pelos estudos de voltametria de onda quadrada e espectrofotometria.



Esquema 3: Proposta do mecanismo de oxidação do 5-ASA pela enzima HRP na presença de H_2O_2 .

Outro indício é que a formação do complexo ocasiona a mudança na cor da solução e o aumento da corrente catódica entre 0,1 e -0,1 V e na banda de absorção em 470 nm. O ferro

tem uma razoável afinidade por nitrogênio, como observado por Bachas et al.¹⁰² e Lozano-Camargo et al.,¹⁰³ no complexo formado entre Fe^{2+} e 5-amino-1,10-fenantrolina em soluções aquosas.

Sendo assim, sugere-se que o mecanismo de resposta do biossensor amperométrico baseado na enzima HRP e o mediador 5-ASA é relativo à redução do complexo formado entre o Fe^{4+} e o grupo $-\text{NH}_2$ do 5-ASA.

4.2. PARTE 2: DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR

4.2.1. Comportamento do ácido lipóico em solução

Nesta etapa, realizou-se um estudo do comportamento eletroquímico do ácido lipóico em solução para avaliar a possível interferência do composto nos estudos amperométricos, no qual o potencial aplicado é de $-0,050\text{ V}$.

A resposta voltamétrica do ácido lipóico de concentração $1,0 \times 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$ preparada em etanol/solução tampão fosfato-citrato pH 5,0 (1:10 v/v, respectivamente), observada na Figura 22, apresenta um pico de oxidação (B), em $E = +0,94\text{ V}$, que pode ser atribuído ao fenômeno de adsorção dos grupamentos de enxofre sobre a superfície do ouro.¹⁰⁴

Estudou-se também o comportamento do ácido lipóico sobre CDtrodo de ouro quando realiza-se a redução do composto. A Figura 23 apresenta o voltamograma obtido, na qual o pico de redução que ocorre em $E = -0,78\text{ V}$ é atribuído à redução da ligação S–S com formação do grupo $-\text{SH}$.

Sendo os potenciais de oxidação e redução relativamente altos, o ácido lipóico pode ser utilizado para a formação da SAM na construção do biossensor, sem interferir na redução da enzima HRP.

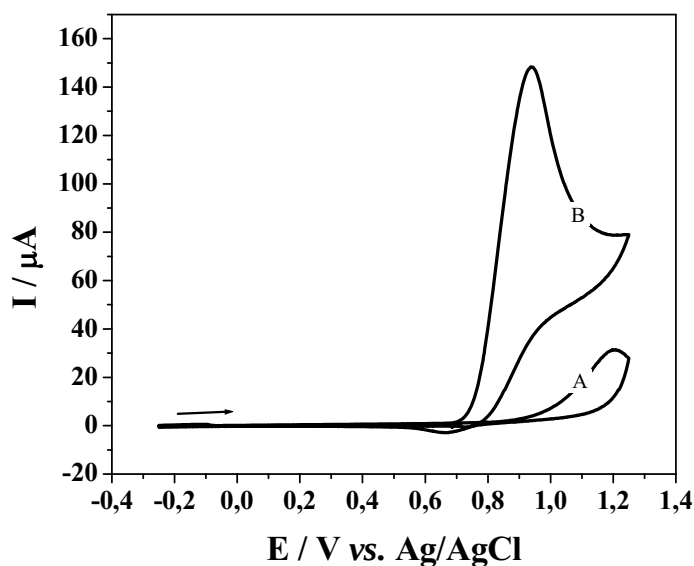


Figura 22: Voltamogramas cíclicos traçados em (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e (B) ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; utilizando o CDtrodo de ouro, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

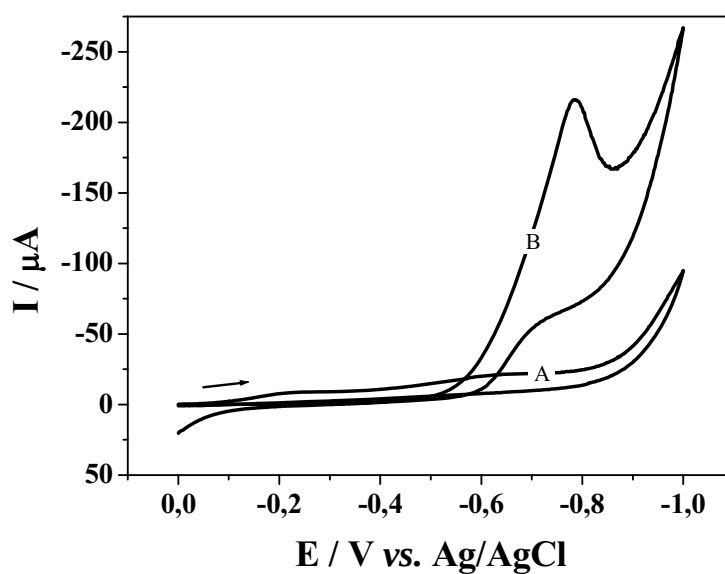


Figura 23: Voltamogramas cíclicos obtidos em (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e (B) ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$; utilizando o CDtrodo de ouro, $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

4.2.2. Avaliação da formação da monocamada auto-organizada de ácido lipóico sobre a superfície dos CDtrodos de ouro

Em muitos casos, a formação de SAMs ocasiona uma barreira na transferência de elétrons e o uso de um par redox em solução pode ajudar a compreender a distribuição da monocamada auto-organizada sobre o eletrodo. Deste modo, inicialmente utilizou-se

$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ antes e após a modificação da superfície do CDtrodos por 120 minutos com uma solução de ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em etanol absoluto.

A Figura 24 apresenta os voltamogramas obtidos e observa-se que, após a modificação da superfície com ácido lipóico, houve uma total inativação da superfície eletródica, uma vez que não ocorreu o processo redox do $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Figura 24 C). Esse comportamento ocorreu devido à alta concentração de ácido lipóico preparada em etanol absoluto, o que favoreceu a interação do composto com o ouro, levando a uma maior densidade de moléculas na superfície do eletrodo e a presença de poucos defeitos ou *pinholes*. Os defeitos são resultados da adsorção imperfeita do alcanotiol ou dissulfito sobre o ouro durante a etapa de auto-organização ou como consequência do enxágue, armazenamento ou uso do eletrodo. Esses defeitos são responsáveis pelo contato entre a molécula redox e o eletrodo.

Quando há um grande número de defeitos e estes estão próximos o suficiente de forma que a camada de difusão de cada um se sobreponha, a resposta voltamétrica terá características de processos controlados por difusão linear. Por outro lado, se os defeitos são pequenos em número e não se sobrepõem, eles poderão agir como um arranjo de microeletrodos e a contribuição da difusão radial passa a ser significativa frente à difusão linear.¹⁰⁵

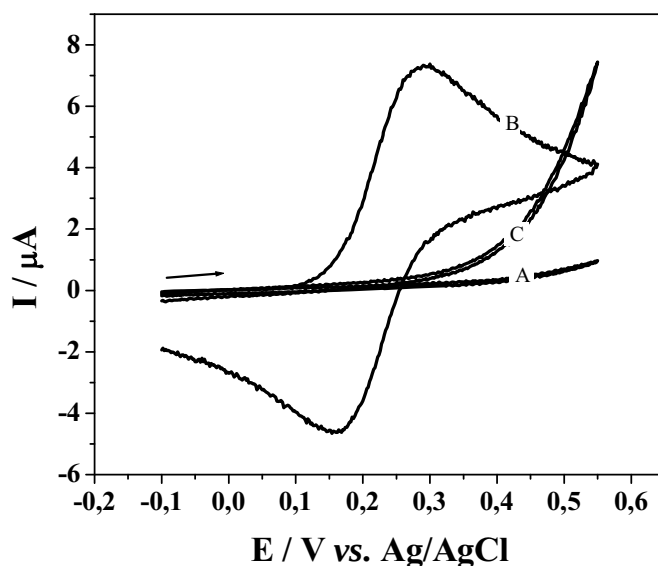


Figura 24: Voltamogramas cíclicos obtidos em (A) solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0; (B) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ antes da modificação e (C) $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ após modificação as superfície com ácido lipóico $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ por 120 minutos; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Desta maneira, novos experimentos foram realizados utilizando uma solução mais diluída do ácido lipóico e diferentes tempos para a formação da SAM.

A avaliação do tempo de formação da SAM foi realizada utilizando-se uma solução de ácido lipóico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol/água (1:10 v/v). Os CDtrodos foram imersos nesta solução por 15, 30, 60 e 120 minutos. Após a lavagem dos CDtrodos por imersão em uma solução 1:10 etanol/água, realizou-se estudos por voltametria cíclica empregando o $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. A seguir são apresentados os voltamogramas obtidos nas diferentes condições de formação da SAM.

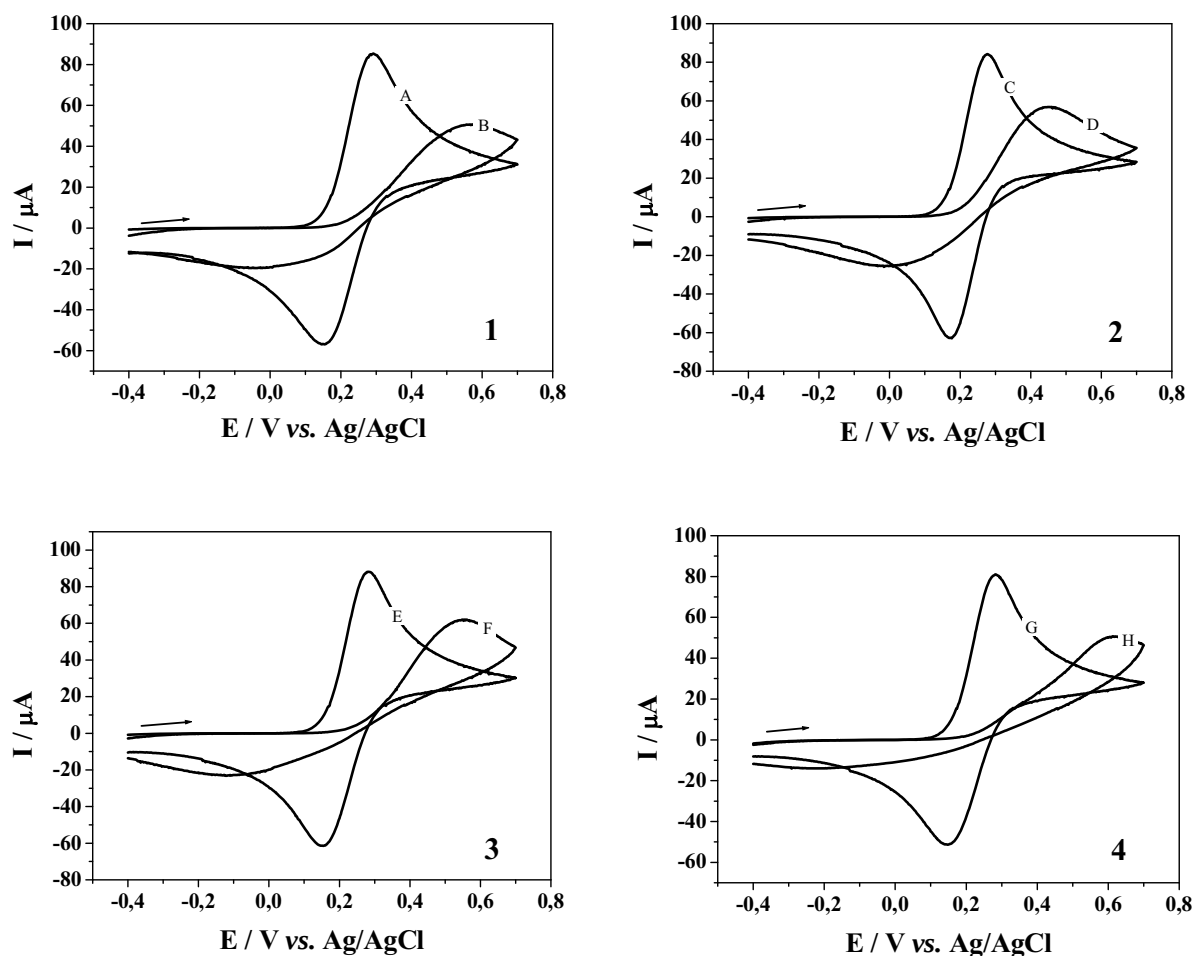
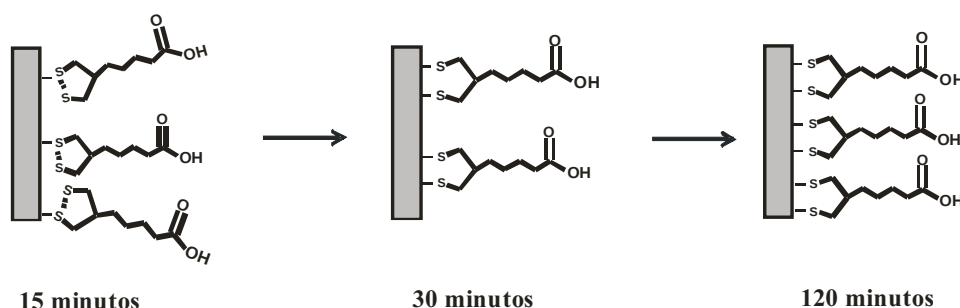


Figura 25: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ referentes a: **1)** (A) antes da modificação e (B) após modificação com ácido lipóico por 15 minutos. **2)** (C) antes da modificação e (D) após modificação com ácido lipóico por 30 minutos. **3)** (E) antes da modificação e (F) após modificação com ácido lipóico por 60 minutos. **4)** (G) antes da modificação e (H) após modificação com ácido lipóico por 120 minutos. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

A análise da estimativa da porcentagem de recobrimento da superfície dos CDtrodos pela SAM foi realizada por meio do cálculo da área do pico de oxidação do $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ antes e após a modificação com o ácido lipóico. Para os tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos houve um recobrimento de aproximadamente 38%, 19%, 29% e 40%, respectivamente.

Esse resultado pode ser explicado por meio do entendimento da organização das moléculas na superfície do ouro. O acoplamento da molécula é uma etapa relativamente rápida, seguida por um processo de organização mais lento. Com 15 minutos de exposição do ouro ao ácido lipóico, há a interação da superfície com um grande número de moléculas do ácido lipóico, no entanto, pode ter ocorrido a adsorção de apenas um átomo de enxofre. Como aumento do tempo para 30 minutos, há uma organização da molécula, ocasionado o deslocamento de outras, liberando espaço na superfície (Esquema 4). A partir de 60 minutos, ocorre o aumento da concentração das mesmas sobre o ouro, daí o aumento gradativo da porcentagem de recobrimento.



Esquema 4: Adsorção do ácido lipóico sobre o CDtrodo de ouro após 15, 30 e 120 minutos de exposição.

Como os voltamogramas obtidos para os tempos de modificação de 15 e 120 minutos apresentaram perfis semelhantes, realizou-se um estudo por voltametria cíclica empregando o $K_4Fe(CN)_6$ de -0,4 a + 0,7 V a uma velocidade de varredura de $0,1 \text{ mV s}^{-1}$ com o objetivo de investigar um possível comportamento de microeletrodo. A Figura 26 corresponde aos voltamogramas obtidos para os eletrodos modificados nas condições descritas. As curvas em forma sigmoidal demonstram o comportamento esperado para o eletrodo de tamanho micrométrico, na qual o processo difusional não linear é predominante.

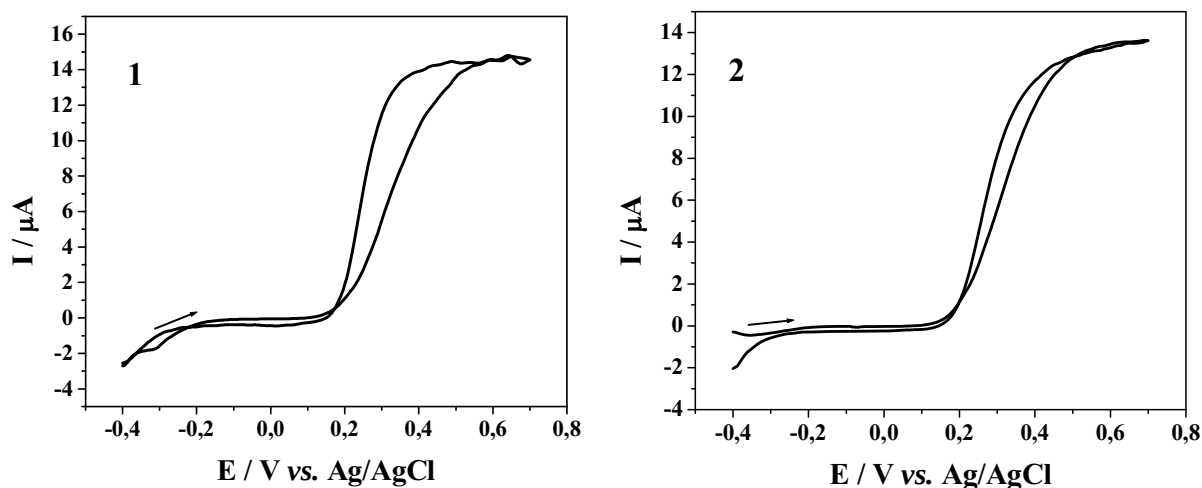


Figura 26: Voltamogramas cíclicos traçados em solução tampão fosfato-citrato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ após modificação do CDtrodo de ouro com a SAM de ácido lipóico por (1) 15 minutos e (2) 120 minutos aplicando a velocidade de varredura de $0,1 \text{ mV s}^{-1}$.

A etapa seguinte consistiu em estudar a estabilidade da SAM formada, por meio de ciclagens sucessivas em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ com os CDtrodos modificados. A Tabela 4 apresenta os valores em porcentagem da perda de recobrimento da superfície dos CDtrodos após as ciclagens.

Tabela 4: Porcentagem de perda do recobrimento da superfície dos CDtrodos de ouro pela SAM de ácido lipóico após ciclagens sucessivas em $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ para diferentes tempos de modificação.

Tempo de formação da SAM (minutos)	% de perda de recobrimento	
	3º ciclo	10º ciclo
15	11,60	15,10
30	3,76	13,70
60	9,97	12,10
120	0,49	6,50

Observa-se que há significativas perdas de recobrimento da superfície do CDtrodo já no terceiro ciclo para os tempos 15, 30 e 60 minutos, enquanto que para o tempo de 120 minutos, a SAM mostrou-se mais estável, uma vez que somente após o décimo ciclo houve relativa perda de recobrimento.

4.2.3. Influência da SAM sobre a atividade catalítica da enzima HRP em solução

A seguir, estudou-se a influência da monocamada de ácido lipóico sobre a atividade catalítica da enzima HRP em solução. Para isto, os CDtrodos, após limpeza com ácido sulfúrico, foram modificados com a SAM por 15, 30, 60 e 120 minutos. As medidas eletroquímicas foram realizadas por meio da técnica amperométrica, tanto com o CDtrodo limpo, como modificado nos diferentes tempos, nas soluções: a) somente solução tampão fosfato-citrato pH 5,0; b) sistema 5-ASA / H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; c) sistema 5-ASA / H_2O_2 na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. Na Figura 27 pode-se observar que, na ausência da HRP, as intensidades de corrente são similares e próximas de zero, independentemente se o CDtrodo esteja ou não modificado. Na presença da enzima, houve um significativo aumento da intensidade de corrente indicando a catálise enzimática na oxidação do 5-ASA, sobre os CDtrodos modificados ou não.

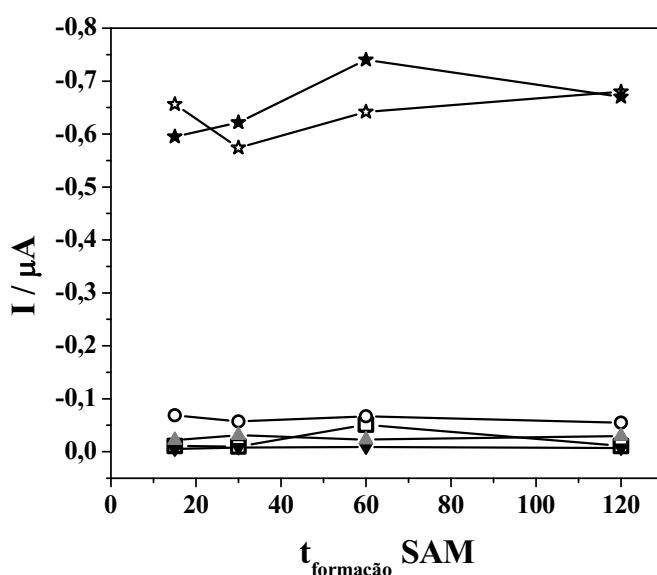


Figura 27: Intensidades de corrente obtidas por amperometria nas condições: 1) CDtrodo sem monocamada: (□) solução tampão fosfato-citrato pH 5,0; (○) 5-ASA/ H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; (☆) sistema 5-ASA/ H_2O_2 na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. 2) CDtrodo com monocamada em diferentes tempos de formação: (▼) solução tampão fosfato-citrato pH 5,0; (▲) 5-ASA/ H_2O_2 $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente; (★) sistema 5-ASA/ H_2O_2 na presença de HRP $5,0 \times 10^{-4} \text{ U mL}^{-1}$. O sistema operou a -0,050V vs. Ag|AgCl.

A variação do tempo de formação da monocamada não alterou significativamente o comportamento do sistema 5-ASA/ H_2O_2 na ausência ou na presença da HRP. Os valores intensidade de corrente na presença da enzima para os CDtrodos com ou sem a SAM foram

comparados por meio do teste t-pareado¹⁰⁶. Para $n=4$, o $t_{\text{calculado}}$ foi de 0,1426, menor que o valor de $t_{\text{crítico}}=3,18$ para 3 graus de liberdade e 95% de confiança, sendo, portanto, considerados estaticamente semelhantes.

Desta forma, o tempo de 120 minutos para a formação da monocamada de ácido lipóico foi escolhido, devido à estabilidade da SAM formada e por não influenciar na atividade da HRP.

4.2.4. Imobilização da proteína estreptavidina (STA) via EDC sobre a SAM de ácido lipóico

Normalmente, estudos que objetivam a otimização de parâmetros experimentais são realizados através de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez, o que, de maneira geral, impede o estabelecimento de ótimos verdadeiros, devido à correlação que pode existir entre as variáveis. Como alternativa, o planejamento fatorial pode ser utilizado.

Nesta etapa do trabalho, utilizou-se o planejamento fatorial completo do tipo 2^3 para otimização da imobilização da proteína estreptavidina (STA) por meio da 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), utilizando o conjugado biotina-peroxidase (b-HRP) como marcador.

A Tabela 5 apresenta as diversas combinações de experimentos para este planejamento fatorial e as intensidades de corrente obtidas.

Tabela 5: Matriz de planejamento fatorial completo 2^3 e intensidades de corrente obtidas

Experimento [*]	C_{EDC} ($\times 10^{-3}$ mol L ⁻¹)	C_{STA} (mg mL ⁻¹)	$t_{\text{incubação}}$ (min)	I / μA
1	5,0	0,01	30	$-0,333 \pm 0,02$
2	5,0	0,10	60	$-0,471 \pm 0,02$
3	10,0	0,10	30	$-0,705 \pm 0,03$
4	5,0	0,01	60	$-0,450 \pm 0,05$
5	5,0	0,10	30	$-1,067 \pm 0,02$
6	10,0	0,10	60	$-0,871 \pm 0,09$
7	10,0	0,01	30	$-0,488 \pm 0,03$
8	10,0	0,01	60	$-0,666 \pm 0,08$

^{*} $n=2$ para cada experimento

Empregando os resultados da Tabela 5 e aplicando o software Minitab™ Statistical Software foi possível identificar os efeitos de cada parâmetro sobre o sistema, observados no Gráfico de Pareto (Figura 28). Verificou-se que o parâmetro mais importante é a concentração da STA. A concentração da EDC e tempo de incubação dos CDtrodos na solução desses reagente não têm grande influência na imobilização.

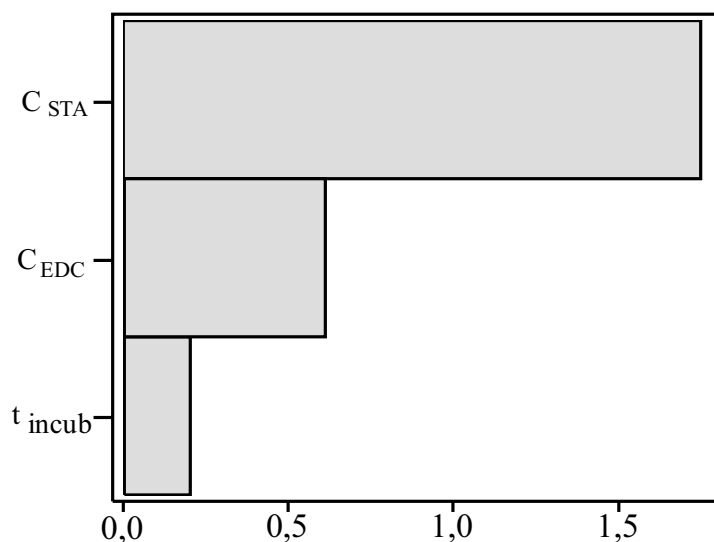


Figura 28: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização da STA sobre CDtrodo de ouro modificado com SAM. C_{STA} =concentração da estreptavidina; C_{EDC} = concentração da carbodiimida, t_{incub} = tempo de incubação.

As influências dos níveis alto e baixo de cada variável também foram determinadas. As retas apresentadas na Figura 29 expressam a tendência em termos de intensidade de corrente quando se altera o parâmetro do nível baixo para o alto. A variável ‘concentração da EDC’, por exemplo, tende a resultar em maior intensidade de corrente quando $[EDC] = 10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Quanto mais inclinada for a reta, maior a influência do parâmetro sobre o sistema. A intensidade de corrente tende a aumentar quando a STA e EDC estão em soluções mais concentradas, enquanto o tempo de incubação não apresentou significativas influências, evidenciadas pela inclinação das retas na Figura 29.

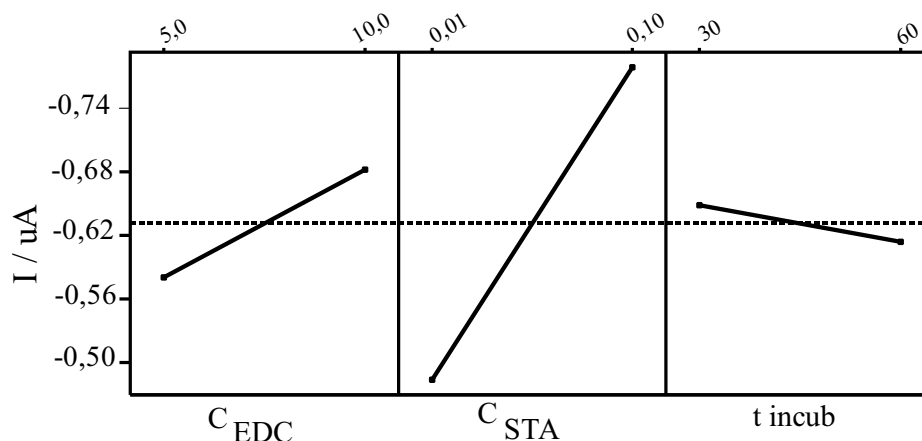
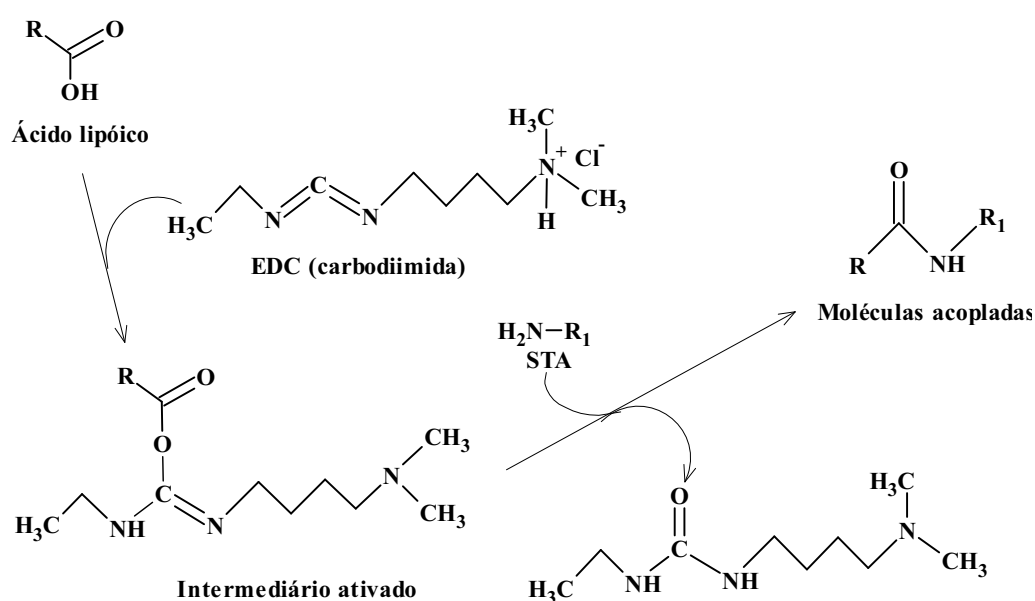


Figura 29: Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável. C_{STA} = concentração da estreptavidina; C_{EDC} = concentração da carbodiimida, t_{incub} = tempo de incubação.

A concentração da STA apresentou-se como parâmetro com maior influência, pois a intensidade de corrente depende da quantidade de HRP imobilizada. Quanto maior a concentração de STA na superfície do CDtrodo, maior quantidade do conjugado b-HRP imobilizado, resultando no aumento da corrente.

A EDC é um composto solúvel em água e permite, sem pré-dissolução em solvente orgânico, o acoplamento de uma molécula que contenha um grupo amina a outra que contenha um grupo carboxila e esta reação ocorre mais efetivamente em pH ao redor de 7,0. A concentração de EDC apresenta menor influência, pois está sempre em excesso, independente do nível alto ou baixo. O Esquema 5 apresenta o mecanismo de reação entre a STA e o grupo carboxila do ácido lipóico via EDC.



Esquema 5: Reação de acoplamento da molécula de STA à SAM de ácido lipóico por meio da EDC. Adaptado de Hermanson et al.¹⁰⁷

Portanto, os parâmetros foram fixados, sendo a concentração da STA de $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, concentração de EDC de $10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e um tempo de incubação de 30 minutos.

Em seguida, realizou-se um estudo no qual diferentes CDtrodos foram submetidos à imobilização das biomoléculas, mas sempre na ausência de um dos reagentes. A Tabela 6 apresenta os valores de corrente obtidos para cada experimento.

Tabela 6: Intensidades de corrente obtidas para as diferentes modificações dos CDtrodos

Eletrodo modificado	I / μA *
Sem monocamada	-0,085 ($\pm 0,002$)
Sem EDC	-0,094 ($\pm 0,02$)
Sem STA	-0,079 ($\pm 0,005$)
Sem BSA	-1,599 ($\pm 0,13$)
Sem b-HRP	-0,0065 ($\pm 0,0007$)

* n= 2 para cada experimento

Considerando que o valor da intensidade de corrente para o sistema otimizado foi em torno de $-0,900 \mu\text{A}$, pode-se observar que, na ausência de SAM, de EDC, de STA ou de b-HRP, a intensidade de corrente obtida foi baixa, indicando que não houve imobilização da HRP. No entanto, na ausência do bloqueio da superfície eletródica com BSA há um aumento na intensidade de corrente devido à adsorção inespecífica da enzima.

4.2.5. Imobilização das sondas de DNA e do conjugado a-HRP

Quando o número de experimentos é reduzido, consequentemente a quantidade de informações também é reduzida. No entanto, nem todas as interações são realmente significantes e um estudo mais detalhado pode ser realizado posteriormente.

O planejamento fatorial fracionado só existe quando o número de experimentos é maior que o número de variáveis a serem analisadas. Deste modo, no estudo inicial da imobilização das sondas de DNA, sendo seis o número de variáveis e dois níveis, o número mínimo de experimentos a ser executado deve ser 2^{6-3} , ou seja, oito experimentos.

A Tabela 7 mostra as diversas combinações de experimentos para este planejamento fatorial fracionado e as intensidades de corrente obtidas.

Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial fracionado 2⁶⁻³ e intensidades de corrente obtidas

Experimento *	Diluição		t _{incubação}		Diluição		t _{incubação}		Concentração		t _{incubação}		I / μ A
	b-DNA	b-DNA	b-DNA (min)	c-DNA	c-DNA	c-DNA (min)	a-HRP (mg mL ⁻¹)	a-HRP (min)	a-HRP (mg mL ⁻¹)	a-HRP (min)	a-HRP (mg mL ⁻¹)	a-HRP (min)	
1	1:80	1:80	15	1:4	1:4	60	0,003	60	0,003	60	0,003	60	-1,46 $\pm$ 0,10
2	1:80	1:80	30	1:1	1:1	30	0,001	60	0,001	60	0,001	60	-1,03 $\pm$ 0,07
3	1:8	1:8	30	1:4	1:4	60	0,001	30	0,001	30	0,001	30	-0,45 $\pm$ 0,01
4	1:80	1:80	15	1:1	1:1	60	0,001	30	0,001	30	0,001	30	-0,67 $\pm$ 0,03
5	1:80	1:80	30	1:4	1:4	30	0,003	60	0,003	60	0,003	60	-0,62 $\pm$ 0,08
6	1:8	1:8	30	1:1	1:1	30	0,003	30	0,003	30	0,003	30	-1,66 $\pm$ 0,07
7	1:8	1:8	15	1:4	1:4	60	0,001	60	0,001	60	0,001	60	-0,42 $\pm$ 0,03
8	1:8	1:8	15	1:1	1:1	30	0,003	30	0,003	30	0,003	30	-0,89 $\pm$ 0,04

* n= 2 para cada experimento

A Figura 30 apresenta o Gráfico de Pareto obtido para os resultados experimentais da Tabela 7. Pode-se notar que apenas a diluição e o tempo de incubação das sondas de DNA biotiniladas tiveram pequena influência sobre a resposta do biossensor. Os demais parâmetros apresentaram influências consideráveis.

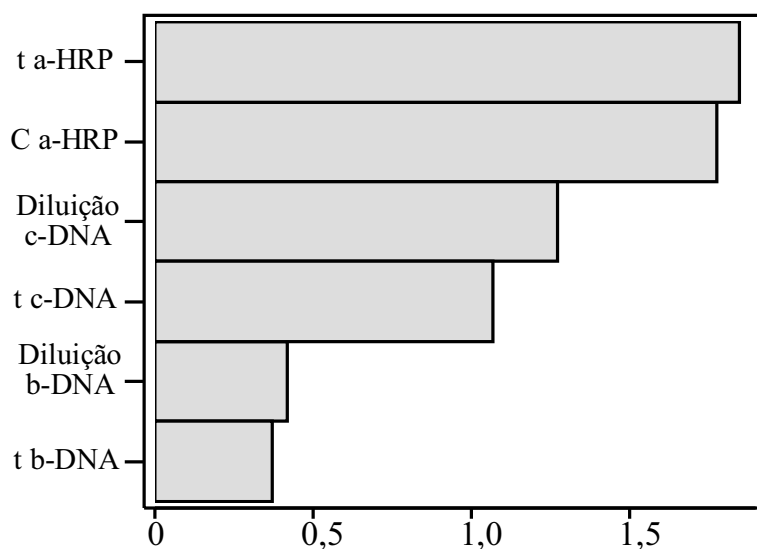


Figura 30: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização das sondas de DNA e do conjugado a-HRP. t_{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP; C_{a-HRP} = concentração de a-HRP; t_{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; t_{b-DNA} = tempo de incubação de b-DNA.

A intensidade de corrente é alta, indicada pela Figura 31, quando a diluição do b-DNA é de 1:80, com um tempo de incubação de 30 minutos, enquanto que a corrente aumentou quando os demais parâmetros estão no nível alto.

A concentração do conjugado a-HRP empregada no estudo pode ser a principal causa do resultado obtido. Visto que a concentração de a-HRP possa estar baixa, um maior tempo de incubação foi necessário para que ocorresse a difusão da molécula até a superfície do eletrodo. A quantidade de enzima também pode não ter sido suficiente para marcar todas as reações de hibridização do c-DNA, sugerindo uma maior demanda de concentração e tempo do DNA complementar. Desta maneira, julgou-se necessária a realização de novos estudos.

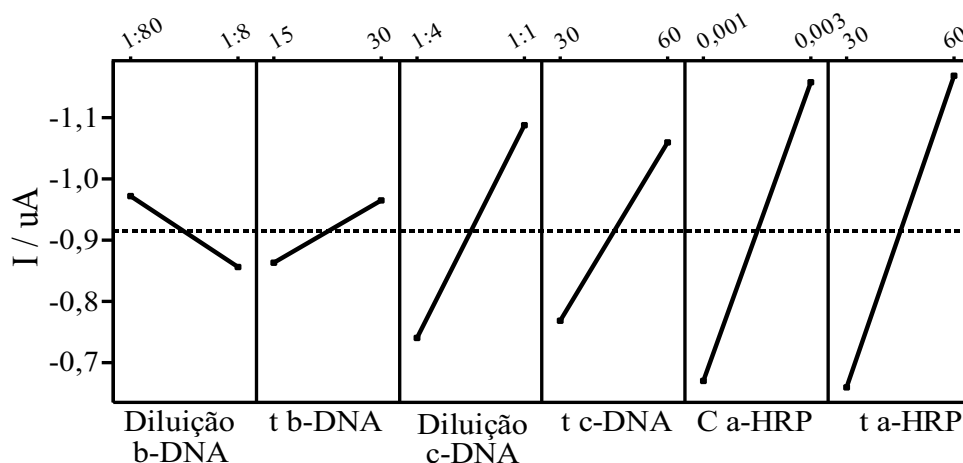


Figura 31: Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável. t_{b-DNA} = tempo de incubação de b-DNA; t_{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; C_{a-HRP} = concentração de a-HRP; t_{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP.

Nesta etapa da otimização, a diluição e o tempo de incubação do b-DNA foram fixados de acordo com os resultados anteriores, sendo eles 1:80 e 30 minutos, respectivamente. Um estudo por planejamento fatorial fracionado do tipo 2^{4-1} foi aplicado para as variáveis que apresentaram maiores efeitos sobre o sistema – diluição e tempo de incubação do c-DNA e concentração e tempo de incubação do conjugado a-HRP – nos quais os níveis alto e baixo do tempo de incubação tanto para o c-DNA como para o conjugado a-HRP foram mantidos iguais ao estudo anterior, aumentando-se os níveis da diluição do c-DNA e da concentração do conjugado. As intensidades de corrente obtidas para as diversas combinações de modificação dos CDtrodos estão na Tabela 8.

Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} e intensidades de corrente obtidas

Experimento*	Diluição c-DNA	$t_{incubação}$ c-DNA (min)	Concentração a-HRP (mg mL ⁻¹)	$t_{incubação}$ a-HRP (min)	I / μ A
1	1:1	30	0,003	30	-0,88 $\pm$ 0,04
2	1:1	60	0,030	30	-2,70 $\pm$ 0,15
3	1:0,5	60	0,003	30	-0,47 $\pm$ 0,03
4	1:1	30	0,030	60	-2,20 $\pm$ 0,12
5	1:1	60	0,003	60	-0,43 $\pm$ 0,02
6	1:0,5	60	0,030	60	-3,09 $\pm$ 0,09
7	1:0,5	30	0,003	60	-0,43 $\pm$ 0,05
8	1:0,5	30	0,030	30	-1,95 $\pm$ 0,18

* n= 2 para cada experimento

Novamente aplicando o programa Minitab™ Statistical Software aos dados obtidos, foi possível construir o gráfico de Pareto (Figura 32). Como previsto, o aumento da concentração de a-HRP influenciou na resposta amperométrica, na qual se observa que o tempo de incubação e a diluição do c-DNA não apresentaram efeitos significativos sobre o sistema. O tempo de incubação do conjugado a-HRP, que no estudo anterior foi o parâmetro que apresentou maior implicação nos resultados, apresentou uma influência desconsiderável.

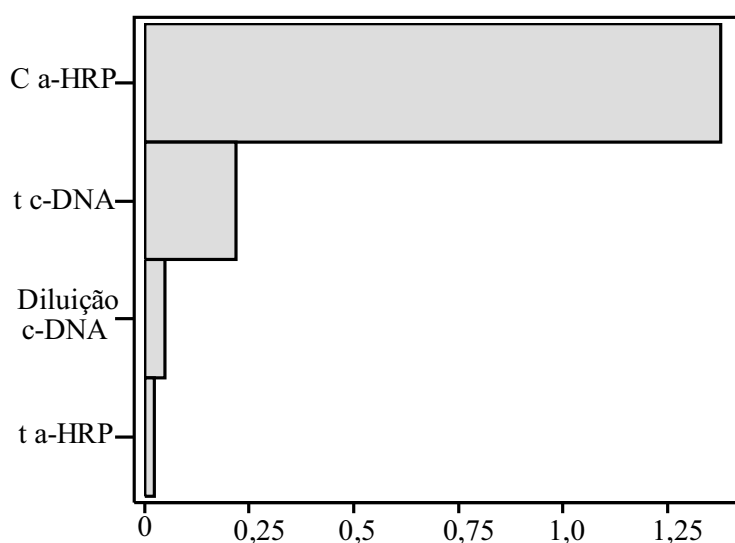


Figura 32: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do DNA complementar e do conjugado a-HRP. C_{a-HRP} = concentração de a-HRP; t_{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; t_{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP.

Com base nas inclinações das retas da tendência da intensidade de corrente observadas na Figura 33, foi possível estabelecer os parâmetros para a imobilização das biomoléculas. A diluição do DNA complementar foi fixada em 1:1. O tempo de 60 minutos apresentou intensidade de corrente ligeiramente maior em relação ao tempo de incubação de 30 minutos. O tempo de incubação dos CDtrodos na solução do conjugado foi estabelecido em 30 minutos por ser mais apropriado para a metodologia de modificação. A concentração de a-HRP comprovou ser o parâmetro fundamental na modificação.

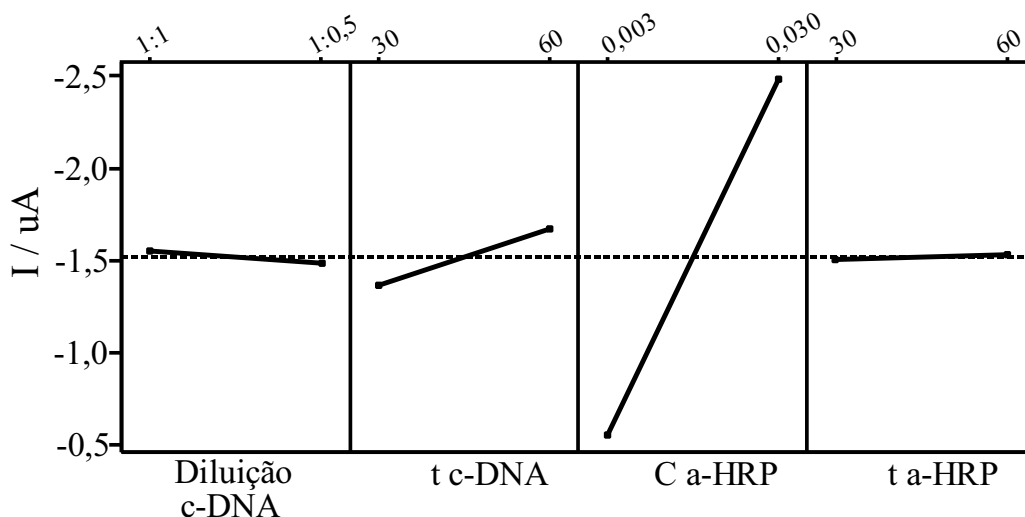


Figura 33: Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável. t_{c-DNA} = tempo de incubação de c-DNA; C_{a-HRP} = concentração de a-HRP; t_{a-HRP} = tempo de incubação de a-HRP.

Como a intensidade de corrente foi máxima quando a solução do conjugado estava mais concentrada, optou-se por estudar concentrações mais altas de a-HRP. Para isto, todos os demais parâmetros foram mantidos constantes nas condições otimizadas, empregando-se as concentrações 0,03; 0,05; 0,10; 0,30 e 0,50 mg mL^{-1} de a-HRP.

A modificação do CDtrodo para este estudo consistiu na formação da SAM, imobilização da STA, bloqueio com BSA e imobilização da sonda de b-DNA. A partir desta etapa, os CDtrodos foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo, os CDtrodos foram incubados somente em solução tampão de hibridização, ou seja, na ausência de DNA complementar, sendo, portanto, considerados como brancos. O segundo grupo foi incubado normalmente na solução do c-DNA para a realização da reação de hibridização. Os dois grupos de CDtrodos foram igualmente incubados na solução de a-HRP nas diferentes concentrações.

A Figura 34 mostra que a intensidade de corrente atinge um valor máximo em concentrações de a-HRP até 0,1 mg mL^{-1} , tornando-se constante com o aumento da concentração. No entanto, a intensidade de corrente dos CDtrodos na ausência de DNA complementar apresentaram altas intensidades de corrente a partir da concentração de 0,05 mg mL^{-1} . Devido a concentração de a-HRP estar muito alta, ocorreu a adsorção inespecífica do conjugado na superfície do CDtrodo, dando a resposta de um “falso positivo”. Sendo assim, a concentração do conjugado a-HRP foi estabelecida em 0,03 mg mL^{-1} . A Tabela 9 mostra um resumo de todos os parâmetros otimizados para a construção do biossensor para Hepatite C.

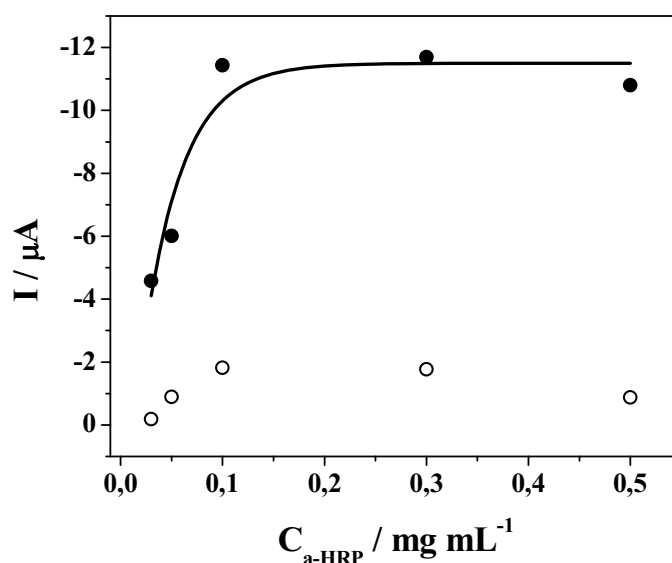


Figura 34: Variação da intensidade de corrente frente ao aumento da concentração do conjugado a-HRP utilizado como marcador da reação de hibridização na ausência (○) e na presença (●) do DNA complementar.

Tabela 9: Resumo das condições otimizadas para a construção do biossensor para Hepatite C

Parâmetro	Condição otimizada	
	Concentração	Tempo (minutos)
Formação da SAM de ácido lipóico	$1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	120
EDC (carbodiimida)	$10,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	30
STA	$0,10 \text{ mg mL}^{-1}$	30
b-DNA	1:80	30
c-DNA	1:1	30
a-HRP	$0,03 \text{ mg mL}^{-1}$	30

4.2.6. Determinação do valor cut-off e aplicação do biossensor em amostras positivas para HCV

Após estabelecer as melhores condições para o desempenho do biossensor amperométrico, o valor mínimo de intensidade de corrente que indica a presença de HCV (cut-off) foi definido. Para isto, o biossensor foi aplicado em vinte amostras negativas, sendo a média de valores de intensidade de corrente de $-0,266 \pm 0,111 \mu\text{A}$. Ao valor da média foi

somado três vezes o valor do desvio padrão, obtendo-se o valor de $-0,599 \mu\text{A}$. Sendo assim, uma amostra é considerada positiva para HCV quando a intensidade de corrente obtida for superior a $-0,599 \mu\text{A}$ e considerada negativa quando a intensidade de corrente for inferior a este valor. O biossensor foi aplicado em amostras positivas com o propósito de uma detecção qualitativa do HCV. A Figura 35 apresenta os cronoamperogramas obtidos pela aplicação de $-0,050 \text{ V}$ por 60s para dez amostras negativas e dez amostras positivas para HCV 1.

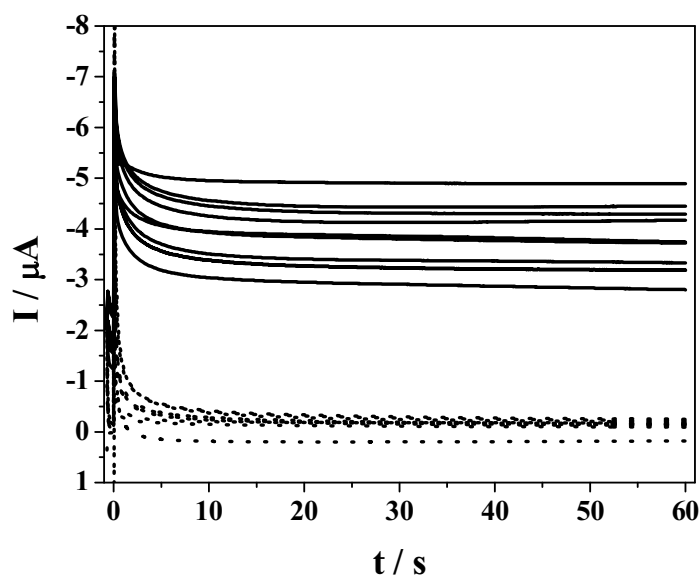


Figura 35: Cronoamperogramas obtidos utilizando o biossensor aplicado em amostras negativas (---) e positivas (—) para HCV genótipo 1.

Na Figura 36 são apresentados os valores de intensidade de corrente correspondente ao tempo de 20s, referente ao cronoamperograma, para todas as amostras negativas e positivas para HCV do genótipo 1 após 6 dias de armazenamento a $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Observa-se que, embora diferentes intensidades de corrente tenham sido obtidas para as diversas amostras positivas, todas apresentaram valores superiores ao valor de cut-off ($-0,599 \mu\text{A}$).

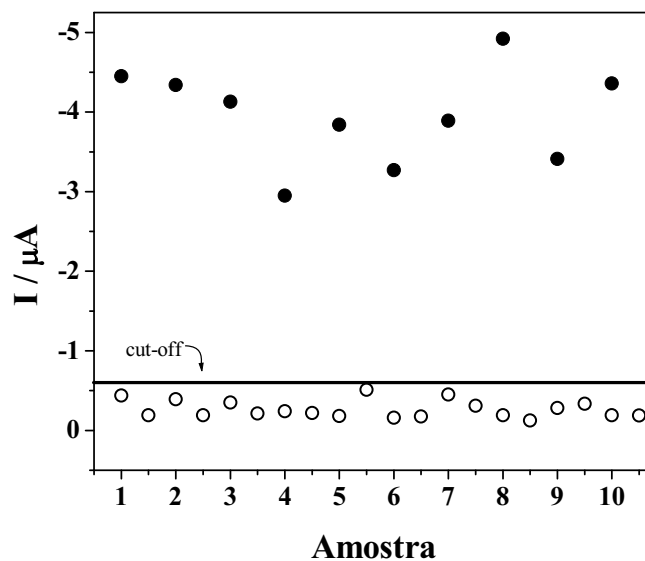


Figura 36: Intensidades de corrente obtidas na aplicação do biossensor amperométrico em amostras negativas (○) e positivas (●) para HCV 1 após 6 dias de armazenamento a -4 °C.

Uma vez que toda a otimização tenha sido conduzida utilizando-se sondas biotinizadas e amostras do c-DNA genótipo 1, experimentos foram realizados com o objetivo de determinar se a metodologia é adequada para detecção do HCV genótipo 3. Deste modo, na etapa de imobilização do b-DNA e c-DNA foram utilizadas as biomoléculas deste genótipo. O procedimento foi aplicado às amostras positivas para HCV 3 após 8 dias de armazenamento das amostras a -4 °C. Como pode ser observado na Figura 37, as intensidades de corrente para as amostras positivas apresentaram valores acima do valor de cut-off, indicando que a metodologia é também apropriada para detecção do HCV 3.

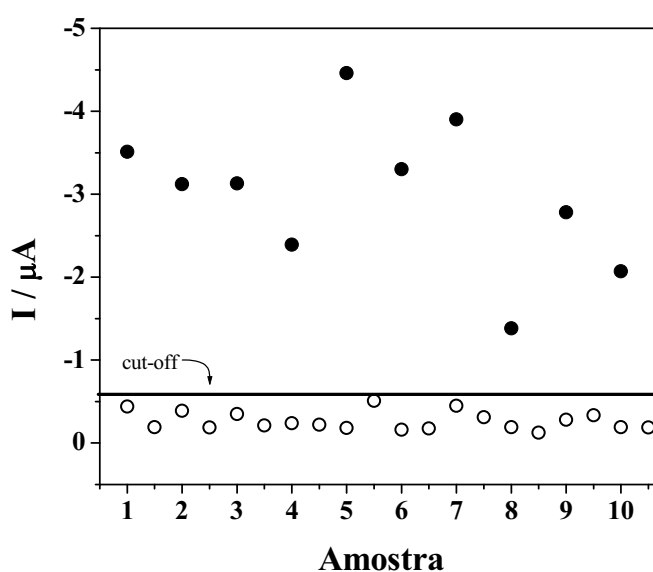


Figura 37: Intensidades de corrente obtidas na aplicação do biossensor amperométrico em amostras negativas (○) e positivas (●) para HCV 3 após 8 dias de armazenamento a -4 °C.

Algumas amostras positivas para HCV 3 apresentaram um valor de intensidade de corrente abaixo do valor médio das amostras positivas para HCV 1 ($-3,96 \pm 0,61 \mu\text{A}$, Figura 36). Visto que o experimento utilizando o c-DNA de HCV 3 foi realizado após 8 dias de armazenamento, o tempo de armazenagem poderia ser o responsável pela diminuição da corrente. Sendo assim, o biossensor foi aplicado em diferentes amostras positivas para HCV 1 após 16 dias de armazenamento a -4°C . A Figura 38 mostra que as respostas obtidas para a maioria das amostras foram menores que o valor de $-3,96 \pm 0,61 \mu\text{A}$. O tempo de estocagem influenciou nos resultados, provavelmente porque o c-DNA das amostras sofreu degradação ou desnaturação devido a diversos fatores. Porém, mesmo após o longo armazenamento, os valores de corrente se mantiveram acima do valor de cut-off.

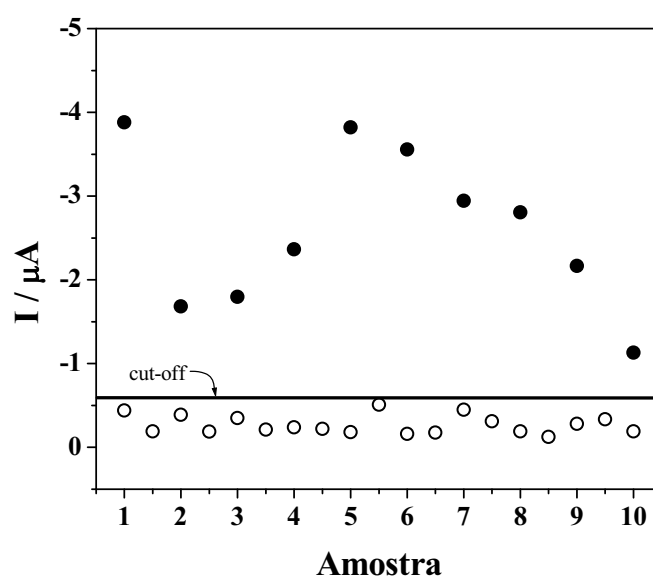


Figura 38: Intensidades de corrente obtidas na aplicação do biossensor amperométrico em amostras negativas (○) e positivas (●) para HCV 1 após 16 dias de armazenamento a -4°C .

A otimização dos parâmetros de modificação do CDtrodo de ouro para a imobilização das sondas de DNA possibilitaram a construção do biossensor para detecção do vírus da Hepatite C. Os resultados mostraram que a metodologia é adequada para aplicação em amostras dos genótipos 1 e 3, sendo estes os que prevalecem no Brasil.

O tempo de armazenamento das amostras pode influenciar na resposta amperométrica, uma vez que foi observada uma diminuição na intensidade de corrente, podendo causar um resultado falso-negativo. Deste modo, os experimentos devem ser realizados tão logo se tenha acesso às amostras.

5. CONCLUSÕES

Estudos eletroquímicos e espectrofotométricos foram aplicados na investigação do produto da reação entre a enzima HRP e o mediador de elétrons 5-ASA, na presença do peróxido de hidrogênio como substrato enzimático. Os resultados indicaram que, ao contrário do que ocorre na reação de oxidação eletroquímica do 5-ASA, a benzoquinona e o ácido gentísico não são produtos da oxidação enzimática do mediador. Durante a oxidação do 5-ASA pela HRP, há a formação de um complexo entre a 5-ASA-QI e o Composto II que inibe a hidrólise do grupo amina do 5-ASA, impedindo a formação de benzoquinona e ácido gentísico. A resposta do biossensor amperométrico baseado na enzima HRP e o mediador 5-ASA é referente à redução do complexo formado.

A utilização do CDtrodo de ouro como suporte para imobilização de sondas de DNA mostrou-se adequada para o desenvolvimento de um biossensor para detecção do vírus da Hepatite C, pois apresenta vantagens como fácil construção e manuseio, reprodutibilidade e baixo custo.

O emprego de estudos quimiométricos por meio do planejamento fatorial nas etapas de modificação do CDtrodo possibilitou a obtenção das melhores condições experimentais com um menor número de ensaios, maior rapidez e baixa demanda de reagentes e amostras.

A análise dos resultados mostrou que o biossensor é adequado para a detecção do vírus da Hepatite C tanto do genótipo 1 como do genótipo 3, obtendo-se considerável distinção entre as respostas das amostras positivas e negativas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como propostas para trabalhos futuros sugere-se:

- Estudar o efeito do tempo de armazenamento das amostras de soros de pacientes positivos para HCV, desde a obtenção do c-DNA amplificado até a modificação da superfície do CDtrodo e medida da intensidade de corrente;
- Estudar o efeito do tempo de armazenamento do biossensor após a reação de hibridização b-DNA/c-DNA;
- Desenvolver uma metodologia para detecção quantitativa do c-DNA.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Hepatitis C**. Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>>. Acesso em: 14 set. 2008.

- 2 MODI, A. A.; LIANG, T. J. Hepatitis C: a clinical review. **Oral Diseases**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 10-14, Jan. 2008.

- 3 GUERREIRO, T. D. T.; MACHADO, M. M.; FREITAS, T. H. P. Associação entre líquen plano e infecção pelo vírus da Hepatite C: um estudo prospectivo envolvendo 66 pacientes da clínica de dermatologia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, n. 5, p. 475-480, set. 2005.

- 4 SOUVIGNET, C.; LEJEUNE, O.; TREPO, C. Interferon-based treatment of chronic Hepatitis C. **Biochimie**, Paris, v. 89, n. 6-7, p. 894-898, June 2007.

- 5 ROCHE. **Hepatitis**. Disponível em:
<<http://www.hepatites.com.br/sc/hepatite/Web/Hepatite/C/Tratamento.aspx>>. Acesso em: 16 set. 2008.

- 6 VROLIJK, J. M.; DE KNEGT, R. J.; VELDT, B. J.; ORLENT, H.; SCHALM, S. W. The treatment of Hepatitis C: history, presence and future. **Netherlands Journal of Medicine**, Alphen Aan Den Rijn, v. 62, n. 3, p. 76-82, Mar. 2004.

- 7 SUZUKI, T.; AIZAKI, H.; MURAKAMI, K.; SHOJI, I.; WAKITA, T. Molecular biology of Hepatitis C virus. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 42, n. 6, p. 411-423, June 2007.

- 8 SCHULZE ZUR WIESCH, J. S.; SCHMITZ, H.; BOROWSKI, E.; BOROWSKI, P. The proteins of the Hepatitis C virus: their features and interactions with intracellular protein phosphorylation. **Archives of Virology**, Wien, v. 148, n. 7, p. 1247-1267, June 2003.

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

- 10 GRETCH, D. R. Diagnostic tests for Hepatitis C. **Hepatology**, Hoboken, v. 26, n. 3, p. 43-47, Sept. 1997.

11 BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A.; EMER, L. F. Diagnóstico da Hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 9, n. 3, p. 161-168, mar. 2001.

12 PORTAL EDUCAÇÃO. **Teste ELISA**. Disponível em: <<http://www.portalfarmacia.com.br/farmacia/principal/conteudo.asp?id=423>>. Acesso em: 16 set. 2008.

13 ERENZOY, S. Diagnosis of Hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 271-281, Oct. 2001.

14 MAJID, A. M.; GRETCH, D. R. Current and future Hepatitis C virus diagnostic testing: problems and advancements. **Microbes and Infection**, Amsterdam, v. 4, n. 12, p.1227-1236, Oct. 2002.

15 SARRAZIN, C. Highly sensitive Hepatitis C virus RNA detection methods: molecular backgrounds and clinical significance. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. S23-S29, July 2002.

16 PAWLOTSKY, J-M. Diagnostic tests for Hepatitis C. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 71-79, July 1999.

17 CAMPIOTTO, S.; PINHO J. R. R.; CARRILHO, F. J.; SILVA, L. C.; SOUTO, F. J. D.; SPINELLI, V.; PEREIRA, L. M. M. B.; COELHO, H. S. M.; SILVA, A. O.; FONSECA, J. C.; ROSA, H.; LACET, C. M. C.; BERNARDINI, A. P. Geographic distribution of Hepatitis C genotype in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 1, p. 41-49, jan. 2005.

18 NATIONAL DIGESTIVE DISEASES INFORMATION CLEARINGHOUSE. **Chronic Hepatitis C**: current disease management. Disponível em: <<http://www.niddk.nih.gov/health/digest/pubs/chnrhepc/chnrhepc.htm>>. Acesso em: 16 set. 2008.

19 UNIVERSITY OF WASHINGTON MEDICAL CENTER. **Diagnostic testing for Hepatitis C**. Disponível em: <<http://depts.washington.edu/uwhcp/pubs/dxtestshepc.htm>>. Acesso em: 16 set. 2008.

- 20 SIMMONDS, P.; ROSE, K. A.; GRAHAM, S.; CHAN, S. W.; McOMISH, F.; DOW, B. C. Mapping of serotype-specific, immunodominant epitopes in the NS-4 region of Hepatitis C virus (HCV): use of type-specific peptides to serologically differentiate infections with HCV types 1, 2, and 3. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 6, p. 1493-1503, June 1993.
- 21 PYUN, J. C.; LEE, H. H.; LEE, C. S. Application of amperometric detector to the conventional enzyme-immunoassay (EIA). **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 78, n. 1-3, p. 232-236, Aug. 2001.
- 22 MUERHOFF, A. S.; JIANG, L.; SHAH, D. O.; GUTIERREZ, R. A.; PATEL, J.; GAROLIS, C.; KYRK, C. R.; LECKIE, G.; FRANK, A.; STEWART, J. L.; DAWSON, G. J. Detection of HCV core antigen in human serum and plasma with an automated chemiluminescent immunoassay. **Transfusion**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 349-356, Mar. 2002.
- 23 LEE, S.; KIM, Y. S.; JO, M.; JIN, M.; LEE, D.; KIM, S. Chip-based detection of Hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 358, n. 1, p. 47-52, June 2007.
- 24 MAO, H.; LU, Z.; ZHANG, H.; LIU, K.; ZHAO, J.; JIN, G.; GU, S.; YANG, M. Colorimetric oligonucleotide array for genotyping of Hepatitis C virus based on the 5' non-coding region. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 388, n. 1-2, p. 22-27, Feb. 2008.
- 25 TAGLIAVINI, S. A.; MIKAWA, A. Y.; YAMANAKA, H.; HENRIQUE-SILVA, F.; COSTA, P. I. Polysiloxane-poly(propylene oxide) hybrid discs as solid phase in anti-HCV detection using a recombinant core protein. **Talanta**, Amsterdam, v. 75, n. 2, p. 461-465, Apr. 2008.
- 26 LAZCKA, O.; CAMPO, F. J.; MUÑOZ, F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 1205-1217, Feb. 2007.
- 27 FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 28-39, jan./fev. 1992.
- 28 LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 492-500, Sept. 2008.
- 29 EVDOKIMOV, Y. M.; SKURIDIN, S. G.; SALYANOV, V. I.; SEMEIKIN, A. S.; PALUMBO, M. Nucleic-acids as a basis for creation of biosensors. **Molecular Biology**, New York, v. 23, n. 6, p. 1245-1251, Nov. 1989.

- 30 YANG, M.; MSGOVERN, M. V.; THOMPSON, M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 346 n. 3, p.259-275, July 1997.
- 31 SKURIDIN, S. G.; YEVDOKIMOV, Y. U.; EFIMOV, V. S.; HALL, J. M.; TURNER, A. P. F. A new approach for creating doublestranded DNA biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 903-911, Dec. 1996.
- 32 BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R.; LA-SCALEA, M.; CRUZ, M. L. Voltammetric behavior of nitroimidazoles at a DNA-biosensor. **Electroanalysis**, Berlin, v. 9, n. 14, p. 1132-1137, Oct. 1997.
- 33 HASHIMOTO, K.; ITO, K.; ISHIMORI, Y. Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 66, n. 21, p. 3830-3833, Nov. 1994.
- 34 HASHIMOTO, K.; ITO, K.; ISHIMORI, Y. Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 286, n. 2, p. 219-224, Feb. 1994.
- 35 ZHANG, H.; TAN, H.; WANG, R.; WEI, W.; YAO, S. Immobilization of DNA on silver surface of bulk acoustic wave sensor and its application to the study of UV-C damage. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 374, n. 1, p. 31-38, Nov. 1998.
- 36 PALECEK, E.; JELEN, F.; TEJEIRO, C.; FUCIK, V.; JOVIN, T. M. Biopolymer-modified electrodes in the voltammetric determination of nucleic acids and proteins at the submicrogram level. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 273, n. 1-2, p. 175-186, Feb. 1993.
- 37 LIU, S.; YE, J.; HE, P.; FANG, Y. Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 335, n. 3, p. 239-243, Dec. 1996.
- 38 WANG, J.; CAI, X.; TIAN, B.; SHIRAISHI, H. Microfabricated thick-film electrochemical sensor for nucleic acid determination. **Analyst**, Cambridge, v. 121, n.7, p. 965-969, July 1996.
- 39 MILLAN, K. M.; MIKKELSEN, S. R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 65, n. 17, p. 2317-2323, Sept. 1993.

40 IVANDINI, T. A.; SARADA, B. V.; RAO, T. N.; FUJISHIMA, A. Electrochemical oxidation of underivatized-nucleic acids at highly boron-doped diamond electrodes. **Analyst**, Cambridge, v. 128, n. 7, p. 924-929, July 2003.

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

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

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

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

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

46 ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for detection of Hepatitis C virus using fractional factorial designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 782-787, 2008.

47 WANG, J.; FERNANDES, J. R.; KUBOTA, L. T. Polishable and renewable DNA hybridization biosensors. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 70, n. 17, p. 3699-3702, Sept. 1998.

48 MARRAZZA, G.; CHIANELLA, I.; MASCINI, M. Disposable DNA electrochemical biosensor for environmental monitoring. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 387, n. 3, p. 297-307, Apr. 1999.

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

50 LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; PALCHETTI, I.; CESARETTI, S.; MASCINI, M. Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 469, n. 1, p. 93-99, Sept. 2002.

51 WANG, J.; GRÜNDLER, P.; FLECHSIG, G-U.; JASINSKI, M.; RIVAS, G.; SAHLIN, E.; LOPES-PAZ, J. L. Stripping analysis of nucleic acids at a heated carbon paste electrode. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 72, n. 16, p. 3752-3756, Aug. 2000.

52 WANG, J.; KAWDE, A-N. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 431, n. 2, p. 219-224, Mar. 2001.

53 PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S. Graphite-epoxy composites as a new transducing material for electrochemical genosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 473-484, Dec. 2003.

54 PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; BARBÉ, J.; ALEGRET, S. PCR-genosensor rapid test for detecting *Salmonella*. **Electroanalysis**, Berlin, v. 15, n. 23-24, p. 1815-1823, Dec. 2003.

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

56 ZHANG, Y.; KIM, H-H.; MANO, N.; DEQUAIRE, M.; HELLER, A. Simple enzyme-amplified amperometric detection of a 38-base oligonucleotide at 20 pmol L⁻¹ concentration in a 30-μL droplet. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 374, n. 6, p. 1050-1055, Nov. 2002.

57 PALECEK, E.; KIZEK, R.; HAVRAN, L.; BILLOVA, S.; FOJTA, M. Electrochemical enzyme-linked immunoassay in a DNA hybridization sensor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 469, n. 1, p. 73-83, Sept. 2002.

58 WANG, J.; XU, D.; ERDEM, A.; POLSKY, R.; SALAZAR, M. A. Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization. **Talanta**, Amsterdam, v. 56, n. 5, p. 931-938, Apr. 2002.

59 WANG, J.; LUI, G.; JAN, M. R. Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 126, n. 10, p. 3010-3011, Mar. 2004.

60 PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, set./out. 2002.

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

62 CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 17, n.1-2, p. 1-12, Jan. 2002.

63 SENARATNE, W.; ANDRUZZI, L.; OBER, C. K. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. **Biomacromolecules**, Washington, v. 6, n. 5, p. 2427-2448, Sept. 2005.

64 ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, n. 4, p. 1533-1554, June 1996.

65 SUN, X.; HE, P.; LIU, S.; YE, J.; FANG, Y. Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self-assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications. **Talanta**, Amsterdam, v. 47, n. 2, p. 487-495, Oct. 1998.

66 ZHANG, S.; TAN, Q.; LI, X.; LI, F. Recognition and detection of ssDNA using 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayer modified gold electrode. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 128, n. 2, p. 529-535, Jan. 2008.

67 LOAIZA, O. A.; CAMPUZANO, S.; PEDRERO, M.; PINGARRÓN, J. M. DNA sensor based on an *Escherichia coli lac Z* gene probe immobilization at self-assembled monolayers-modified gold electrodes. **Talanta**, Amsterdam, v. 73, n. 5, p. 838-844, Oct. 2007.

68 CHOW, E.; HIBBERT, D. B.; GOODING, J. J. Electrochemical detection of lead ions via the covalent attachment of human angiotensin I to mercaptopropionic acid and thioctic acid self-assembled monolayers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 543, n. 1-2, p. 167-176, July 2005.

69 SCHILLER, S. M.; NAUMANN, R.; LOVEJOY, K.; KUNZ, H.; KNOLL, W. Archaea analogue thiolipids for tethered bilayer lipid membranes on ultrasmooth gold surfaces. **Angewandte Chemie-International Edition**, Weinheim, v. 42, n. 2, p. 208-211, 2003.

70 TAPPURA, K.; VIKHOLM-LUNDIN, I.; ALBERS, W. M. Lipoate-based imprinted self-assembled molecular thin films for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 912-919, Jan. 2007.

71 NASCIMENTO, V. B.; ANGNES, L. Eletrodos fabricados por "silk-screen". **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 5, p. 614-629, set./out. 1998.

72 LOWINSOHN, D.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L.; BERTOTTI, M. Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks. **Electroanalysis**, Berlin, v. 18, n. 1, p. 89-94, Jan. 2006.

73 MASAWAT, P.; LIAWRUANGRATH, S.; SLATER, J. M. Flow injection measurement of lead using mercury-free disposable gold-sputtered screen-printed carbon electrodes (SPCE). **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 91, n. 1-3, p. 52-59, June 2003.

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

75 PAIXÃO, T. R. L. C.; MATOS, R. C.; BERTOTTI, M. Design and characterization of a thin-layered dual-band electrochemical cell. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 48, n. 6, p. 691-698, Feb. 2003.

76 GOMORI, G. General preparative procedures. In: _____. **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1965. Cap. 1, p. 139-146.

77 ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Eclética Química**, Araraquara, v. 33, n. 1, p. 57-62, 2008.

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

79 ÖZCAN, L.; ŞAHİN, M.; ŞAHİN, Y. Electrochemical preparation of a molecularly imprinted polypyrrole-modified pencil graphite electrode for determination of ascorbic acid. **Sensors**, Basel, v. 8, n. 9, p. 5792-5805, Sept. 2008.

80 VADGAMA, P.; CRUMP, P.W. Biosensors: recent trends. A review. **Analyst**, Cambridge, v. 117, n. 2, p. 1657-1670, Nov. 1992.

81 FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; COSTA, P. I.; YAMANAKA, H. Immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease. **Biosensor and Bioelectronics**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 175-181, July 2005.

82 FERREIRA, A. A. P.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M.; OLIVEIRA, D. R.; COSTA, P. I.; GUELL, A. G.; SANZ, F.; BENEDETTI, A. V.; YAMANAKA, H. Investigation of the interaction between Tc85-11 protein and antibody anti-T cruzi by AFM and amperometric measurements. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 51, n. 24, p. 5046-5052, July 2006.

83 ESHKENAZI, I.; MALTZ, E.; ZION, B.; RISHPON, J. A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 9, p. 1939-1945, Sept. 2000.

84 SOLNA, R.; SKLADAL, P.; EREMIN, S. A. Development of a disposable electrochemical immunosensor for detection of the herbicide acetochlor. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Oxon, v. 83 n. 7-8, p. 609-620, July 2003.

85 DIAS, S. L. P.; FUJIWARA, S. T.; GUSHIKEM, Y.; BRUNS, R. E. Methylene blue immobilized on cellulose surfaces modified with titanium dioxide and titanium phosphate: factorial design optimization of redox properties. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Lausanne, v. 531, n. 2, p. 141-146, Aug. 2002.

86 RUOTOLO, L. A. M.; GUBULIN, J. C. A factorial-design study of the variables affecting the electrochemical reduction of Cr(VI) at polyaniline-modified electrodes. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 110, n. 1-3, p. 113-121, June 2005.

87 BRERETON, R. G. Experimental designs. In: _____. **Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant**. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. Cap. 2, p. 60-66.

88 SAWYER, D. T.; ROBERTS, J. L. Jr. Indicator electrode. In: _____. **Experimental electrochemistry for chemists**. New York: John Wiley & Sons, 1974. Cap. 2, p. 66-69.

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

90 SKOOG, D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Voltametry. In: _____. **Principles of instrumental analysis**. 5th ed. New York: Thomson Learning, 1998. Cap. 25, p. 654-656.

91 PALUMBO, G.; BACCHI, S.; PRIMAVERA, L.; PALUMBO, P.; CARLUCCI, G. A validated HPLC method with electrochemical detection for simultaneous assay of 5-aminosalicylic acid and its metabolite in human plasma. **Biomedical Chromatography**, Chichester, v. 19, n. 5, p. 350-354, June 2005.

92 GANDINI, C.; CACCIALANZA, G.; KITSOS, M.; MASSOLINI, G.; DE LORENZI, E. Determination of 5-aminosalicylic acid and related-compounds in raw-materials and pharmaceutical dosage forms by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 540, n. 1-2, p. 416-421, Mar. 1991.

93 PALSMEIER, R. K.; RADZIK, D. M.; LUNTE, C. E. Investigation of the degradation mechanism of 5-aminosalicylic acid in aqueous-solution. **Pharmaceutical Research**, Kansas City, v. 9, n. 7, p. 933-938, July 1992.

94 ERIKSSON, A.; NYHOLM, L. A comparative study of the oxidation of 3-, 4- and 5-aminosalicylic acids at glassy carbon electrodes. **Electroanalysis**, Berlin, v. 10, n. 3, p. 198-203, Feb. 1998.

95 NIGOVIC, B.; SIMUNIC, B. Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulation by differential pulse voltammetry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 169-174, Feb. 2003.

96 ABDEL-HAMID, I.; IVNITSKI, D.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Fast amperometric assay for E. coli O157 : H7 using partially immersed immunoelectrodes. **Electroanalysis**, Berlin, v. 10, n. 11, p. 758-763, Sept. 1998.

97 LIU, Z. C.; McCLELLAND, R. A.; UETRECHT, J. P. Oxidation of 5-aminosalicylic acid by hypochlorous acid to a reactive iminoquinone. Possible role in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Drug Metabolism and Disposition**, Baltimore, v. 23, n. 2, p. 246-250, Feb. 1995.

98 WHALEN, A. M.; BHATTACHARYA, S.; PIERPONT, C. G. Iminoquinone complexes of iron and nickel. Structural, magnetic and electrochemical properties of complexes containing the phenoxazinolate semiquinone radical. **Inorganic Chemistry**, Washington, v. 33, n. 2, p. 347-353, Jan. 1994.

99 O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chemico-Biological Interactions**, Shannon, v. 129, n. 1-2, p. 113-139, Dec. 2000.

100 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 230-243, mar/abr. 2003.

101 FILIZOLA, M.; LOEW, G. H. Role of protein environment in Horseradish peroxidase Compound I formation: molecular dynamics simulations of Horseradish peroxidase-HOOH complex. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 122, n. 1, p. 18-25, Jan. 2000.

102 BACHAS, L. G.; CULLEN, L.; HUTCHINS, R. S.; SCOTT, D. L. Synthesis, characterization and electrochemical polymerization of eight transition-metal complexes of 5-amino-1,10-phenanthroline. **Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions**, n. 9, p. 1571-1577, May 1997.

103 LOZANO-CAMARGO, M. L.; ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, M.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. L.; GALICIA, L.; RAMÍREZ-SILVA, M. T. UV-visible spectroscopic and electrochemical study of the complex formation between Fe(II) and 5-amino-1,10-phenanthroline (5-Aphen) in aqueous solution. **Talanta**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 1458-1468, July 2007.

104 CATALDI, T. R. I.; NARDIELLO, D. A pulsed potential waveform displaying enhanced detection capabilities towards sulfur-containing compounds at a gold working electrode. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1066, n. 1-2, p. 133-142, Feb. 2005.

105 BANDYOPADHYAY, K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers of small aromatic disulfide and diselenide molecules on polycrystalline gold films: a comparative study of the geometrical constraint using temperature-dependent surface-enhanced Raman spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy and electrochemistry. **Langmuir**, Washington, v. 15, n. 16, p. 5314-5322, Aug. 1999.

106 MILLER, J. C.; MILLER, J. N. Significance tests. In: _____. **Statistics for analytical chemistry**. 2nd ed. New York: Ellis Horwood, 1989. Cap. 3, p. 58-59.

107 HERMANDON, G.T. Zero-length cross-linkers. In: _____. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. Cap. 3, p. 169-173.