



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química



*Eletropolimerização de aminofenóis para
desenvolvimento de biossensores
eletroquímicos aplicados à detecção de gene
específico para câncer de próstata*

Orientando: Diego Leoni Franco

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito-Madurro

Uberlândia

Julho – 2007



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química



*Eletropolimerização de aminofenóis para
desenvolvimento de biossensores
eletroquímicos aplicados à detecção de gene
específico para câncer de próstata*

Dissertação de mestrado apresentada à
comissão de Pós-Graduação do Instituto
de Química da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientando: Diego Leoni Franco

Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito-Madurro

Curso: Química

Área de concentração: Química

Uberlândia
Julho - 2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

F825e Franco, Diego Leoni, 1983-
Eletropolimerização de aminofenóis para desenvolvimento de biossen-
sores eletroquímicos aplicados à detecção de gene específico para câncer de
próstata / Diego Leoni Franco. - 2007.

92 f. : il.

Orientador: João Marcos Madurro.
Co-orientadora: Ana Graci Brito-Madurro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses. 2. Próstata - Câncer - Teses. I. Madurro,
João Marcos. II. Brito-Madurro, Ana Graci. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 547



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO
E-mail: cpgquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): DIEGO LEONI FRANCO
NÚMERO DE MATRÍCULA: 5052405
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Eletropolimerização de Aminofenóis para Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos Aplicados à Detecção de Gene Específico para Câncer de Próstata”

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro do Bloco E, no Campus Santa Mônica no dia 24 de julho de 2007, às 9 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. João Marcos Madurro
(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Gilberto Maia
(UFMS)

Prof^a Dra. Nivia Maria Melo Coelho
(Instituto de Química / UFU)

Uberlândia, 24 de julho de 2007.

"Eu fui à floresta pois queria viver deliberadamente

sugar toda a essência da vida

e acabar com tudo que não fosse vida

para quando a hora da morte chegar

eu não descobrir que não vivi.

Porque você está aqui é que existe vida e identidade.

Que a poderosa peça continua

e você pode contribuir com um verso..."

Eis o meu verso

Excerpt from Walden (Henry David Thoreau)

O me! O life! (Walt Whitman)

Agradecimentos

Que as palavras que eu colocarei aqui possam expressar o mais profundo carinho e gratidão, sendo o mínimo que posso oferecer para todas as pessoas que me acompanharam em toda a minha jornada até este ponto.

Agradeço a Deus, por tornar possível minha existência, permitindo que a luz de cada manhã alcance meus olhos, para viver intensamente todos os momentos do meu dia. Obrigado por todos os meus dias, Senhor.

Agradeço à minha família, por permitir que eu pudesse me tornar o homem que eu sou hoje. Ao meu pai, pelo exemplo de honestidade, estudo e trabalho, que me faz crer que ainda temos a possibilidade de crescer como pessoas dignas, com respeito e responsabilidade. À minha mãe, por ser mãe, em todos os aspectos, amando, cuidando, ajudando, sofrendo, sendo, de longe, a pessoa que mais me deu apoio nas piores e melhores horas, nunca duvidando da minha capacidade. Espero que possa estar sendo, nesse momento, motivo de orgulho para vocês dois. Ao meu irmão, outro exemplo de força e determinação, não importando os problemas e dificuldades, sempre disposto a ir em frente e não desistir. Se meus pais me dizem que ele se espelha em mim, nas minhas atitudes, é no esforço dele em que tiro as minhas forças quando me sinto perdido. À minha avó querida, sempre com um sorriso no rosto, sempre disposta e alegre, mesmo doente, dando-me motivos para saborear a vida com mais felicidade e juventude.

Agradeço aos meus amigos de coração, Alexandre e Rafaela, com os quais eu criei os pilares emocionais da amizade e aprendi que a beleza da vida reside nos momentos mais simples, puros e sinceros. São as pessoas com que quero compartilhar esse momento de conquista assim como quero estar presente em todos os de vocês.

Agradeço aos meus grandes amigos (alguns longe em distância, mas perto, no coração), Tuk, Rick, Vítor, Cesa, Leandra, Leonildo, Viviene, Irene, Valdomiro, Marcos, Silda, Guilherme, Tatá, Neno, por serem a família de amigos que eu mais admiro e respeito, por conviverem comigo antes mesmo de eu poder andar, me considerando um membro da família de vocês. Isso eu não posso esquecer, nem deixar de agradecer, inseparáveis e maravilhosos amigos.

Agradeço a todos os meus amigos do clube, da minha época escolar, do cursinho, de todos os lugares e momentos inesquecíveis. Agradeço aos meus colegas e amigos da faculdade. Sem eles, sem o incentivo, sem as discussões, não estaria aqui. De coração, agradeço aos meus grandes amigos, Douglas Queiroz Santos, Wallans Torres Pio dos

Santos, Rodrigo Teodoro, Eduardo Ferreira de Azevedo, Eduardo Borgato Barbedi, por acompanharem minha carreira desde a graduação, me ajudando a crescer profissionalmente e pessoalmente, nas festas ou nas provas, nas aulas ou nas conversas de corredor. Tenham certeza que o químico que sou hoje foi espelhado nas melhores qualidades de cada um de vocês. Agradeço aos meus colegas de laboratório, Lucas, Cláudio, Sabrina, Tatiana, André, Daniela, Rodrigo, Érika, pelo suporte, pelos trabalhos realizados juntos desde o início até agora, pelos momentos de alegria, sofrimento, tristeza, conquista, compartilhados juntos. Agradeço a todos os colegas de todos os laboratórios, compartilhando viagens, trabalhos e alegrias.

Agradeço aos meus orientadores, João Marcos Madurro e Ana Graci Brito-Madurro pela oportunidade de ser, desde minha iniciação, um membro do grupo de pesquisa, por confiarem em minha capacidade e estarem sempre procurando o melhor para o meu crescimento como químico e como cidadão.

Agradeço à CAPES, ao CNPq, ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, à PROPP/UFU pelo suporte técnico e financeiro.

Os meus mais profundos agradecimentos!!!

Índice

Índice de figuras.....	7
Índice de tabelas.....	12
Lista de abreviaturas e siglas.....	13
Materiais.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	16
1) Introdução.....	17
1.1) A próstata.....	17
1.2) Doenças da próstata.....	17
1.2.1) <i>Doenças não cancerosas</i>	18
1.2.2) <i>Câncer de próstata</i>	18
1.3) O estadiamento TNM.....	20
1.4) As estimativas para o ano de 2006.....	22
1.5) Diagnóstico.....	24
1.6) Biossensores.....	25
1.6.1) <i>Biossensores baseados em DNA</i>	26
1.6.1.1) <i>Métodos de detecções</i>	26
1.6.1.2) <i>Utilização de polímeros para construção de biossensores</i>	33
1.7) Polímeros não-condutores e condutores.....	35
1.8) Técnicas eletroquímicas.....	37
1.8.1) <i>Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial</i>	37
1.8.2) <i>Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo</i>	37
1.8.3) <i>Espectroscopia de impedância eletroquímica</i>	38
1.9) Aminofenóis.....	39
2) Objetivos.....	43

3) Materiais utilizados.....	44
4) Procedimento experimental.....	47
4.1) Pré-tratamento dos eletrodos.....	47
4.2) Preparo de soluções.....	47
4.3) Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.....	47
4.4) Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ).....	48
4.5) FTIR (espectroscopia do infravermelho: transformada de Fourier).....	48
4.6) Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).....	49
4.7) Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	49
4.8) Microscopia de força atômica (MFA).....	49
4.9) Dosagem de DNA.....	50
4.10) Análise molecular do gene DD3.....	50
4.11) Imobilização e detecção de bases nitrogenadas e produtos de PCR.....	51
5) Resultados e discussões.....	53
5.1) Estudos de formação de filmes.....	53
5.2) Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	57
5.3) Microbalança eletroquímica a cristal de quartzo.....	59
5.4) Estudos de formação de filmes em diferentes valores de pH.....	61
5.5) Microscopias eletrônicas de varredura.....	64
5.6) Microscopia de força atômica.....	64
5.7) FTIR (espectroscopia do infravermelho: transformada de Fourier).....	65
5.8) Imobilização e detecção de bases nitrogenadas do DNA e produtos de PCR.....	67
6) Conclusões.....	71
7) Perspectivas futuras.....	72
8) Referências bibliográficas.....	73

Índice de figuras

Figura 1: esquema do aparelho reprodutor masculino, obtido da referência [1].....	17
Figura 2: estágios do câncer.....	22
Figura 3: tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2006. Gráfico obtido da referência [1].....	23
Figura 4: esquema geral de um biossensor.....	27
Figura 5: mecanismos de oxi-redução de guanina e adenina, obtidos da referência [41].....	27
Figura 6: detecção eletroquímica da hibridização do DNA baseada em um intercalador.....	28
Figura 7: detecção eletroquímica da hibridização do DNA com sonda marcada com enzima.....	28
Figura 8: detecção eletroquímica da hibridização do DNA baseado em nanopartículas metálicas, retirado da referência [40].....	29
Figura 9: híbrido polimórfico bloqueador do sinal de corrente.....	30
Figura 10: representação esquemática da oxidação da guanina mediada por um complexo de rutênio em solução.....	31
Figura 11: esquema geral de uma ECE.....	36
Figura 12: estruturas dos aminofenóis.....	40

Figura 13: estruturas da 3-aminofenoxazona e do poli(2-aminofenol) Figuras obtidas da referência [147].....	41
Figura 14: possível exemplo de interação do grupamento amino funcionalizado de um filme polimérico com as bases nitrogenadas do DNA.....	42
Figura 15: materiais utilizados para estudos eletroquímicos.....	44
Figura 16: sistema utilizado para a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo.....	45
Figura 17: equipamentos utilizados para os experimentos eletroquímicos e para limpeza dos eletrodos de trabalho de carbono grafite.....	45
Figura 18: equipamentos utilizados para o fornecimento de água deionizada, medidas de pH das soluções e limpeza dos eletrodos por ultra-som.....	46
Figura 19: equipamentos utilizados para os experimentos de infravermelho e para análise morfológica dos eletrodos modificados.....	46
Figura 20: eletrodo de FTO modificado com poli(3-aminofenol).....	49
Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Raia 1: padrão de peso molecular de 1000 pb. Raia 2: 277 pb (gene DD3).....	50
Figura 22: voltamograma cíclico de um eletrodo de carbono grafite em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KNO_3 , $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$	53
Figura 23: primeiro voltamograma cíclico de eletrodo de grafite em solução contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-aminofenol em $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 , variando o potencial anódico limite, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	54

Figura 24: primeiro e segundo voltamogramas cíclicos obtidos da eletropolimerização de $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-aminofenol (A) e 3-aminofenol (B), em meio de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 sobre eletrodos de carbono grafite, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	54
Figura 25: voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-aminofenol (A) e 3-aminofenol (B) em meio de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 sobre eletrodos de carbono grafite, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	55
Figura 26: voltamogramas cíclicos em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KNO_3 , de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli-2-aminofenol (A) e poli-3-aminofenol (B), $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$	56
Figura 27: voltamogramas cíclicos em solução contendo $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).....	56
Figura 28: diagrama de Nyquist para eletrodo de grafite sem filme (A) e de eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (B) e poli(3-aminofenol) (C) em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl	58
Figura 29: circuito equivalente dos sistemas.....	58
Figura 30: voltamogramas cíclicos; perfil frequência/potencial; perfil massa/potencial; obtidos durante eletropolimerização em solução contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (A) 2-aminofenol e (B) 3-aminofenol em meio de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 , $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	60
Figura 31: primeiros voltamogramas cíclicos em eletrodos de grafite obtidos da eletropolimerização em solução contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-aminofenol (A) e 3-aminofenol (B) em meio de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 em diferentes valores de pHs, sobre eletrodos de carbono grafite, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$	62
Figura 32: dependência do potencial com o valor de pH para poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).....	62

Figura 33: voltamogramas cíclicos em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KNO_3 , de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B), após 100 varreduras sucessivas de potencial em diferentes valores de pH, 100 mV.s^{-1}63

Figura 34: voltamogramas cíclicos em $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de solução de HClO_4 , de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B), após 100 varreduras sucessivas de potencial em diferentes valores de pH, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$ 63

Figura 35: microscopias eletrônicas de varredura de eletrodos modificados poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).....64

Figura 36: microscopias de força atômica de eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).....64

Figura 37: FTIR de 2-aminofenol (A1), 3-aminofenol (B1), poli(2-aminofenol) (A2) e poli(3-aminofenol) (B2).....66

Figura 38: voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão acetato, pH 4,5, de eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B). As setas indicam formação de dímeros, $v = 5 \text{ mV.s}^{-1}$ 67

Figura 39: voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4, de eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B). As setas indicam formação de dímeros, 5 mV.s^{-1} 68

Figura 40: voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação da mistura de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4, de eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B), 5 mV.s^{-1} 68

Figura 41: voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite modificado com poli(2-aminofenol) antes (—) e depois da hibridação (—); poli(3-aminofenol) antes (—) e depois da hibridação (—), em meio aquoso contendo tampão fosfato, pH = 7,4, $v = 10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Sonda utilizada: gene DD3.....69

Índice de tabelas:

Tabela 1: estágios do câncer de próstata (TNM).....	20
Tabela 2: estimativas para o ano 2006 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens, segundo localização primária.....	23
Tabela 3: procedimentos de imobilização convencionais.....	32
Tabela 4: sensores e suas aplicações.....	33
Tabela 5: seqüências nucleotídicas feitas utilizando o programa Blast.....	51
Tabela 6: dados provenientes dos espectros de impedância da figura 26.....	59

Lista de abreviaturas e siglas:

HBP – hipertrofia benigna da próstata

INCA – Instituto Nacional de Câncer

DRE – digital rectal exam (exame de toque retal)

PSA – prostate specific antigen (antígeno prostático específico)

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (arranjo de enzimas imuno-adsorvidas)

PCR – polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

VC – voltametria cíclica

VPD – voltametria de pulso diferencial

MECQ – microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

FTO – fluorine doped tin oxide (óxido de estanho dopado com flúor)

$K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ – ferrocianato/ferricianato de potássio

KNO_3 – nitrato de potássio

KCl – cloreto de potássio

$HClO_4$ – ácido perclórico

H_2SO_4 – ácido sulfúrico

FTIR – Fourier transforme infra red (espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier)

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MFA – microscopia de força atômica

ssDNA – single strand DNA (simples fita do DNA)

dsDNA – double strand DNA (dupla fita do DNA)

Z' – resistência

Z'' – reatância

V – volts

A – ampére

R – resistência

Q – capacitância

W – linhas de Warburg

m – massa

f – frequência

G, A, T e C – guanina, adenina timina e citosina

Materiais:

2-aminofenol (C_6H_7NO) 99% - Acros Organics. Massa molar: $109,13g.mol^{-1}$

3-aminofenol (C_6H_7NO) 98% - Aldrich. Massa molar: $109,13g.mol^{-1}$

Ácido nítrico (HNO_3) P.A (65%) – Cinética. Massa molar: $63,01 g.mol^{-1}$

Ácido perclórico ($HClO_4$) P.A (70%) – A.C.S. Massa molar: $100,46g.mol^{-1}$,

$1dm^3 = 1,675g$

Ácido sulfúrico (H_2SO_4) P.A (98%)- Merck. Massa molar: $98,08g.mol^{-1}$, $1dm^3 = 1,84g$

Ácido acético glacial (CH_3COOH) P.A. (100%) – A.C.S. Massa molar: $60,05g.mol^{-1}$,

$1dm^3 = 1,05g$

Hidróxido de sódio ($NaOH$) P.A – Vetec. Massa molar: $40,00g.mol^{-1}$

Nitrato de potássio (KNO_3) P.A – A.C.S. Massa molar: $101,10g.mol^{-1}$

Cloreto de potássio (KCl) P.A – Vetec. Massa molar: $74,56g.mol^{-1}$

Ferrocianeto de potássio [$K_4Fe(CN)_6.3H_2O$] P.A – Vetec. Massa molar: $422,39g.mol^{-1}$

Ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] P.A – Reagen. Massa molar: $329,25g.mol^{-1}$

Fosfato de sódio monobásico Anidro (NaH_2PO_4) P.A – Vetec. Massa Molar: $119,98g.mol^{-1}$

Fosfato de sódio dibásico Anidro (Na_2HPO_4) P.A – Vetec. Massa molar: $141,96g.mol^{-1}$

Acetato de sódio anidro ($CH_3COONa.$) P.A – Vetec. Massa Molar: $82,03g.mol^{-1}$

Éter de petróleo P.A – Biotec. $1dm^3 = 0,64g$

Acetona (CH_3OCH_3) P.A – A.C.S. Massa molar: $58,08g.mol^{-1}$

Guanina ($C_5H_5N_5O$) 99% - Acros Organics. Massa molar: $151,13g.mol^{-1}$

Adenina ($C_5H_5N_5$) 99,5% - Acros Organics. Massa molar: $135,13g.mol^{-1}$

Timina ($C_5H_6N_2O_2$) 99% - Acros Organics. Massa molar: $126,11g.mol^{-1}$

Citosina ($C_4H_5N_3O$) 99% - Acros Organics. Massa molar: $111,1g.mol^{-1}$

Ferrocenocarboxialdeído ($C_{11}H_8OFe$) P.A - Fluka, Massa molar: $214,05g.mol^{-1}$

Metanol (CH_3OH) P.A (99,9%) – Merck. Massa molar: $32,04g.mol^{-1}$, $1dm^3 = 0,79g$

Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.A (99,5%).-A.C.S. Massa molar: $46,07g.mol^{-1}$.

Resumo: O câncer de próstata em estágio inicial é completamente assintomático, só sendo detectado em exames de rotina pelo exame de toque retal. Os diagnósticos pelo PSA ainda devem ser seguidos de uma ultrasonografia retal, sendo necessário o desenvolvimento de plataformas diagnósticas que possam gerar resultados com rapidez, especificidade, sensibilidade e baixo custo, características encontradas nos sensores biológicos. Dentre esses biossensores, existem aqueles baseados em DNA. Polímeros, tais como poli(aminofenóis) são matrizes suporte e podem ser utilizadas para a imobilização de biomoléculas devido às características que apresentam, tais como, excelente permeabilidade, seletividade, reprodutibilidade e tempo de resposta rápida.

Foi possível a eletropolimerização de 2-aminofenol e 3-aminofenol. O polímero deste apresenta um crescimento auto-limitado e características não-condutoras, confirmadas em solução contendo o par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} enquanto que o polímero daquele apresenta um filme polimérico com características condutoras. Esses dados são corroborados por EIE, através de análise dos valores de resistência, baixos para o poli(2-aminofenol) e altos para o poli(3-aminofenol). Medidas de massa realizadas por MECQ indicam uma maior quantidade de filme polimérico formado para o poli(3-aminofenol) do que para o poli(2-aminofenol). Aumentando o pH das soluções ocorre um deslocamento no potencial de oxidação do monômero para potenciais mais catódicos e uma diminuição nos valores de corrente. MEVs e MFAs mostram filmes com características rugosas e espessuras diferentes, mais finos para o poli(3-aminofenol). Os resultados por FTIR sugerem possível polimerização via NH_2 com presença de bandas de -OH livres, pela possibilidade de ligações tipo C-N-C de bandas de amins aromáticas secundárias. A detecção das bases purínicas e pirimidínicas isoladas e em uma mistura única foi possível mostrando que as interações entre elas e os filmes poliméricos ocorrem por um mecanismo similar. Foram realizados experimentos de imobilização dos produtos de PCR específicos para câncer de próstata, com 277 pares de base, desnaturados e hibridizados, com a utilização do ferrocenocarboxialdeído como mediador do processo de detecção.

É possível a construção de eletrodos modificados com filmes poliméricos derivados de 2-aminofenol e 3-aminofenol, apresentando características espectroscópicas e eletroquímicas distintas. Os polímeros podem ser usados como matrizes de detecções de bases nitrogenadas de DNA e para construção de biossensores.

Palavras-chave: eletropolimerização, aminofenóis, biossensores

Abstract: The prostate cancer in initial stages is completely asymptomatic. It is detected in routine exams by digital rectal exam. The diagnosis by PSA must be followed by a rectal ultrasonography being necessary the development of diagnostic platforms that may generate fast results with specificity, sensibility and low costs, features found on biological sensors. Among these biosensors, there are those based on DNA. Polymers as poly(aminophenols) are support matrices and can be used for the immobilization of biomolecules due to their features such as excellent permeability, selectivity, reproducibility and fast response.

It was possible the electropolymerization of 2-aminophenol and 3-aminophenol. This polymer presents a self-limited growth and non-conducting behavior, confirmed in solution containing the redox pair $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ while that polymer presents a polymeric film with conducting properties. These data are corroborated by EIS through analysis of resistance values, low for poly(2-aminophenol) and high for poly(3-aminophenol). Measurements of mass made by MECQ points a greater amount of polymeric film for poly(3-aminophenol) than for poly(2-aminophenol). Increasing the pH values results in a shift on the potential of the monomer oxidation to more cathodic potentials and a decreasing on the current values. SEMs and AFMs show rough films with different thickness, thinner to poly(3-aminophenol). FTIR results suggest possible polymerization through NH_2 with the presence of free $-\text{OH}$ bands, due to the possibility of C-N-C bounds of secondary aromatic amines. The detection of purinic and pyrimidinic bases, isolated and in a mix, was possible showing that the interactions between them and the polymeric films occur by a similar mechanism. Experiments of immobilization of prostate cancer specific PCR products, with 277 base pairs were performed, denatured and hybridized with ferrocenecarboxyaldehyde as mediator for the detection process.

It is possible the construction of modified electrodes with polymeric films derived from 2-aminophenol and 3-aminophenol, presenting distinct spectroscopic and electrochemical properties. The polymers can be used as DNA nitrogenated bases detection matrices and they have the possibility of being used for biosensor construction.

Keywords: electropolymerization, aminophenols, biosensors

1) Introdução

1.1) A próstata

A próstata é um pequeno órgão situado logo abaixo da bexiga (**figura 1**), em forma de uma castanha portuguesa, atravessada pela uretra. É um órgão predominante entre os homens e o seu desenvolvimento é estimulado pelo hormônio sexual masculino, a testosterona, produzida pelos testículos [1].

A próstata é um órgão glandular que produz uma substância que, juntamente com a secreção da vesícula seminal e os espermatozoides produzidos nos testículos, vai formar o esperma. Sem o líquido produzido pela próstata, os espermatozoides não viveriam até atingir o óvulo no momento da fecundação. Além de conferir proteção, contém alimentos para o espermatozóide, na sua caminhada ao encontro do óvulo.

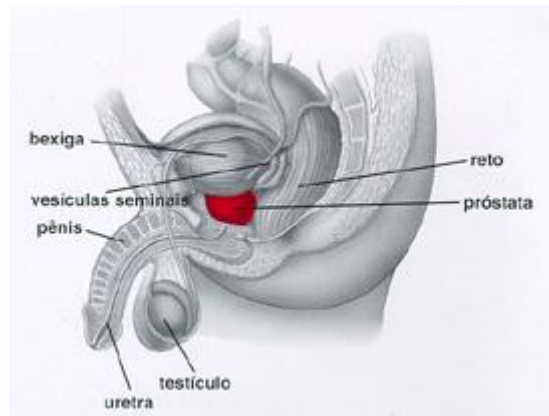


Figura 1: esquema do aparelho reprodutor masculino, obtido da referência [1]

1.2) Doenças da próstata

Srougi [2] apresentou dois pontos sobre o câncer de próstata. O primeiro é o fato de que sua incidência aumenta com a idade, atingindo quase 50 % dos indivíduos com 80 anos. Deste modo, um indivíduo que estiver por volta de 100 anos, provavelmente, não será poupado por esse tumor. O segundo é que, para a maioria de indivíduos, o câncer de próstata não lhes causa nenhum mal perceptível, não apresentando nenhum sintoma, na sua fase inicial. Numa fase adiantada, começará a obstruir a urina. As doenças na próstata podem ser divididas em duas classes: Não cancerosas e cancerosas.

1.2.1) Doenças não cancerosas

Prostatite aguda

É uma infecção bacteriana da próstata que ocorre em qualquer idade. Febre, calafrios, dor perineal, dificuldade e ardência para urinar são os principais sintomas. O tratamento é feito com antibióticos específicos e a cura é quase sempre obtida.

Prostatite crônica

É uma infecção bacteriana recorrente. Os sintomas são semelhantes aos da prostatite aguda, porém, sem febre, em menor escala e de duração bem mais prolongada. O tratamento é feito com antibióticos e/ou outros medicamentos de suporte. A condição é de difícil tratamento e pode haver necessidade de massagem prostática.

Hipertrofia benigna da próstata (HBP)

Também conhecido como adenoma de próstata, consiste em um crescimento das glândulas prostáticas e, conseqüentemente, de toda próstata. Suas causas ainda são indeterminadas. As estatísticas revelam que geralmente o HBP ocorre dos 40 anos em diante sendo mais comum a partir dos 60, atingindo 50% dos homens e acomete 90% dos homens entre 70 e 80 anos. O crescimento da próstata comprime a uretra determinando uma série de sintomas urinários como, por exemplo, levantar várias vezes para urinar, ardência para urinar e diminuição da força e calibre do jato urinário.

1.2.2) Câncer de próstata

Os tumores malignos da próstata são abscessos anormais que se dividem sem controle e sem ordem. Estas células podem invadir e danificar órgãos próximos à próstata. As células cancerosas também podem desprender-se de um tumor maligno e entrar na corrente sangüínea e/ou no sistema linfático. Assim, a neoplasia se dissemina desde o seu estágio primário, formando tumores secundários em outros órgãos [3].

O adenocarcinoma da próstata possui a sua etiologia indeterminada. Hering [4] salienta que o progredir da idade e a presença de testosterona no sangue são os fatores de risco mais importantes para o seu desenvolvimento. Além disso, a dieta rica em

gordura animal e a hereditariedade estão envolvidas com a doença. O risco de câncer de próstata aumenta 1,5 vezes quando um parente de 1º grau (pai ou irmão) tem o tumor e 5 vezes quando são acometidos dois parentes de primeiro grau. Nos casos hereditários, o câncer manifesta-se mais precocemente, muitas vezes antes dos 50 anos. Vê-se, então, que os antecedentes familiares têm particular importância por elevarem o risco de ocorrência do carcinoma prostático.

Segundo Rose [5], os “proto-oncogenes” dão a ordem para uma célula normal se transformar em outra maligna. Isto só não ocorre indiscriminadamente porque a função dos proto-oncogenes é antagonizada por outro grupo de genes protetores, chamados de “supressores”, dos quais os mais conhecidos são o p53 e o p21. Estes genes promovem o suicídio das células toda vez que elas sofrem um processo de degeneração maligna, num fenômeno conhecido como Apoptose. O câncer de próstata surge porque as múltiplas divisões celulares que ocorrem em todos os seres vivos acompanham-se de discreta fragmentação dos cromossomos, que vão se privando de parte de seu material genético. Com o passar dos anos, acumulam-se perdas dos genes supressores, ocasionando liberação da atividade dos proto-oncogenes e permitindo a degeneração das células prostáticas.

Pesquisadores [6] da Universidade de Umea, Suécia, em 1996, divulgaram uma das mais promissoras descobertas na área do câncer de próstata. Estudando 66 famílias com alta prevalência deste tipo de carcinoma, os pesquisadores identificaram no braço longo do cromossomo 1 o local onde, provavelmente, se aloja o principal proto-oncogene causador do câncer de próstata, que foi denominado câncer de próstata hereditário 1 (HPC1, do inglês, hereditary prostate cancer 1).

O câncer de próstata, quando avança, pode se disseminar pelo corpo, vindo a atingir outros órgãos e, principalmente, os ossos. Uma dor na coluna vertebral num indivíduo na idade de risco pode ser até uma disseminação do tumor. Pode também atingir as costelas, bacia, fêmures, etc. Muitas vezes o indivíduo tem uma fratura espontânea do fêmur, sem qualquer trauma, o que poderá ser uma fratura patológica, provocada pela disseminação do tumor.

A evolução dos pacientes com câncer de próstata depende de algumas variáveis, destacando-se o grau histológico do tumor e o estágio da doença no momento do diagnóstico e o volume tumoral. Sob o ponto de vista histológico, as neoplasias da próstata costumam ser classificadas em função do grau da distorção glandular. Um sistema utilizado para esse fim é o estadiamento TNM.

1.3) O estadiamento TNM

Desenvolvido pelo The American Joint Committee on Câncer [7], o TNM (**tabela 1 e figura 2**) é um sistema internacional que descreve os estágios da doença prostática e os métodos comuns de tratamento. T se refere ao tamanho do tumor primário, N descreve a extensão do envolvimento do nódulo linfático e M se refere à presença ou ausência de metástases.

Tabela 1: estágios do câncer de próstata (TNM) *

Estágio	Descrição
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
TO	Não há evidência de tumor primário.
T1 (Estágio A)	O tumor está limitado apenas à próstata. Nesse estágio, não causa nenhum sintoma. O tumor ainda é muito pequeno para ser sentido durante um exame de toque retal ou de ser observado por imagem durante o processo de varredura. Esses tumores normalmente são encontrados casualmente durante a cirurgia para um tumor benigno ou para alguma outra doença da próstata. Os tumores também podem ser encontrados durante o seguimento dos testes de rastreio que medem o PSA. Escolhas comuns de tratamento. Em outros casos, pode ser que nenhum tratamento seja necessário. Nesses casos, médico e paciente, decidem simplesmente observar o câncer.
T1a (A1)	Tumor incidentalmente encontrado em menos que 5% da amostra de tecido prostático.
T1b (A2)	Tumor incidentalmente encontrado em mais que 5% da amostra de tecido prostático.
T1c (BO)	Tumor identificado através de biópsia por agulha (em casos de PSA elevado).
T2 (Estágio B)	Um tumor que se encontra em estágio T2, ainda está limitado apenas à próstata. O tumor agora é suficientemente grande para ser sentido durante um exame de toque retal, mas os pacientes freqüentemente não experimentam quaisquer sintomas.
T2a (B1)	O tumor compromete menos da metade de um lobo da próstata. O

	tumor pode ser freqüentemente palpado (e é normalmente descoberto pelo médico durante um exame de toque retal).
T2b (B1)	O tumor compromete mais da metade de um lobo da próstata e normalmente pode ser palpado durante um exame de toque retal.
T2c (B2)	O tumor compromete ambos os lobos (o esquerdo e o direito) da próstata e é palpado durante um exame de toque retal.
T3 (Estágio C)	Neste estágio, o tumor se disseminou da próstata para o tecido imediatamente adjacente. As vesículas seminais podem ser incluídas.
T3a (C1)	O tumor se estende além da cápsula prostática em apenas um lado. Isso às vezes recebe a denominação de extensão extracapsular bilateral.
T3b (C2)	O tumor se estende além da cápsula prostática em ambos os lados.
T3c (C3)	O tumor invade uma ou ambas as vesículas seminais.
T4 (sem equivalente no sistema a, b, c e d)	No estágio T4, o tumor ainda está limitado à região pélvica, mas pode se disseminar para outras áreas.
T4a	O tumor se estende além da próstata e invade qualquer uma ou todas as estruturas a seguir: o colo vesical, o esfíncter externo (que ajuda a controlar a micção), e/ou reto.
T4b	O tumor se estende além da próstata e agora pode invadir os músculos elevadores do reto (os músculos que ajudam a levantar e a baixar o órgão) e/ou o tumor pode estar aderido à parede pélvica.
NO-N3	A hormonoterapia geralmente é utilizada em primeiro lugar como tratamento. A quimioterapia pode ser utilizada depois de a hormonoterapia não mais estiver dando resultados.
NO	Ausência de metástases em linfonodos regionais.
N1	O câncer de próstata é descrito como N1 se a metástase for encontrada em um único linfonodo na região pélvica e medir 2 cm ou menos em sua maior dimensão.
N2	O câncer de próstata é descrito como N2 se a metástase for encontrada em um único linfonodo medindo mais de 2 cm, mas

	menos de 5cm em sua maior dimensão. O N2 também pode ser utilizado para descrever as metástases ganglionares múltiplas, mas os linfonodos afetados não devem ser maiores que 5 cm em sua maior dimensão.
N3	O câncer de próstata é descrito como N3 quando as metástases em um linfonodo forem maiores que 5 cm em sua maior dimensão.
MO-M1	As escolhas disponíveis de tratamentos para o estágio M são iguais àquelas para o estágio N.
MO	Ausência de metástases distantes.
M1 (Estágio D2)	Metástases distantes (o tumor se estende além da região pélvica para outras partes do corpo), que podem incluir a coluna vertebral. Dor óssea, perda de peso e cansaço são sintomas comuns.

Dados obtidos da referência [8].

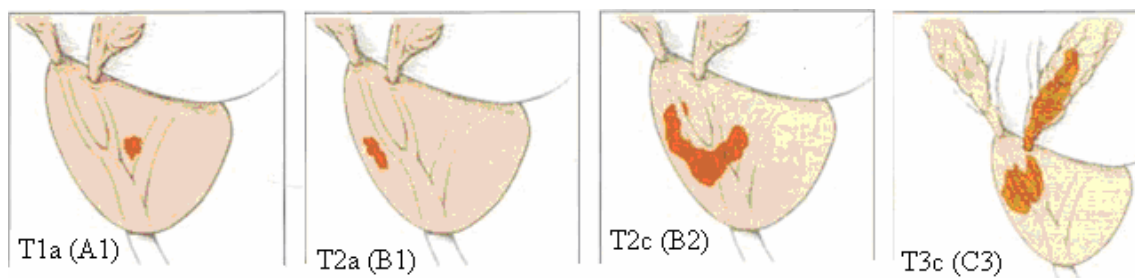


Figura 2: estágios do câncer.

1.4) As estimativas para o ano de 2006

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) é o órgão do Ministério da Saúde, vinculado à Secretaria de Atenção à Saúde, responsável por desenvolver e coordenar ações integradas para a prevenção e controle do câncer no Brasil.

A implementação das ações nacionais voltadas para a prevenção e controle do câncer depende diretamente das atividades relacionadas à vigilância que são realizadas com base nas informações obtidas dos Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), supervisionados pelo INCA/MS, e do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), do Ministério da Saúde, centralizado nacionalmente pela Secretaria de Vigilância à Saúde - SVS/MS. A partir destas informações, desde 1995, o INCA estima e publica anualmente a incidência de câncer que tem sido um recurso

indispensável para o planejamento destas ações. A última estimativa realizada mostrou que o número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil em 2006 foi de 47.280, valor correspondente a um risco de 51 casos novos a cada 100 mil homens.

Tabela 2: estimativas para o ano 2006 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em homens.*

Localização primária Neoplasia maligna	Estimativa dos casos Novos			
	Por estado		Por capital	
	Casos	Taxa Bruta (%)	Casos	Taxa Bruta (%)
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.850	19,41	5.300	26,40
Estômago	14.970	16,30	3.950	19,68
Próstata	47.280	51,41	13.980	69,74
Cólon e Reto	11.390	12,36	4.390	21,78
Esôfago	7.970	8,64	1.720	8,47
Leucemias	5.330	5,82	1.570	7,78
Cavidade Oral	10.060	10,91	3.050	15,01
Pele melanoma	2.710	2,92	830	3,80
Outras Localizações	61.530	66,92	18.370	91,45
Subtotal	179.090	194,77	53.160	264,63
Pele não melanoma	55.480	60,74	13.680	68,13
Todas as neoplasias	234.570	255,14	66.840	332,62

*Dados obtidos da referência [1].

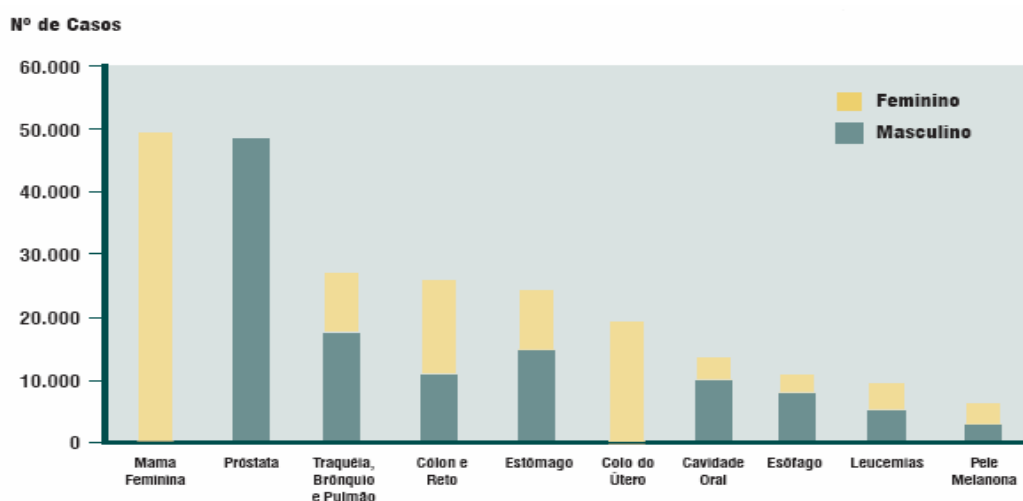


Figura 3: tipos de câncer mais incidentes, estimados para 2006. Gráfico obtido da referência [1].

No mundo, o número de casos novos diagnosticados de câncer de próstata representa 15,3% de todos os casos incidentes de câncer em países desenvolvidos e 4,3% dos casos em países em desenvolvimento. O câncer de próstata é o mais prevalente em homens.

Entre todos os tipos de câncer, este é considerado o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de 75 % dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. O aumento acentuado nas taxas de incidência tem sido influenciado pelo diagnóstico de casos latentes em indivíduos assintomáticos. As taxas aumentaram especialmente em regiões onde o rastreamento através do diagnóstico do Antígeno Prostático Específico (PSA, do inglês, Prostate Specific Antigen) é comum.

1.5) Diagnóstico

O câncer de próstata em estágio inicial é completamente assintomático [9], só sendo detectado em exames de rotina pelo exame de toque retal (DRE, do inglês, Digital Rectal Exam) [10].

Um segundo diagnóstico é feito pelo PSA, uma protease sérica produzida pelo epitélio prostático para manter o fluido seminal [11]. É composta de uma cadeia única de glicoproteína que exibe atividade proteolítica similar à quimiotripsina [12]. O primeiro arranjo imunológico criado para medir o PSA foi de tipo *sandwich*, um ensaio por enzimas imuno-adsorvidas (ELISA, do inglês, enzyme-linked immunosorbent assay) [13] suficientemente sensível para detectar PSA no soro de um homem normal e de pacientes com HBP e câncer de próstata. Os níveis de PSA [14] encontrados no sangue são muito baixos, na ordem de 0,4 à 4,0 ng.mL⁻¹. Os níveis de PSA estando entre 4,0 e 10,0 ng.mL⁻¹ são considerados suspeitos e devem ser seguidos de uma ultrassonografia retal, embora estudos [15] indiquem que a biópsia ainda pode ser evitada nesse nível.

Muitos trabalhos [16-21] estão sendo realizados utilizando o PSA como marcador para que se consiga diminuir a sensibilidade de detecção e auxiliar no tratamento do câncer. A maioria dos estudos tem contribuído também para o esclarecimento das causas e a função de alguns genes importantes no desenvolvimento desse tipo de câncer, com diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes com uma precisão relativamente alta, cerca de 97% [22-24]. Ainda, entretanto, 50% dos pacientes com câncer no estágio

T1 e 40% em T2 não são detectados por marcadores moleculares em sangue periférico [25]. Somente pacientes em estágio avançado (T3 e T4) é que são detectados com micrometástases circulantes em sangue periférico. O monitoramento da terapêutica adotada é ainda ineficaz, bem como poucos são os recursos para o tratamento deste câncer, culminando geralmente em cirurgia.

Atualmente, os únicos diagnósticos do câncer de próstata baseiam-se no toque retal e PSA, que levam à ultra-sonografia, porém sem sucesso na detecção dos estágios iniciais. Diante do contexto atual do diagnóstico das diversas doenças, propõem-se desenvolver plataformas diagnósticas que possam gerar resultados com rapidez, especificidade, sensibilidade e baixo custo, características encontradas nos sensores biológicos.

1.6) Biossensores

Um biossensor ou sensor biológico é um dispositivo analítico que contém um material biológico sensível imobilizado e um transdutor, para produzir um sinal quantitativo, proporcional à concentração do analito em questão [26]. Biossensores apresentam três componentes distintos:

- um elemento biorreconhecedor, para detectar analito(s) de interesse. Podem ser organelas, tecido animal ou vegetal, microrganismos, células [27], enzimas, antígenos, anticorpos [28], fragmentos de DNA;
- um elemento transdutor para converter a interação das biomoléculas (anticorpo a antígeno) em um sinal quantificável [29-31]. Os transdutores podem ser classificados como eletroquímicos (potenciométricos [32], amperométricos [33] e condutimétricos [34]), térmicos ou calorimétricos [35], ópticos [36], piezoelétricos [37] e baseados em superfície ressonante de plasma [38];
- um sistema de detecção para análise dos dados obtidos pelo transdutor, dispostos em gráficos ou dados numéricos.

Os sensores biológicos contribuem para o estabelecimento das técnicas analíticas, representando uma nova ferramenta para determinação de analitos no sangue (glicose, uréia, lactato, colesterol, DNA, antígenos, anticorpos), *screening* de bibliotecas de cDNA (DNA complementar), monitoramento ambiental, análise em alimentos e

determinação seletiva de doenças. Biossensores são classificados de acordo com o analito a ser detectado. Dentre eles, existem os biossensores baseados em DNA.

1.6.1) Biossensores baseados em DNA

1.6.1.1) Métodos de detecções

Desde que o conceito de biossensor eletroquímico de DNA foi introduzido por Millan e Mikkelsen em 1993 [39] vários trabalhos estão sendo realizados em todo o mundo [40-43]. O DNA se ajusta muito bem para as aplicações dos biossensores porque as interações dos pares de bases de sua estrutura com as seqüências complementares são específicas.

A eletroquímica apresenta propriedades interessantes sobre os outros sistemas de medidas devido à detecção dos analitos de interesse utilizando-se biossensores eletroquímicos ser rápida, simples e de baixo custo, além de servir muito bem para medir os eventos de hibridização usando um intercalador eletroativo [44-47].

Um biossensor de DNA básico é desenvolvido pela imobilização de um oligonucleotídeo de simples fita, produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, Polymerase Chain Reaction) ou DNA sobre a superfície de um transdutor para reconhecer a seqüência de DNA complementar através de hibridização. A dupla fita formada na superfície do eletrodo é conhecida como híbrida. Este evento é convertido, como descrito no tópico anterior, em um sinal analítico pelo transdutor (**figura 4**).

Esse método de detecção é chamado de detecção da hibridização a partir de sinais de DNA intrínsecos, onde se analisa a hibridização pelo decréscimo/aumento do pico de corrente das bases eletroativas do DNA tais como guanina e adenina. Estas bases são mais eletroativas que a citosina e a timina, pois podem ser facilmente adsorvidas e oxidadas em eletrodos de carbono [48-50]. Sinais de guanina e adenina em eletrodos de carbono podem ser observados [51].

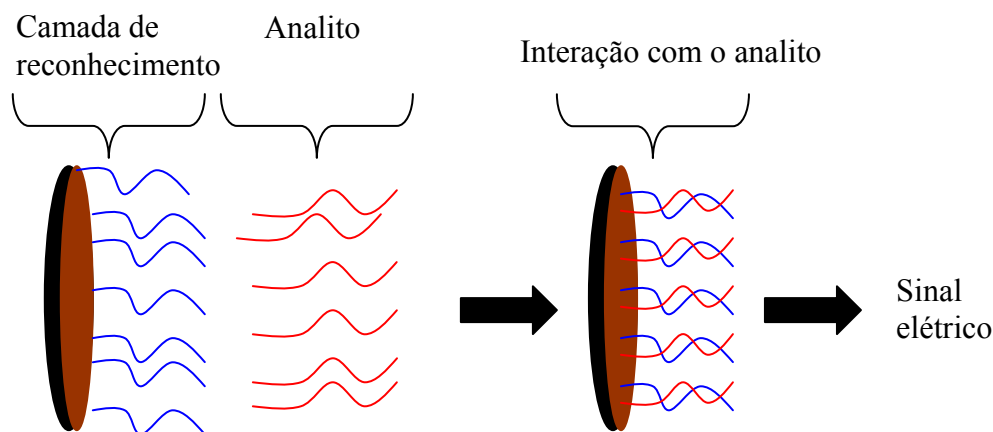


Figura 4: esquema geral de um biossensor.

A oxidação da guanina e adenina compreende duas etapas, com a perda de quatro elétrons e quatro prótons [52,53]. Para ambos os casos a primeira etapa é determinante para a velocidade da reação. A **figura 5** ilustra os mecanismos de oxi-redução para a guanina e adenina.

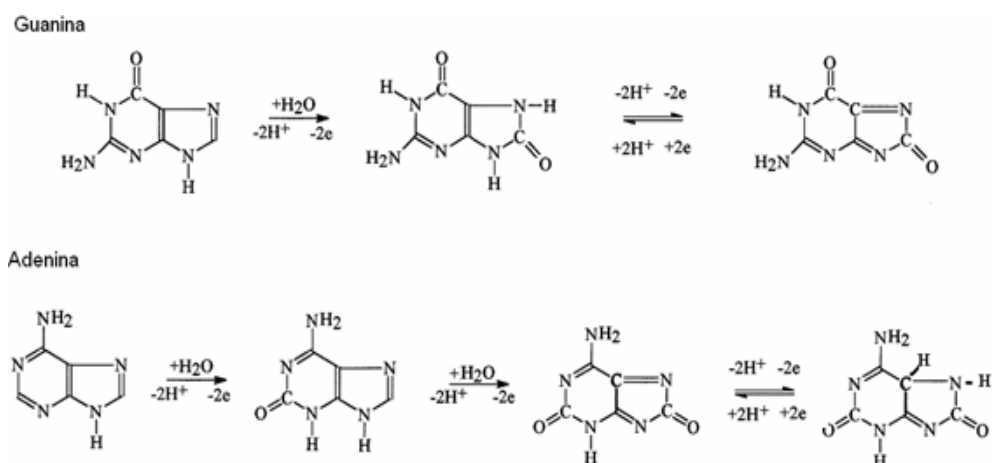


Figura 5: mecanismos de oxi-redução de guanina e adenina, obtidos da referência [41].

A detecção eletroquímica pode ser feita utilizando um intercalador. O eletrodo híbrido modificado é imerso em uma solução contendo uma molécula redox ativa DNA-ligante. A seguir, a detecção pode ser feita utilizando-se técnicas eletroquímicas como, por exemplo, a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial. A molécula pode ser inserida entre a dupla hélice do DNA e um aumento no sinal redox é observado. Ao contrário, se a molécula apresenta uma afinidade através das simples fitas do DNA então um sinal será observado do eletrodo modificado com a sonda. Estas mudanças no

potencial do pico de oxidação para a sonda e moléculas híbridas providenciam a base para a detecção da hibridização baseada em uma intercalação (**figura 6**).

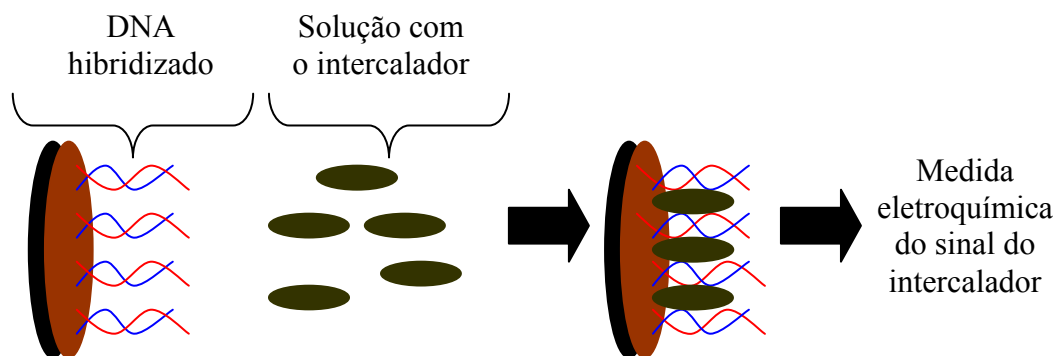


Figura 6: detecção eletroquímica da hibridização do DNA baseada em um intercalador.

Vários intercalantes como fenantrolina [54], bipyridina de rutênio [55], agentes anticancerígenos tais como equinomicina [56] e epirubicina [57], corantes tais como azul de metileno [58], além do brometo de etídeo [59], foram usados como marcadores para detecção da hibridização.

Exemplos práticos de biossensores comercializados, utilizando marcadores são os *chips* de DNA desenvolvidos pela Motorola Life Sciences Inc [60], eSensorTM e o sistema de detecção de hibridização eletroquímica do DNA da Toshiba [61], o GenelyzerTM.

Uma outra maneira de se detectar a hibridização do DNA é a partir do sinal eletroquímico gerado de um substrato após a hibridização com uma sonda marcada com uma enzima [62,63] (**figura 7**).

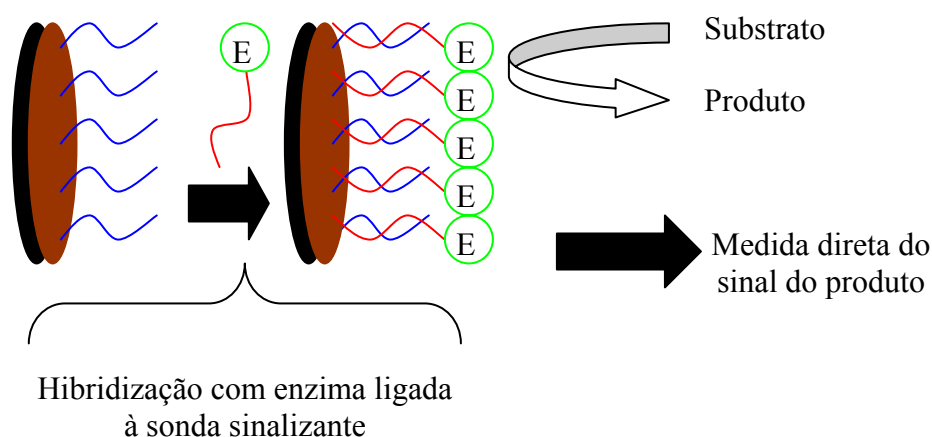


Figura 7: detecção eletroquímica da hibridização do DNA com sonda marcada com enzima.

O substrato é introduzido à superfície do eletrodo modificado com enzima e a atividade eletroquímica do produto formada é detectada, simplificando muito a detecção da hibridização do DNA.

Com o avanço das pesquisas em nanotecnologia, um método para detecção da hibridização do DNA, análogo ao das enzimas, é a marcação de uma sonda com uma nanopartícula metálica e o monitoramento é feito a partir de três modos: um sinal eletroquímico intrínseco da nanopartícula metálica sem dissolução (**figura 8A**), com dissolução (**figura 8B**) em meio ácido e as nanopartículas metálicas podem ser recobertas com uma camada de outro metal (ouro e prata, respectivamente para esse procedimento) para aumentar o sinal eletroquímico do metal recobridor (prata) (**figura 8C**) [64].

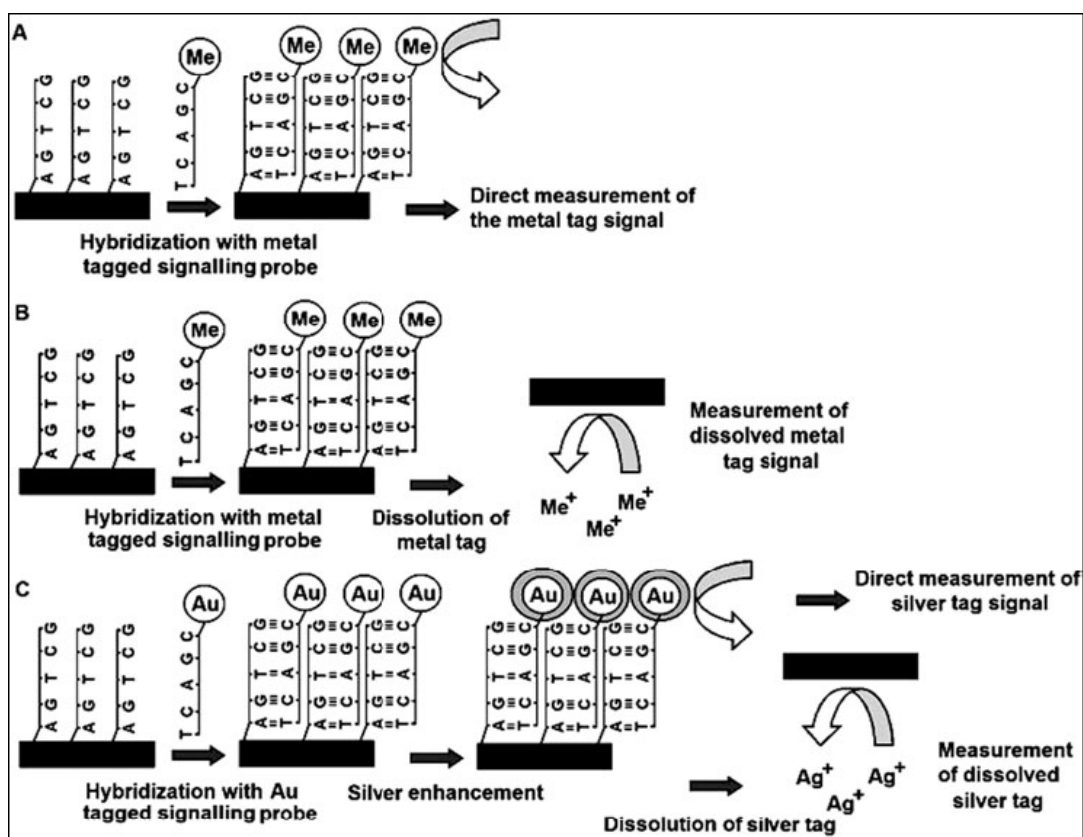


Figura 8: detecção eletroquímica da hibridização do DNA baseado em nanopartículas metálicas, retirado da referência [40].

Outros trabalhos [65-68] foram realizados com procedimentos similares ao descrito acima envolvendo também uma quantificação sensível de pares de base humanas amplificadas da seqüência do DNA do citomegalovírus [69] (HCMV, do inglês, Human Citomegalovirus). A hibridização do alvo HCMV é feita com oligonucleotídeos modificados com nanopartículas de ouro seguida de uma liberação do metal por

tratamento ácido e determinação indireta dos íons de ouro solubilizados por medidas voltamétricas.

Medidas envolvendo a diminuição do sinal eletroquímico podem ser obtidas para a detecção da hibridização do DNA com a utilização de produtos eletroinativos formados na superfície do eletrodo. Willner [70] utilizou uma produção biocatalizada de produtos insolúveis para detectar a hibridização do DNA eletroquimicamente a um eletrodo modificado com uma sonda. O DNA alvo é capturado em um eletrodo de ouro modificado com uma sonda, onde um intercalador de DNA redox ativo gera peróxido electrocataliticamente, o qual, em retorno, é oxidado por peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês, horseradish peroxidase). Este produto precipita na superfície do eletrodo bloqueando a reação com ferricianeto e fornecendo base para a detecção do DNA. De modo análogo, o fosfato de 5-bromo-4-cloro-3indol é enzimaticamente convertido para um precipitado insolúvel bloqueando, também, a reação do ferricianeto [71].

O problema das detecções da hibridização do DNA são os polimorfismos ou *mismatches*. Significa a presença de um par de bases que não se reconhecem (AT, CG) ao longo do híbrido. Se o híbrido está perfeitamente pareado então a corrente flui e um alto sinal de carga é obtido. Porém, se houver um polimorfismo no híbrido, o fluxo de corrente será bloqueado e nenhum sinal de carga pode ser monitorado, como ocorre com os sensores da GeneOhm Sciences Inc, uma das principais companhias de desenvolvimento de *chips* de DNA que também apresenta uma tecnologia para detectar polimorfismos utilizando a habilidade do DNA em transportar corrente elétrica com a utilização de um intercalador [72]. A presença de polimorfismos na estrutura do híbrido pode fornecer um sinal de falso positivo em detecções utilizando enzimas marcadas, pois o sinal proveniente dessa detecção é a partir do produto gerado por um substrato, completamente independente dos pareamentos da dupla fita. Detecções intrínsecas da hibridização podem ser realizadas antes da modificação das enzimas para confirmação de polimorfismos na estrutura. (**figura 9**).

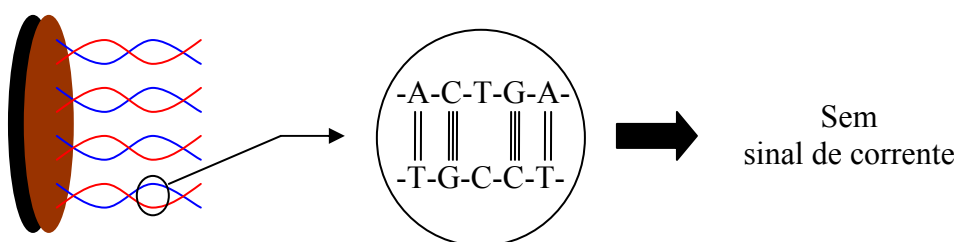


Figura 9: híbrido polimórfico bloqueador do sinal de corrente.

Normalmente, utiliza-se, para aumentar o sinal eletroquímico, um mediador em métodos que oxidam o DNA alvo indiretamente. Exemplos de mediadores são os complexos de rutênio II e ósmio II além do ferrocenocarboxialdeído usados para mediar a eletrooxidação da guanina (**figura 10**). O eletrodo é mantido a um potencial que oxida o complexo metálico reduzido, o qual entra em contato com o DNA. Os resíduos de guanina no DNA podem reduzir o complexo metálico, regenerando o mediador reduzido. O aumento do sinal reflete a quantidade de guanina disponível para oxidação.

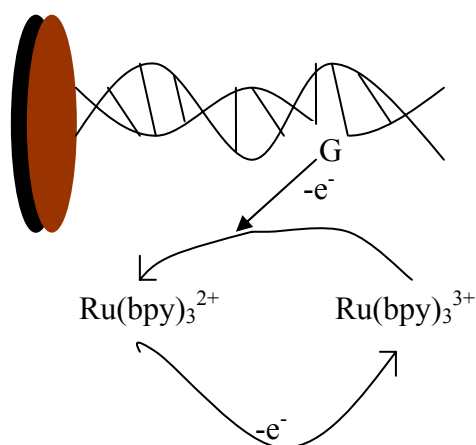


Figura 10: representação esquemática da oxidação da guanina mediada por um complexo de rutênio em solução.

A atividade das moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz da imobilização, condições da reação e a metodologia escolhida para a imobilização. Um número de técnicas tais como adsorção física, *cross-linking*, aprisionamento (*entrapment*) em gel, ligação covalente são utilizadas para a imobilização das moléculas como mostra a **tabela 3**:

Tabela 3: procedimentos de imobilização convencionais.

Técnica	Vantagens	Desvantagens	Exemplos	Referência
Adsorção física	Nenhuma modificação do biocatalisador. A matriz pode ser regenerada. Baixo custo.	Forças de ligação são suscetíveis a mudanças no pH, temperatura e força iônica.	Adsorção de glicose oxidase em polímeros condutores para detecção de glicose	Ramanathan [73-75]
Aprisionamento (<i>entrapment</i>)	Apenas confinamento físico do biocatalisador próximo ao transdutor. Baixo custo.	Alta barreira de difusão.	Aprisionamento de uréase e glutamato desidrogenase em filmes de sulfonato de polipirrol/polivinil para detecção de uréia.	Gambhir [76]
<i>Cross-linking</i>	Perda do biocatalisador é mínima. Custo moderado.	Tratamento do biocatalisador por produtos químicos.	Ligação entre lactato desidrogenase para estimativa de lactato mediada por glutaraldeído.	Chaubey [77]
Ligação covalente	Baixa resistência difusional. Estável sobre condições adversas	Tratamento por produtos químicos. A matriz não é regenerada.	Ligação GOD (glicose oxidase) via poli(ácido o-amino benzóico) para detecção de glicose	Ramanathan [78]

1.6.1.2) Utilização de polímeros para construção de biossensores

A utilização de polímeros formados eletroquimicamente na superfície do material de reconhecimento pode aumentar a transdução do sinal de hibridização, devido às suas características favoráveis, tais como, resistência mecânica dos filmes poliméricos formados, facilidade no controle de formação (quantidade, espessura do filme), estabilidade ao ar e em soluções aquosas, condutividade elétrica, maleabilidade para a imobilização da sonda ou proteção do eletrodo de adsorção de analitos não específicos.

Vários estudos foram realizados utilizando matrizes poliméricas condutoras para a construção de biossensores [79-93], embora poucos trabalhos [94-96] sobre a interação do DNA com polímeros condutores estejam disponíveis.

Além disso, estudos [97-102] mostram que os polímeros não condutores também podem ser usados para construir sensores biológicos tanto quanto os condutores. Suas propriedades passivantes também são bastante utilizadas nas indústrias eletrônicas.

Alguns exemplos de biossensores utilizando polímeros como matrizes suporte são mostrados na **tabela 4**, abaixo:

Tabela 4: sensores e suas aplicações

Polímero utilizado	Campos de aplicação	Características especiais	Referências
Membrana de celulose de origem bactericida	Detecção de glicose	Melhoramento na estabilidade do sensor amperométrico	Ammon <i>et al</i> [103]
Polianilina	Estimativa de glicose, uréia e triglicerídeos	Deposição de polímero e imobilização de enzima feitos eletroquimicamente	Sandokhar <i>et al</i> [104]
Poli(2-aminofenol)	Detecção de glicose	Imobilização em eletrodo de carbono vítreo platinizado	Zhang <i>et al</i> [105]
Polipirrol	Detecção de	Imobilização do eletrodo	Umana <i>et al</i>

	glicose	com uma enzima por eletropolimerização do pirrol	[106]
Politiramina	Detecção de L aminoácidos	Imobilização de enzima por eletropolimerização	Cooper <i>et al</i> [107]
Poli(2-aminofenol)	Detecção de ácido úrico	Polímero modificado por bioenzima em eletrodo de pasta de carbono	Miland <i>et al</i> [108]
Nafion	Detecção de glicose	Sensor baseado em eletrodo modificado por polímero otimizado por quimiometria	Su <i>et al</i> [109]
Poli (1,2-diaminobenzeno)	Detecção de glicose	Poli(1,2-diaminobenzeno) passivante cresce em filmes de polianilina para variar a sensibilidade	Barlett <i>et al</i> [110]
Polipirrol	Detecção H ₂ O ₂	Oligômeros de polipirrol podem agir como mediadores	Tatsuma <i>et al</i> [111]
Polímero de polipirrol modificado com ferroceno	Detecção de glicose.	Ferroceno–pirrol conjugam eficiente oxidante para glicose oxidase reduzida	Foulds <i>et al</i> [112]
polipirrol	Detecção de glicose	Glicose oxidase foi ligada covalentemente ao polipirrol pelo grupo N-(2-carboxietil)	Lowe <i>et al</i> [113]

1.7) Polímeros não-condutores e condutores

Polímeros não-condutores são matrizes suporte e podem ser utilizadas para a imobilização de biomoléculas devido às características que apresentam, tais como, excelente permeabilidade, seletividade, alta reprodutibilidade, tempo de resposta rápida.

Por definição, os polímeros não-condutores preparados por eletropolimerização apresentam grande resistência. O crescimento desses polímeros é auto-limitado e o filme formado é muito mais fino do que os filmes poliméricos condutores. Devido à sua fina espessura, entre 10 e 100 nanômetros, os substratos e produtos difundem-se mais rapidamente [114,115]. Também, os filmes não-condutores, por serem permeáveis e seletivos, podem ser úteis na prevenção de espécies interferentes de se aproximar do eletrodo.

Desde a descoberta dos polímeros condutores em 1977 [116] por MacDiarmid, Heeger e Shirakawa, os estudos sobre suas características, formação e utilização são assunto de vários trabalhos em todo mundo. Os polímeros condutores contêm ligações π entre carbonos conjugados, que são os responsáveis pelas suas propriedades eletrônicas incomuns como a alta condução eletrônica, baixa energia de transição ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica, dentre outras. Polímeros condutores diferem de todos os semicondutores cristalinos inorgânicos, por exemplo, o silício, em duas importantes formas; polímeros são moleculares por natureza e pela falta de ordem de longo alcance [117]. O requerimento essencial para os polímeros se tornarem, intrinsecamente condutores elétricos é de que deve haver uma sobreposição de orbitais moleculares para permitir a formação de funções de onda moleculares deslocalizadas. Além disso, os orbitais moleculares devem estar parcialmente preenchidos para haver movimento livre de elétrons [118]. O fenômeno de difusão nesses polímeros está associado a várias aplicações, contudo, é importante salientar que tal fenômeno está ainda interligado a outros como: condutividade, morfologia, reversibilidade, permeabilidade, seletividade a íons e tempo de resposta [119].

Foi provado que a eletropolimerização envolve uma reação eletroquímica-química-eletroquímica (ECE, do inglês, electrochemical-chemical-electrochemical). O primeiro passo (eletroquímico) ocorre com a eletrooxidação do monômero utilizado ao seu correspondente cátion-radical [120]. A parte química envolve a polimerização na

solução e, por último, a eletrodeposição do polímero formado na superfície do eletrodo (figura 11).

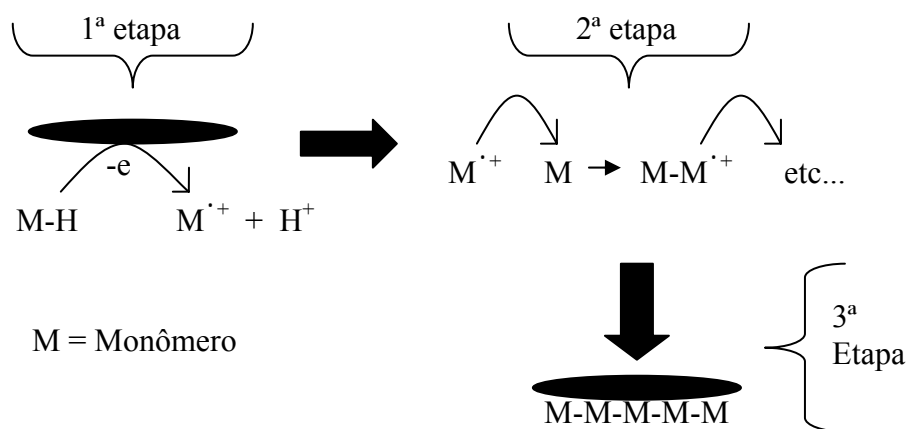


Figura 11: esquema geral de uma ECE

Os cátions-radicaís formados eletroquimicamente no primeiro passo podem, também, de acordo com as condições experimentais e devido à sua alta instabilidade, promover outros tipos de reação. Nos casos favoráveis a uma ECE, a dimerização é o primeiro passo da etapa química. O crescimento da cadeia e, conseqüentemente, formação do polímero, procede via reação do dímero resultante com outra molécula neutra e assim por diante. Porém, reações de dimerizações paralelas podem ocorrer levando a produtos diferentes ou a polímeros com estruturas distorcidas. Pode ocorrer, ainda, a reação de terminação entre dois cátions-radicaís gerando um dímero neutro. Os íons inativos presentes na solução podem ainda participar na estabilização dos cátions radicaís. Quantidades relativamente altas de cátions-radicaís e dímeros devem estar próximos da vizinhança do eletrodo devido ao fato deles poderem difundir do eletrodo facilmente. A agitação do sistema da solução decresce a quantidade de polímero formado. Os cátions-radicaís podem reagir com o eletrodo ou podem promover reações laterais com o solvente ou moléculas presentes na solução.

Mais importante que a formação do polímero é a sua caracterização. Várias técnicas eletroquímicas, espectroscópicas, microscópicas e radioquímicas foram estudadas e forneceram inúmeras informações sobre as transferências de carga eletrônicas e iônicas, processos de transporte de carga, morfologia, estrutura, estudos de mecanismos, estudos cinéticos, dentre outros. Porém em muitos estudos, o mecanismo de formação dos polímeros não é muito claro. A partir do monômero inicial e do polímero caracterizado,

vários caminhos reacionais são propostos, mas, por serem deduções a partir de dados experimentais, controvérsias são encontradas na literatura.

1.8) Técnicas eletroquímicas

1.8.1) Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial

Os estudos de formação de polímeros já foram realizados utilizando várias técnicas eletroquímicas. Uma das mais simples metodologias encontradas é a voltametria cíclica em que se observa uma relação potencial/corrente durante o processo eletroquímico. A voltametria cíclica é empregada para caracterizar o comportamento redox de compostos e para elucidar a cinética das reações dos eletrodos. A voltametria de pulso diferencial se baseia na aplicação de um pulso de potencial. A corrente antes e após o pulso de potencial é amostrada. A diferença dessas duas correntes é gravada em função do potencial. É uma técnica mais sensível que a voltametria cíclica sendo aplicada a detecções eletroquímicas com alta sensibilidade. O eletrodo no qual a reação de interesse ocorre é o eletrodo de trabalho. O eletrodo de referência é a referência em relação a qual o potencial do eletrodo de trabalho pode ser medido. O eletrodo auxiliar (também chamado de contra-eletrodo) é onde ocorre o fechamento do circuito elétrico. Uma corrente significativa flui entre os eletrodos auxiliar e de trabalho, onde a reação redox ocorre, enquanto que uma corrente desprezível flui até o eletrodo de referência; seu potencial, portanto, não é afetado pelo potencial de queda ôhmica, pela polarização de concentração e pela sobrevoltagem, mantendo um potencial de referência constante [121]. O sistema utilizado em uma cela de três eletrodos auxilia a reduzir mais a interferência do potencial de queda ôhmica na solução [122].

1.8.2) Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

Outra técnica bastante utilizada para estudo de filmes poliméricos e de aplicação em biossensores é a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ). Seu princípio de funcionamento está relacionado com o efeito piezoelétrico. Esse efeito se deve à propriedade de certos materiais gerarem um campo elétrico quando são submetidos a deformações ou pressões externas. Quando a polaridade da perturbação

mecânica varia, varia também a polaridade do campo elétrico gerado. Este fenômeno é conhecido como efeito piezoelétrico direto e os cristais que exibem este efeito são chamados de cristais piezoelétricos [123]. É utilizado um disco de cristal de quartzo piezoeletricamente ativo, parcialmente recoberto em ambas as faces com um filme metálico fino (ouro e platina são os mais comuns). As faces desse cristal são conectadas a um circuito elétrico que aplica um sinal de corrente alternada, gerando assim um campo elétrico que causa vibração do cristal em uma determinada frequência de ressonância [124]. Essas variações são medidas utilizando um frequencímetro comercial, com o qual, para um tempo de integração de 0,01s, é possível medir variações de 0,01Hz que superam a sensibilidade real da MECQ. Todo o sistema é conectado a um computador pessoal, permitindo a obtenção de dados e controle do experimento.

As variações na frequência que correspondem a uma adição ou subtração de massa podem ser descritas utilizando a equação de Sauerbrey [125]:

$$\Delta f = -(2f_0^2 / A\sqrt{\mu_c\rho_c})\Delta m, \quad [1]$$

Onde, Δf é a variação de frequência de ressonância em Hz, A é a área geométrica piezoeletricamente ativa em cm^2 definida pela projeção dos filmes metálicos depositados sobre o cristal, f_0 é a frequência fundamental do cristal, ρ_c é a densidade do cristal, μ_c é o módulo de cisalhamento do cristal e Δm é a variação de massa. Aplicando-se, então, um potencial entre os dois depósitos metálicos, haverá uma variação de frequência no sistema, que pode fornecer, matematicamente, o valor da massa depositada durante o processo eletroquímico.

O desenvolvimento da teoria associada à aplicação da MECQ a ambientes líquidos [126] possibilitou seu uso em caracterização de sistemas biomoleculares, tendo como propósitos, o desenvolvimento de sistemas sensores, bem como a investigação de processos interfaciais para o estudo destes sistemas [127].

1.8.3) Espectroscopia de Impedância eletroquímica

A técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada para caracterização de eletrodos modificados com polímeros condutores pela primeira vez por Bull e cols em 1982 [128]. A técnica proporciona informações sobre as diferentes constantes de tempo associadas aos processos eletroquímicos que ocorrem nas

interfaces de um eletrodo. O princípio da técnica consiste em aplicar uma perturbação senoidal de tensão ao sistema, de pequena amplitude e de frequência ω , gerando assim uma corrente AC provocada por um potencial descrito como: $E_{sen}(\omega t)$ que, de acordo com a Lei de Ohm, origina a impedância, $Z = [\Delta E_{sen}(\omega t)]/R$. É possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional.

A obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser conduzida mediante a utilização de diferentes modelos de medida, como circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. Por este temos um dos modos mais utilizados para apresentar as medidas de impedância, através do gráfico de Nyquist, no qual se pode observar os valores da parte imaginária da impedância (Z'') em função dos valores da parte real (Z'). Um diagrama de Nyquist ideal apresenta um semicírculo na região de altas frequências e uma variação linear em médias e baixas frequências. Na região de altas frequências, o efeito da relaxação de transferência de carga é mostrado através de um semicírculo, do qual pode-se obter os valores de R_e (resistência do eletrólito e eletrodo), R_{tc} (resistência à transferência de carga) e C_d (capacitância da dupla camada elétrica) [129]. Uma outra forma de tratar os dados experimentais de impedância é atribuir aos resultados um circuito equivalente, que possa simular a resposta AC do sistema eletroquímico. Os componentes do circuito podem ser: resistores que simulam o comportamento resistivo do eletrodo, eletrólito e polímero; capacitores que simulam o comportamento capacitivo das interfaces eletrodo/polímero e polímero/eletrólito; linhas de transmissão que simulam a impedância de difusão iônica, também conhecida como impedância de Warburg (W); elementos de fase constante (CPE) e elementos de difusão (T) [130].

1.9) Aminofenóis

A anilina [131] e o fenol [132] são monômeros que foram extensivamente estudados sobre a eletropolimerização. Anilinas substituídas normalmente são preferíveis devido a levarem a formação de polímeros com maior solubilidade e, assim, melhor processibilidade em solução. Os fenóis e seus derivados são conhecidos por formarem polímeros não-condutores. Estudos [133-135] têm sido realizados e indicam que monômeros contendo grupamentos aromáticos ligados diretamente a oxigênio

apresentam facilidade de polimerização, além de alta resistência mecânica do filme obtido propiciando maior estabilidade para o eletrodo modificado formado.

Aminofenóis são estruturas que podem ser classificadas como derivados do fenol e da anilina por apresentarem os grupos -NH_2 e -OH ligados a um anel aromático, ambos podendo ser oxidados. Um importante fator é a relação da posição desses dois grupos no anel. As propriedades eletroquímicas dos três isômeros de posição são extremamente diferentes [136] (**figura 12**).

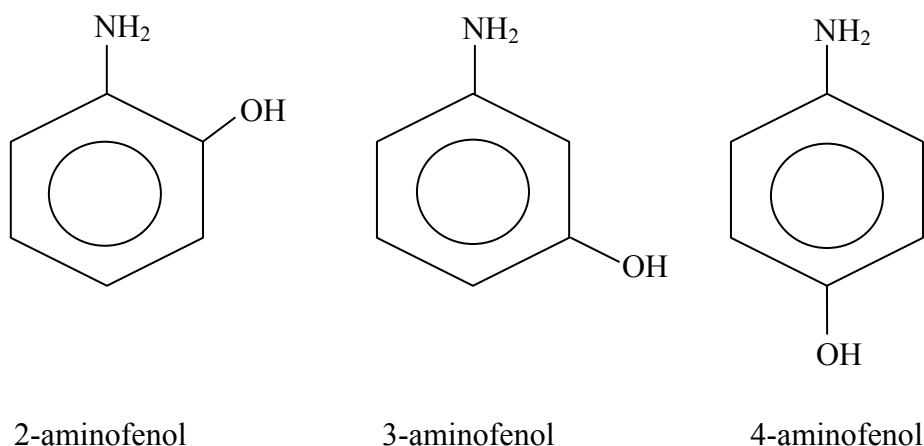


Figura 12: estruturas dos aminofenóis

Nosso laboratório já investiu em uma série de estudos de diferentes estruturas, dentre eles, a imobilização de bases nitrogenadas do DNA e o estudo de filmes poliméricos a partir da 4-anisidina [137,138], estudos de formação de filmes e eletrocatalise com a 4-metóxi-fenetilamina, tiramina [139] e ácido 4-hidróxi-fenilacético. Atualmente, houve uma maior atenção na eletropolimerização do 4-aminofenol, possibilitando a construção de eletrodos modificados [140] e a imobilização de bases nitrogenadas do DNA além da imobilização de substratos (aminoácidos e α -cetoácidos) [141].

Poucos estudos são encontrados na literatura com respeito à eletropolimerização do 3-aminofenol. Seu mecanismo de formação ainda é desconhecido devido ao fato de haver controvérsias sobre a formação do primeiro cátion-radical e, conseqüentemente, do início do mecanismo [142,143]. O polímero formado é considerado não-condutor e foi estudado, co-polimerizado com a anilina [144], utilizado para construção de sensores para detecção de bactérias [145] e de peróxido de hidrogênio.

O isômero mais estudado na literatura é o 2-aminofenol. Desde que sua polimerização eletroquímica foi realizada, por Barbero *et al*, 1987 e Hunimura *et al*, 1988 [146,147], vários trabalhos [148-158] foram realizados ao longo dos anos estudando sua polimerização, co-polimerização com outros monômeros, suas propriedades eletroquímicas e espectroscópicas além de várias aplicações, incluindo biossensores [146,147]. Do mesmo modo que os outros isômeros, seu mecanismo de polimerização ainda não foi definido [159] embora o produto já tenha sido caracterizado como derivado de anéis de fenoxazina (**figura 13**).

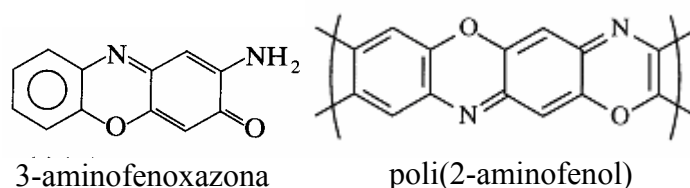


Figura 13: estruturas da 3-aminofenoxazona e do poli(2-aminofenol). Figuras obtidas da ref [147]

Diversos são os materiais de eletrodo que podem ser utilizados para polimerização, tais como mercúrio [160], ouro [161], grafite [162], pasta de carbono [163] e carbono vítreo [164]. Estes materiais podem ser utilizados para a construção de biossensores eletroquímicos de DNA. Comparativamente, as simples fitas do DNA apresentaram melhor adsorção em eletrodos de grafite [165], facilitando a transferência de carga entre as bases oxidáveis e o eletrodo.

A utilização dos filmes poliméricos funcionalizados, como é o caso dos aminofenóis, pode facilitar a imobilização das bases nitrogenadas do DNA pelas possíveis interações entre os grupos $-OH$ e $-NH_2$, que podem estar funcionalizados no polímero, com os grupos ativos das bases nitrogenadas (**figura 14**).

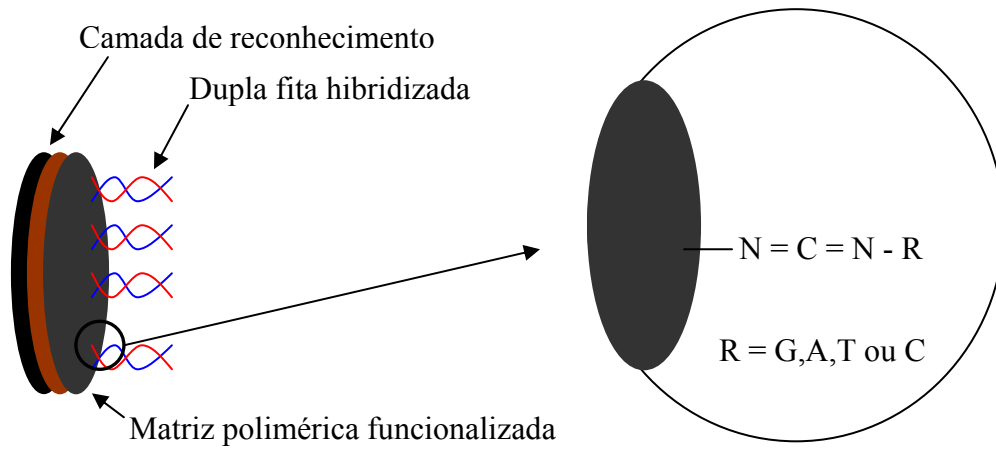


Figura 14: possível exemplo de interação do grupamento amino funcionalizado de um filme polimérico com as bases nitrogenadas do DNA.

2) Objetivos

Devido à necessidade do desenvolvimento de plataformas diagnósticas para a detecção do tumor maligno da próstata nos estágios iniciais, propomos nesse trabalho a construção de biossensores baseados em DNA utilizando superfícies de carbono grafite modificadas com filmes poliméricos derivados de 2-aminofenol e 3-aminofenol. A funcionalização dos polímeros formados apresenta características que podem influenciar positivamente na detecção eletroquímica do sensor construído. Dessa forma, os pontos a serem trabalhados são descritos, abaixo:

- Produção de eletrodos de grafite modificados com matrizes poliméricas a partir dos monômeros 2-aminofenol e 3-aminofenol, levando em consideração fatores como: pH do meio reacional, eletrólito suporte, concentração da solução monomérica, faixa de potencial e número de ciclos;
- Imobilização de bases nitrogenadas do DNA (guanina, adenina, timina e citosina) na superfície dos eletrodos modificados e estudo do sinal eletroquímico em tampão fosfato e acetato;
- Imobilização e detecção de produtos de PCR de região conservada de genes para câncer de próstata.

3) Materiais utilizados

Toda a vidraria utilizada foi deixada em banho de ácido nítrico concentrado por aproximadamente 24 horas e lavada, com água deionizada. Os reagentes foram utilizados sem pré-tratamento.

Para os estudos eletroquímicos foi utilizada uma cela eletroquímica de três compartimentos (**figura 15a**). Como eletrodo auxiliar foi utilizada uma placa de platina de 2cm² de área aparente (**figura 15b**). Todos os potenciais são referidos a um eletrodo de referência de calomelano saturado (**figura 15c**). Os eletrodos de trabalho utilizados foram de carbono grafite (6mm de diâmetro), carbono vítreo (3mm de diâmetro), ouro policristalino (3mm de diâmetro), ouro a partir de CDs regraváveis tipo (111) e FTO (óxido de estanho dopado com flúor) (**figura 15d**). Um sistema montado pode ser visto na **figura 15e**:

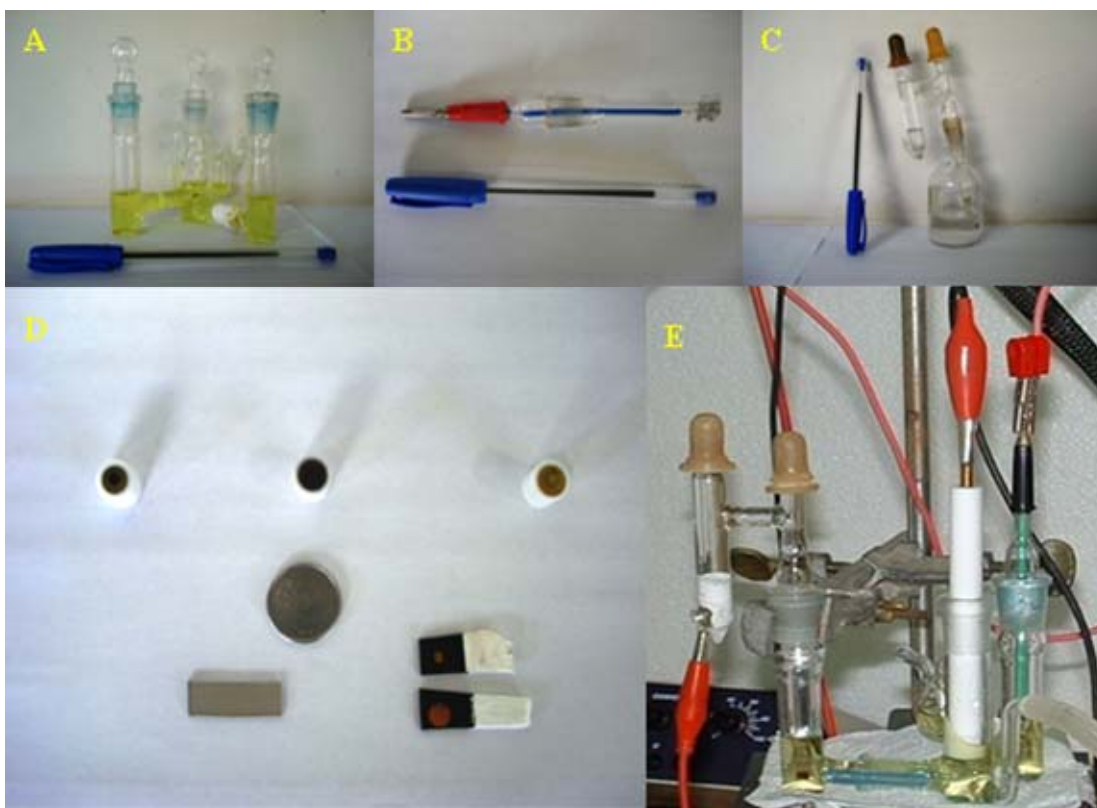


Figura 15: materiais utilizados para estudos eletroquímicos.

Para os estudos com a MECQ, o eletrodo de trabalho foi um cristal de quartzo de 13,7 mm de diâmetro (corte AT), com o recobrimento, em ambas as superfícies, com uma película de ouro com 5,11 mm de diâmetro (**figura 16C**). Um fio de platina de 1cm de comprimento foi usado como eletrodo auxiliar e um eletrodo de prata/cloreto de

prata ($\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ 3,5 mol.L⁻¹) como eletrodo de referência. O sistema foi conectado a uma célula eletroquímica de teflon com capacidade de 4ml de solução (**figura 16A, 16B**). Os eletrodos auxiliar e referência foram conectados ao potenciostato e os dois contatos elétricos do eletrodo de trabalho conectados a um frequencímetro.



Figura 16: sistema utilizado para a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo.

Para os estudos eletroquímicos foi utilizado um potenciostato PAR 273A (**figura 17a**). Para as medidas de massa foi utilizada uma microbalança de cristal de quartzo da CH Instruments Modelo 420A (**figura 17b**). Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas utilizando um potenciostato da CH Instruments Modelo 760C. Uma politriz Aropol 2V da Arotec (**figura 17c**) foi utilizada para polimento mecânico dos eletrodos de trabalho.



Figura 17: equipamentos utilizados para os experimentos eletroquímicos e para limpeza dos eletrodos de trabalho de carbono grafite.

Água deionizada foi obtida de um ultrapurificador microprocessado Master System Gehaka (**figura 18a**). Medidas de pH foram realizadas utilizando pHmetro Digital PG1800 (**figura 18b**). Foi utilizado ainda um ultra-som Ultrasonic Cleaner 1450 USC (**figura 18c**) para remoção de partículas dos eletrodos e para preparo de soluções.

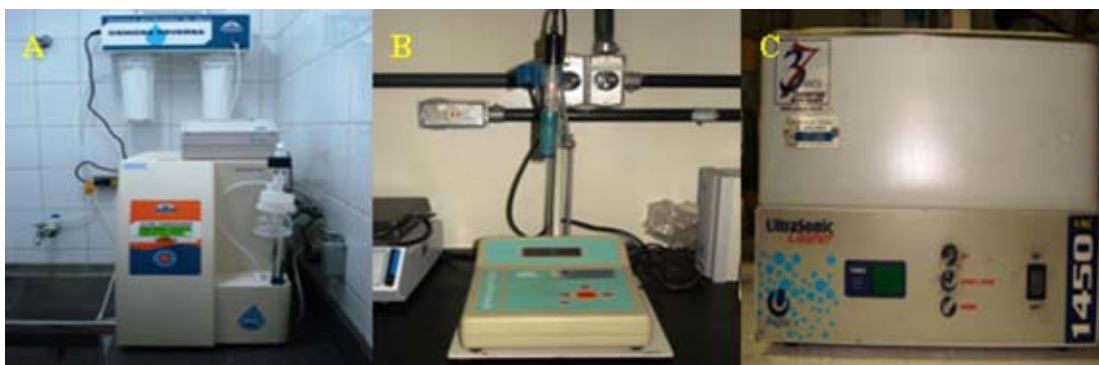


Figura 18: equipamentos utilizados para o fornecimento de água deionizada, medidas de pH das soluções e limpeza dos eletrodos por ultra-som.

Espectros de infravermelho das amostras foram obtidos através de FTIR (do inglês, Fourier Transform Infra Red) em um Perking Elmer spectrum 1000 (**figura 19A**), resolução de 4 cm^{-1} , 32 varreduras em pastilhas de KBr. As superfícies modificadas dos eletrodos foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 940A, marca ZEISS (**figura 19B**) e em microscópico de força atômica Nanoscope IIIa da Digital Instruments (**figura 19C**):



Figura 19: equipamentos utilizados para os experimentos de infravermelho e para análise morfológica dos eletrodos modificados.

4) Procedimento experimental

4.1) Pré-tratamento dos eletrodos

Os eletrodos auxiliares de platina foram flambados até sua superfície apresentar uma coloração avermelhada indicando a remoção de resíduos orgânicos na sua superfície.

Os eletrodos de trabalho de carbono grafite e ouro policristalino foram polidos mecanicamente em feltro umedecido com uma suspensão de alumina 0,30 μm e água deionizada em politriz e manualmente. Após esse tratamento, os eletrodos foram levados a um ultra-som para remoção de partículas residuais de alumina.

Os eletrodos de FTO foram limpos com sucessivas lavagens utilizando éter de petróleo, acetona e água deionizada. Posteriormente, foram secos com nitrogênio ultra-puro.

4.2) Preparo de soluções:

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada.

Soluções padrão contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foram preparadas utilizando 5×10^{-3} mol.L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5×10^{-3} mol.L^{-1} de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e 0,1 mol.L^{-1} de KNO_3 . Este par redox foi utilizado para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica em $\text{KCl } 1 \text{mol.L}^{-1}$.

Soluções dos monômeros 2-aminofenol e 3-aminofenol foram preparadas utilizando 0,5 mol.L^{-1} de ácido perclórico ou ácido sulfúrico como eletrólito suporte. O pH foi ajustado utilizando hidróxido de sódio e ácido perclórico.

As soluções foram deaeradas cerca de 45 minutos com nitrogênio ultra-puro.

4.3) Voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial

Medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando a técnica de VC, enquanto que a VPD foi utilizada para as detecções de imobilização das bases nitrogenadas.

Os eletrodos polidos foram transferidos para a cela eletroquímica, previamente deaerada contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Foram feitos voltamogramas cíclicos variando o potencial entre -0,10 V à +0,50 V a uma velocidade de varredura de 100 mV.s^{-1} .

Após esse processo, os eletrodos foram lavados, secos e transferidos para uma cela eletroquímica contendo o eletrólito suporte na ausência do monômero. A velocidade de varredura foi de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ em todos os experimentos.

Os eletrodos foram, finalmente, transferidos para a cela eletroquímica contendo o monômero a ser estudado (2-aminofenol ou 3-aminofenol). A eletropolimerização foi realizada alterando-se o pH, o número de varreduras e a faixa de potencial.

Após a eletropolimerização os eletrodos foram novamente levados às celas contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e ao eletrólito suporte para se analisar as diferenças eletroquímicas no eletrodo modificado.

4.4) Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)

O eletrodo de trabalho foi limpo eletroquimicamente em uma solução de H_2SO_4 $0,25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ utilizando-se uma faixa de varredura entre $-0,25$ à $+1,25 \text{ V}$, variando-se a velocidade de varredura entre 500 e $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Após a limpeza, o sistema foi desmontado, lavado e seco novamente e uma nova solução de medida foi transferida para a cela. As medidas eletroquímicas da microbalança foram realizadas concomitantemente a voltametria cíclica, 10 varreduras sucessivas de potencial. Os dados obtidos de frequência pelo potencial foram convertidos, através da equação de Sauerbry, para dados de variação de massa por potencial.

4.5) FTIR (espectroscopia do infravermelho: transformada de Fourier)

As eletropolimerizações sobre os eletrodos de FTO tiveram como finalidade principal as medidas de infravermelho. Isso se deve ao fato de se trabalhar com um eletrodo com maior área de contato $0,90 \text{ cm} \times 1,10 \text{ cm}$, propiciando aumento na quantidade de depósito sobre a superfície. O filme formado foi completa e facilmente extraído com jato de água de uma pisseta. Os filmes assim retirados foram removidos em um becker, lavado com água em abundância e secos em dessecador à vácuo antes das análises por infravermelho.

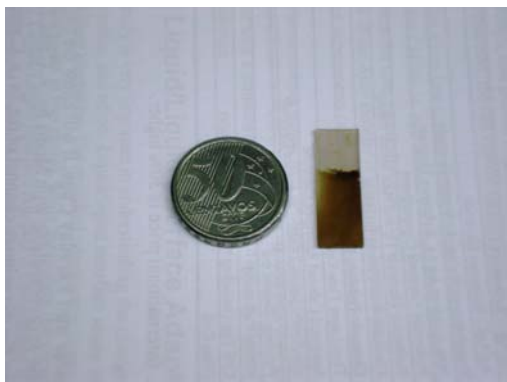


Figura 20: eletrodo de FTO modificado com poli(3-aminofenol)

4.6) Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os espectros de impedância foram realizados usando-se o mesmo sistema numa cela de três compartimentos, contendo uma solução de $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl como eletrólito suporte. As medidas para cada eletrodo foram feitas variando-se a faixa de frequência entre 10 KHz e 0,1 Hz usando-se um sinal de excitação senoidal com uma amplitude de excitação de 5 mV. Os espectros de impedância foram fitados para um circuito elétrico equivalente usando-se um programa de circuito equivalente da CH Instruments, modelo 760C, versão 6.21.

4.7) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As microscopias eletrônicas foram realizadas em eletrodos limpos e modificados com os filmes poliméricos, alterando as ampliações e as regiões nos eletrodos.

4.8) Microscopia de força atômica (MFA)

As microscopias de força atômica foram realizadas seguindo procedimento proposto por Lobo *et al* [169] para se medir a espessura e a rugosidade dos filmes formados.

4.9) Dosagem de DNA

Para a dosagem de DNA foram utilizadas cubetas de quartzo, espectrofotômetro ultravioleta-visível Shimadzu 1650PC e leituras de absorvância em 260 nm. No comprimento de onda de 260 nm, uma unidade de densidade óptica (OD) corresponde a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de DNA fita dupla.

A concentração do DNA também foi estimada em gel de agarose 0,8% de acordo com Sambrook *et al* [166].



Figura 21: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Raia 1: padrão de peso molecular de 1000 pb. Raia 2: 277 pb (gene DD3).

4.10) Análise molecular do gene DD3

A seqüência utilizada, com 277 bases, é a seguinte:

```
CCGAGGGAGACCAGGAAGATCTGCATGGTGGGAAGGACCTGATGATACAGAGGTGAGAA  
ATAAGAAAGGCTGCTGACTTTACCATCTGAGGCCACACATCTGCTGAAATGGAGATAAT  
TAACATCACTAGAAACAGCAAGATGACAATATAATGTCTAAGTAGTGACATGTTTTTGC  
ACATTTCCAGCCCCTTTAAATATCCACACACACAGGAAGCACAAAAGGAAGCACAGAGA  
TCCCTGGGAGAAATGCCCGGCCGCCATCTTGGGTCATCGAT
```

A análise da seqüência nucleotídica foi feita utilizando-se o programa Blast [167].

Tabela 5: seqüências nucleotídicas feitas utilizando o programa Blast

Sequences producing significant alignments	Score (bits)	E value
gb AY894120.1 Homo sapiens non-coding RNA DD3 sequence	230	2^{-58}
gb AF103907.1 AF103907 Homo sapiens non-coding RNA DD3 sequence	187	2^{-52}
emb AL359314.14 Human DNA sequence from clone RP11-108L4 on ...	153	6^{-47}
gb AF103908.1 AF103908 Homo sapiens non-coding RNA DD3 gene, exo	153	3^{-41}
gb DQ374661.1 Homo sapiens non-coding RNA DD3PCA3 splice var...	63.8	2^{-23}
gb DQ374660.1 Homo sapiens non-coding RNA DD3PCA3 splice var...	52.4	2^{-12}
gb DQ374659.1 Homo sapiens non-coding RNA DD3PCA3 splice var...	52.4	2^{-12}
gb DQ374662.1 Homo sapiens non-coding RNA DD3PCA3 splice var...	57.9	8^{-12}
gb AF279290.1 AF279290 Homo sapiens prostate-cancer-specific ...	50.6	3^{-4}
emb AM238664.1 Streptomyces ambofaciens ATCC 23877 right	37.3	0.46
emb BX640414.1 Bordetella pertussis strain Tohama I, complet...	32.7	1.5
gb AC105926.5 Homo sapiens BAC clone RP11-801F10 from 2, comple	38.2	1.5
emb AL389889.11 Human DNA sequence from clone RP11-164D18 on	29.5	1.7
gb AC130465.2 Homo sapiens chromosome 16 clone CTA-962B4, compl	37.7	2.1

4.11) Imobilização e detecção de bases nitrogenadas e produtos de PCR

Foram feitas imobilizações nos eletrodos, limpos e modificados, com as bases nitrogenadas do DNA.

As quatro bases nitrogenadas do DNA (guanina, adenina, citosina e timina) foram imobilizadas nos eletrodos, isoladas e misturadas. 15µL foram adicionados na superfície do eletrodo modificado com filme polimérico. Os eletrodos foram deixados à temperatura ambiente por um período de 24 horas ou à vácuo durante 3 horas para que a adsorção se completasse. Os eletrodos foram levados a uma cela eletroquímica contendo tampão fosfato, pH 7,4 ou tampão acetato, pH 4,5 para as análises eletroquímicas. Voltametria de pulso diferencial foi utilizada para esse fim.

Para as imobilizações e detecções do produto de PCR, com 277 pares de base realizamos os seguintes passos:

- I) Produção de eletrodo modificado com simples fita do DNA proveniente do produto de PCR:
 - a) desnaturou-se o produto de PCR, à 98°C, em banho-maria, por 5 minutos;
 - b) aqueceu-se o eletrodo modificado, em estufa, à 98°C;
 - c) gotejou-se 15µL do produto de PCR desnaturado na superfície pré-aquecida do eletrodo modificado. O sistema foi deixado na estufa (98°C), por 3 minutos;
 - d) lavou-se o sistema, com água deionizada, secou-se com nitrogênio ultra-puro.
 - e) pré-aqueceu-se o sistema, em estufa, à 50°C;
 - f) imobilizou-se 15 µL de uma solução de ferrocenocarboxialdeído dissolvido em metanol. O sistema foi deixado na estufa, à 50°C, por 3 minutos;
 - g) repetiu-se o procedimento d);
 - h) detectou-se eletroquimicamente, em tampão fosfato, utilizando VC.

- II) Detecção da hibridização com o produto de PCR complementar:
 - i) repetiu-se as etapas de desnaturação;
 - j) imergiu-se o eletrodo modificado contendo o ssDNA complementar;
 - k) incubou-se por 45 minutos;
 - l) repetiu-se o procedimento d);
 - m) repetiu-se o procedimento h).

5) Resultados e discussões

5.1) Estudos de formação de filmes

A primeira medida eletroquímica em um eletrodo de grafite recém-polido foi feita em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ utilizando-se voltametria cíclica. O voltamograma obtido usado como padrão para os outros eletrodos pode ser visto na **figura 22**, abaixo:

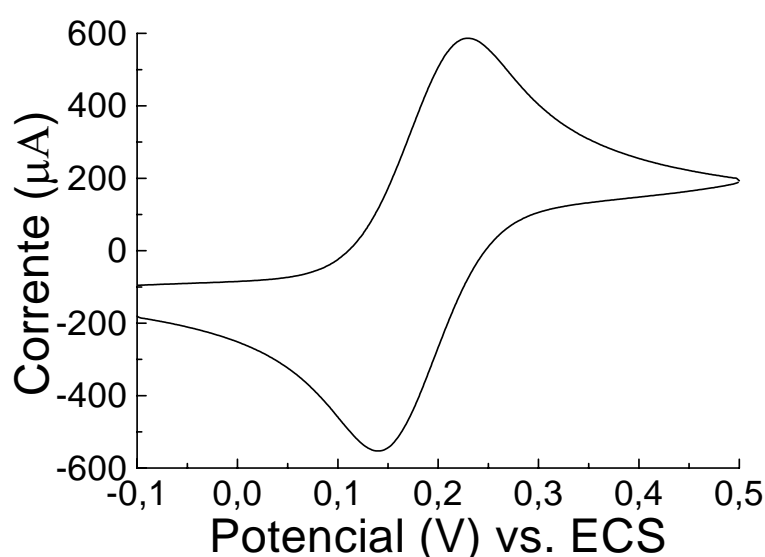


Figura 22: voltamograma cíclico de um eletrodo de carbono grafite em solução contendo 5×10^{-3} mol.L⁻¹ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5×10^{-3} mol.L⁻¹ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1$ mol.L⁻¹ KNO_3 , $v = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$

Estudos iniciais de formação dos polímeros foram feitos utilizando-se voltametria cíclica. Ácido perclórico foi utilizado como eletrólito suporte a uma velocidade de varredura constante de $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. De início, uma varredura foi feita variando o potencial entre $0,0$ e $+2,0$ V. Pôde-se observar que, para potenciais maiores que $+0,8$ V não há nenhuma ocorrência de picos redox para o 2-aminofenol. A mesma situação ocorre com o 3-aminofenol com potenciais maiores do que $1,0$ V. Para o 3-aminofenol, apenas uma onda de oxidação é observada, podendo, assim, limitarmos a um potencial anódico limite próximo do fim dessa onda. Porém, para o 2-aminofenol duas ondas de oxidação bem próximas uma das outras são observadas (**figura 23**):

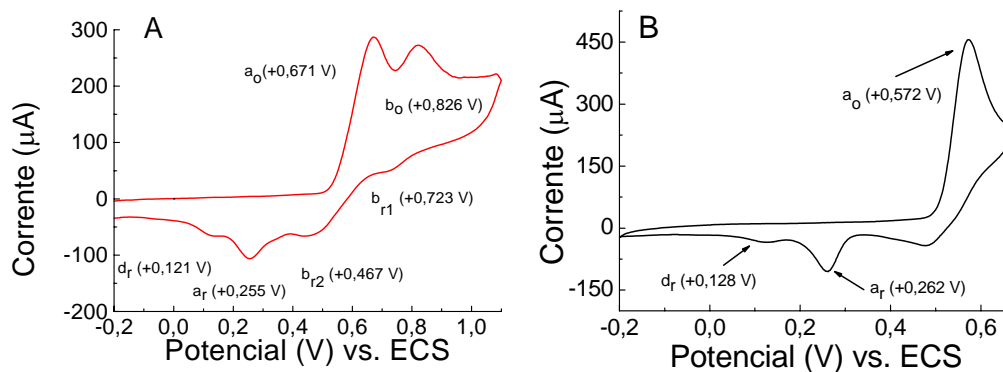


Figura 23: primeiro voltamograma cíclico de eletrodo de grafite em solução contendo $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de 2-aminofenol em 0,5 mol.L⁻¹ de HClO₄, variando o potencial anódico limite, $v = 50 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Na **figura 23A**, foram observadas duas ondas de oxidação e quatro ondas de redução, enquanto que, variando-se o potencial anódico limite até o final da primeira onda, **figura 23B**, apenas duas ondas de redução aparecem. A primeira onda de oxidação (a_0) resulta na aparição das ondas a_r e d_r . As ondas de redução b_{r1} e b_{r2} só surgem quando a segunda onda (b_0) está presente. A formação de outras ondas resulta em possibilidades de reações paralelas com o filme em crescimento, dificultando o estudo do mecanismo de eletropolimerização e de caracterização do filme. Estes resultados sugerem que, a primeira onda de oxidação é relativa à formação de um cátion-radical, responsável pelo início de formação do polímero, não necessitando atingir potenciais mais anódicos.

Dessa forma, utilizou-se para os experimentos de eletropolimerização, uma variação de potencial de -0,2 à +0,670 V para o 2-aminofenol e de -0,2 à +1,1 V para o 3-aminofenol. Voltamogramas cíclicos dos monômeros podem ser vistos na **figura 24**:

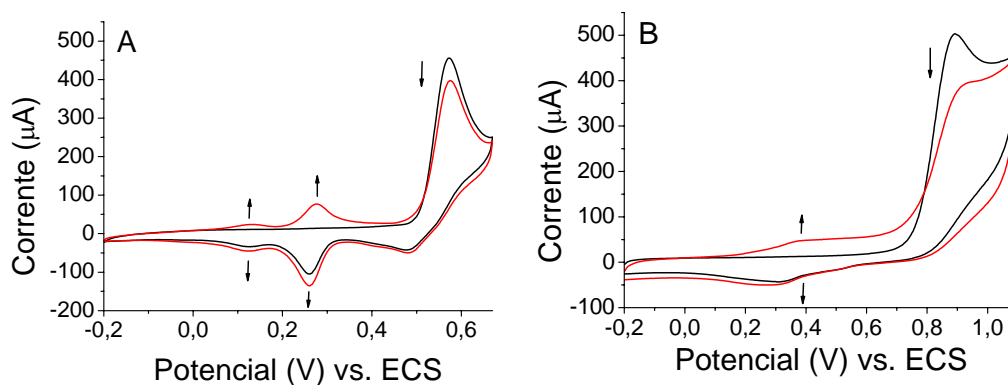


Figura 24: primeiro e segundo voltamogramas cíclicos obtidos da eletropolimerização de $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de 2-aminofenol (A) e 3-aminofenol (B), em meio de 0,5 mol.L⁻¹ de HClO₄ sobre eletrodos de carbono grafite, $v = 50 \text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

O potencial de oxidação de cada monômero difere em valores de potencial e de corrente, mesmo sendo estruturas semelhantes, provando-se o fato da posição entre os grupos $-OH$ e $-NH_2$ influenciar no processo de eletrooxidação. No caso do 2-aminofenol, observou-se a formação de uma onda de oxidação em torno de $+0,572$ V e duas de redução à $+0,262$ V e $+0,128$ V. A partir de uma segunda varredura, surgiram duas ondas de oxidação à $+0,134$ V e $+0,277$ V. Essas ondas são complementares às de redução sendo considerados pares redox reversíveis. A onda no potencial mais anódico, que se refere à formação do cátion-radical, apresenta uma ligeira queda em relação à corrente e não apresenta uma onda redox complementar, sendo assim, irreversível. Para o 3-aminofenol, o potencial da primeira onda de oxidação é mais anódico ($+0,892$ V). Uma onda de redução acompanha o voltamograma com um valor de corrente muito pequeno e uma faixa de potencial muito grande, por volta de $+0,314$ V. O segundo voltamograma mostra uma onda de oxidação complementar à de redução em cerca de $+0,375$ V. A onda mais anódica, referente à formação do cátion-radical sofre um acentuado decréscimo no valor de corrente. O par redox não mostra alterações significantes de corrente a partir desse ponto. Essas características eletroquímicas sugerem a formação de um polímero não-condutor na superfície do eletrodo, auto-limitado, fino e com impedimento do aumento dos valores de corrente do par redox. Estudou-se, então, a formação de filmes poliméricos com um número maior de varreduras (25, 50 e 100 varreduras). As últimas varreduras de cada estudo são visualizadas na **figura 25**, abaixo:

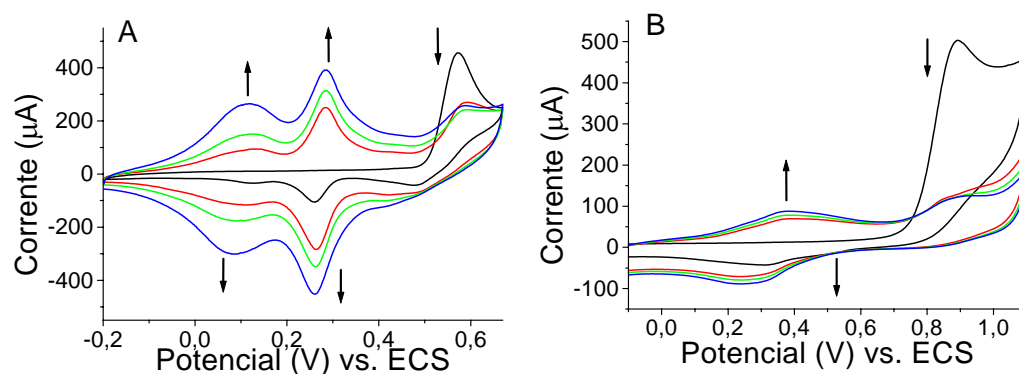


Figura 25: voltamogramas cíclicos de eletrodos de grafite contendo $2,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ de 2-aminofenol (A) e 3-aminofenol (B) em meio de $0,5$ mol.L⁻¹ de HClO₄ sobre eletrodos de carbono grafite, $v = 50$ mV.s⁻¹.

1.

Esse estudo mostra que, para o 3-aminofenol, a variação de número de varreduras faz com que o valor de corrente do pico de oxidação do monômero decresça enquanto o par redox mostra aumento de corrente pouco significativo. Isso mostra que o eletrodo está recoberto com um filme polimérico não-condutor. Para o 2-aminofenol, após 100 varreduras, os dois pares redox mostram um crescimento expressivo nos valores de corrente. Para analisar a resposta eletroquímica do filme formado, os eletrodos modificados foram transferidos para uma cela contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (**Figura 26**) e, posteriormente, para uma cela contendo apenas a solução do eletrólito suporte, sem o monômero (**Figura 27**).

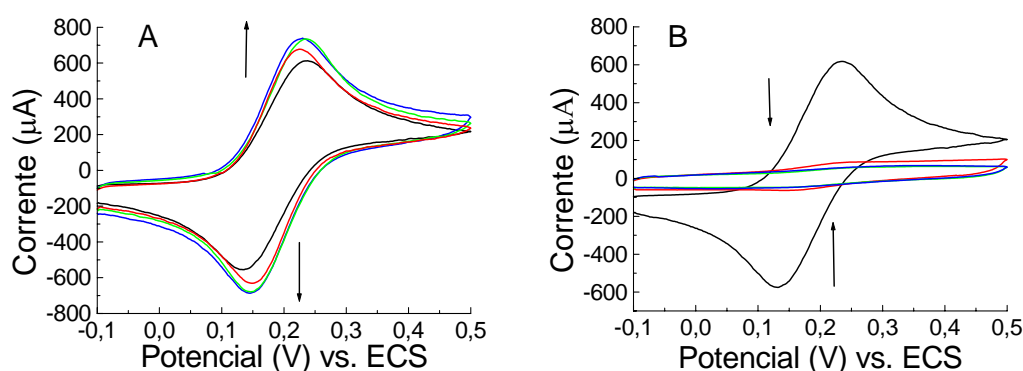


Figura 26: voltamogramas cíclicos em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli-2-aminofenol (A) e poli-3-aminofenol (B), $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$.

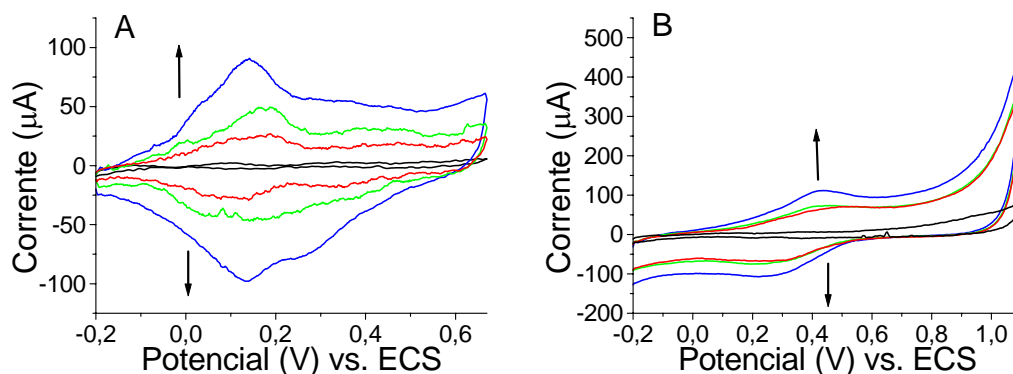


Figura 27: voltamogramas cíclicos em solução contendo $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).

Como se pode ver, o gráfico do poli(3-aminofenol) confirma os resultados não-condutores obtidos nos gráficos de eletropolimerização. O material polimérico na superfície do eletrodo reduziu a transferência de elétrons entre o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Ao contrário, o poli(2-aminofenol) auxiliou a transferência eletrônica com maiores valores

de corrente que o eletrodo de grafite sem modificação. No **gráfico 27B**, pode-se ver um voltamograma com um par de ondas redox exatamente onde o filme polimérico foi formado. No **gráfico 27A** pode-se observar a presença de um par redox em uma faixa de potencial pertencente ao par redox mais catódico, referente ao polímero formado. O par redox inicial formado no início da eletropolimerização deve ser relacionado ao dímero formado na reação entre um monômero e um cátion radical. Com esses estudos, os trabalhos posteriores utilizaram o estudo de filmes poliméricos formados com 100 varreduras sucessivas de potencial, pois é o valor onde foi observado estabilização do par redox mais catódico, para o 2-aminofenol, responsável pela formação do polímero, e onde foi estabilizado os voltamogramas do 3-aminofenol. Estudos feitos com mais de 100 varreduras não alteraram significativamente os valores de corrente e potencial de eletropolimerização.

5.2) Espectroscopia de impedância eletroquímica

Medidas de resistência em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foram feitas utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica. Um filme formado com 100 varreduras sucessivas de potencial a partir de cada monômero foi utilizado para esse experimento (**figura 28**). Um circuito equivalente foi montado com bases nos espectros (**figura 29**). Os valores numéricos para as resistências obtidas dos gráficos podem ser vistos na **tabela 6**:

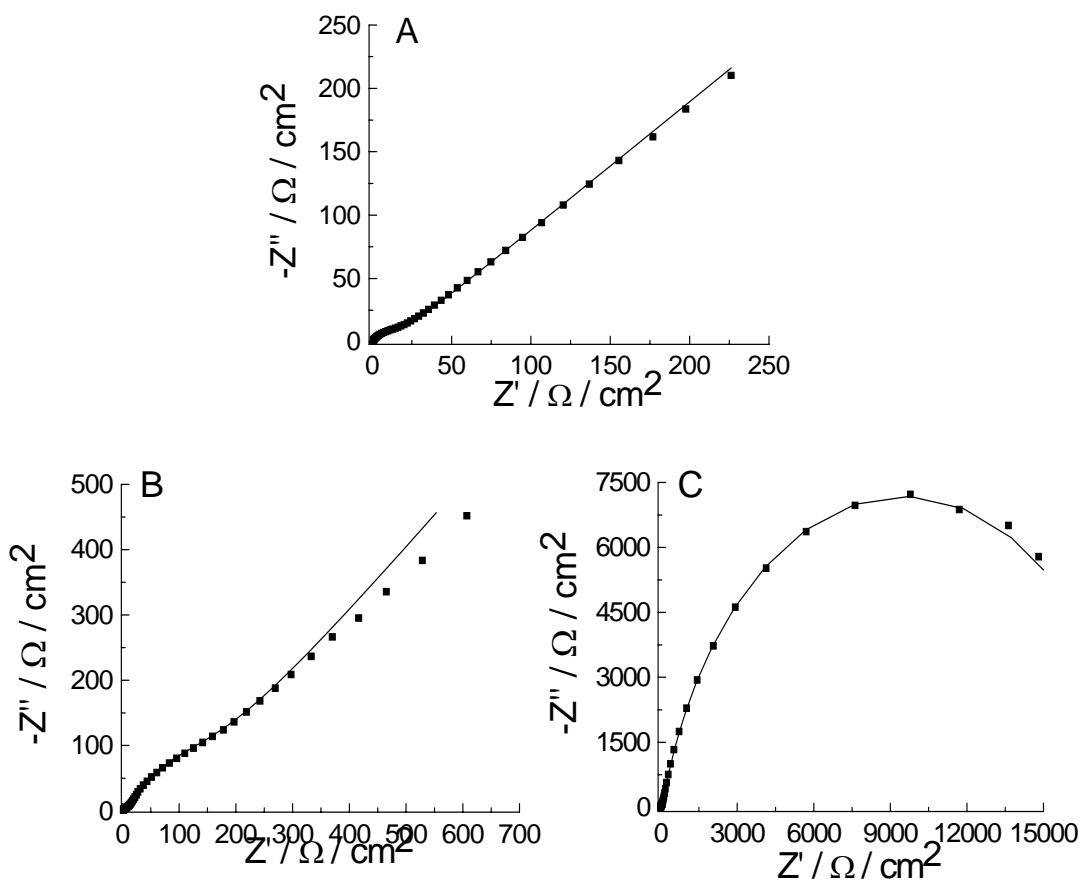


Figura 28: diagrama de Nyquist para eletrodo de grafite sem filme (A) e de eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (B) e poli(3-aminofenol) (C) em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ KCl.

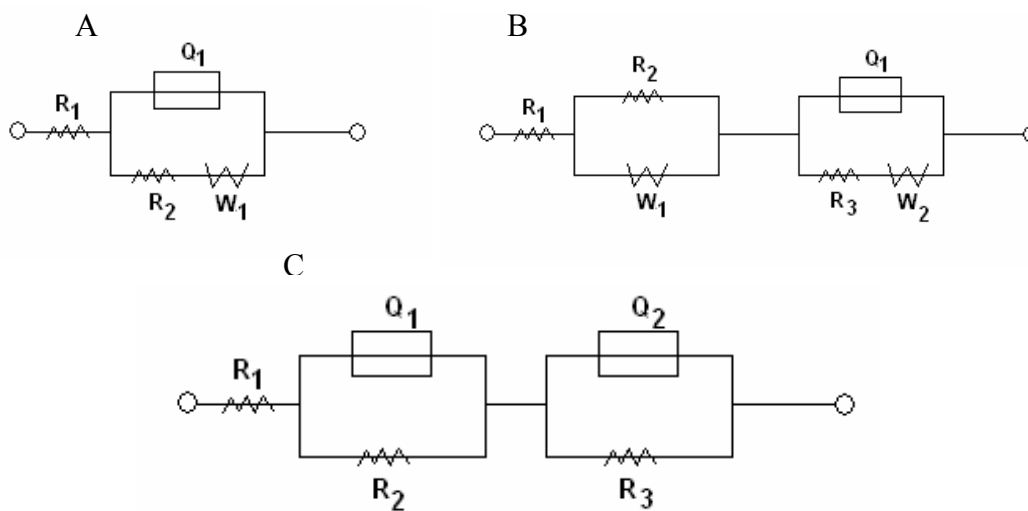


Figura 29: circuito equivalente dos sistemas.

Tabela 6: dados provenientes dos espectros de impedância da **figura 28**.

	Re(Ω)	Rtc(Ω)	Rp(Ω)
Eletrodo limpo	0,21	21,10	-
Poli(2-aminofenol)	0,38	22,31	146,1
Poli(3-aminofenol)	0,29	67,3	18900

Analisando os valores de resistência, podemos observar que, em todos os casos, obteve-se uma resistência Re. Essa Re é referente à resistência entre eletrodo e o eletrólito cujos valores são obtidos do início do primeiro semi-círculo e está presente em todos os eletrodos. Os valores de Re devem estar bem próximos um dos outros, o que permite dizer que os eletrodos e suas conexões estão em condições similares e podem ser usados como padrões para os próximos valores. O valor de resistência eletrodo/solução em relação à transferência de carga do par redox (Rtc) e os seus valores são obtidos no final do primeiro semi-círculo, subtraído do valor de Re. Observa-se que a presença de um material no eletrodo já afeta esses valores, principalmente em relação ao poli(3-aminofenol). A resistência (Rp) é medida no final do segundo semi-círculo e se refere à resistência polímero/solução, já que para o eletrodo descoberto, esta última é inexistente, pela ausência de um filme polimérico. Poli(3-aminofenol) apresenta um valor de Rp muito alto em relação ao poli(2-aminofenol) o que corrobora os resultados obtidos pela voltametria cíclica, utilizando o mesmo par redox (ver **figura 26**). Poli(2-aminofenol) apresenta um semi-círculo em região de alta frequência, seguido por uma linha com um ângulo de 43° (referente à transferência de massa) em baixa frequência, o que não é observado para o poli(3-aminofenol).

5.3) Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

Uma medida quantitativa das modificações na superfície dos eletrodos foi realizada eletroquimicamente utilizando um cristal de quartzo ressonante para medir as variações de frequência com o potencial aplicado. Desse modo, utilizando a equação [1], pôde-se criar um gráfico de potencial contra a massa depositada no eletrodo. Foram realizadas 10 varreduras sucessivas de potencial. Os gráficos obtidos podem ser observados na **figura 30**. Os eletrodos foram limpos com uma solução diluída de ácido sulfúrico e, para evitar a utilização de sais de perclorato e aumentar a força iônica, utilizamos o

mesmo ácido de limpeza para o estudo de eletropolimerização com uma concentração de $0,2\text{mol.L}^{-1}$. Esta concentração é menor do que a utilizada nos outros estudos para não promover o surgimento de cromo na superfície do ouro. Isso porque os cristais de quartzo utilizados utilizam esse metal para promover a aderência do ouro com o quartzo. A frequência fundamental foi de $7,987101\text{MHz}$ para os experimentos com o 2-aminofenol e $7,987100\text{MHz}$ para os com o 3-aminofenol.

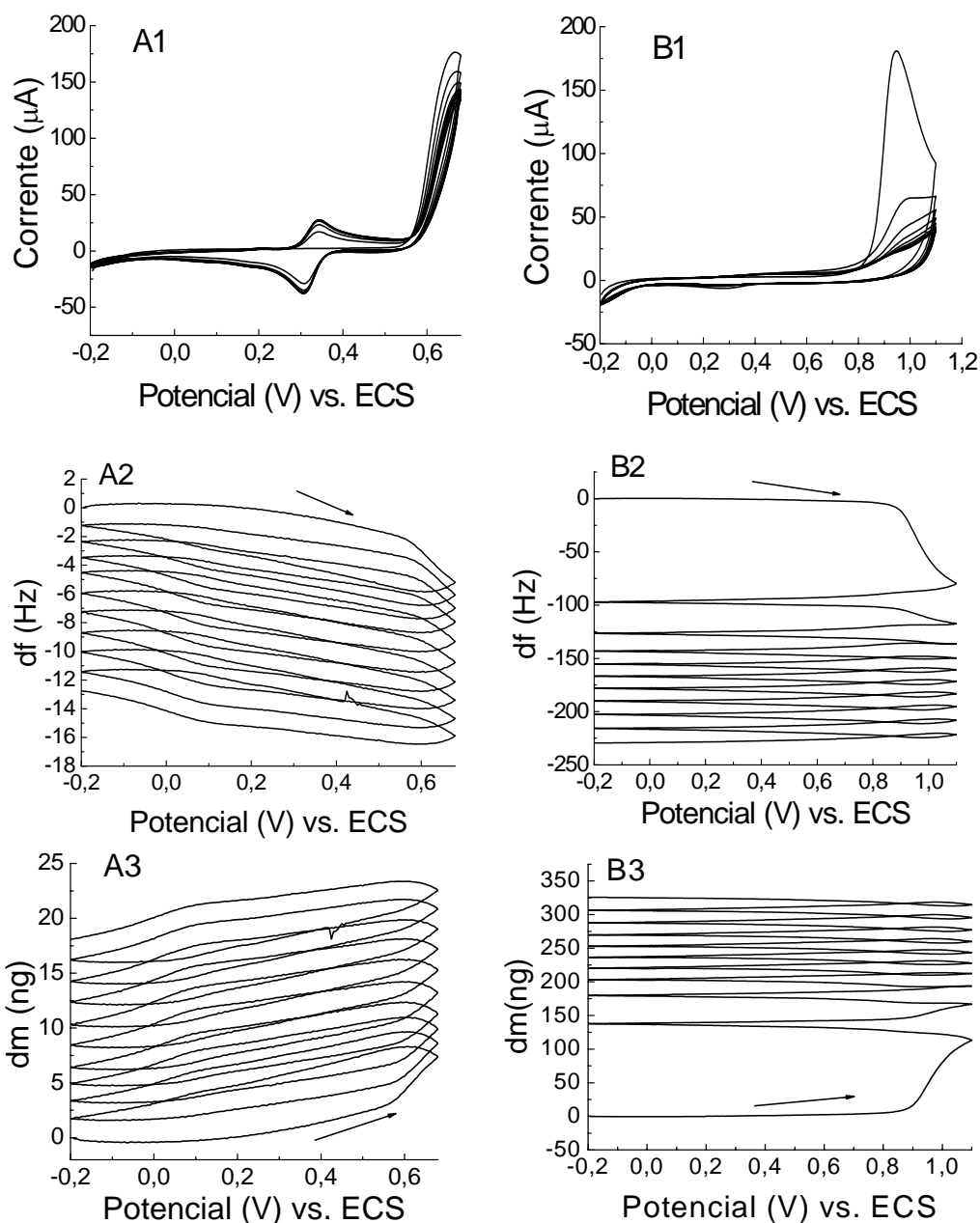


Figura 30: voltamogramas cíclicos; perfil freqüência/potencial; perfil massa/potencial; obtidos durante eletropolimerização em solução contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ (A) 2-aminofenol e (B) 3-aminofenol em meio de $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 , $v = 50\text{mV.s}^{-1}$.

Após sucessivos ciclos, observou-se, que há o mesmo processo eletroquímico de formação do filme polimérico ocorrido nos eletrodos de grafite, com valores de corrente menores devido à diminuição da concentração do eletrólito suporte. Os gráficos complementares mostram a diminuição de frequência com o aumento de potencial e o aumento da deposição de massa no eletrodo.

No primeiro voltamograma já se observa a diferença entre os dois monômeros estudados. Enquanto que, com o 2-aminofenol a frequência cai de 0 para 1,224 Hz (**A2**), com o 3-aminofenol cai de 0 para 97,040 Hz (**B2**). Isso significa um aumento de massa total de 1,73 ng para o 2-aminofenol (**A3**) e de 137,00 ng para o 3-aminofenol (**B3**), um valor maior do que o obtido na décima varredura para o 2-aminofenol (18,00 ng). Em ambos os casos, o decréscimo dos valores de frequência ocorre no início da formação dos cátions-radicaís, indicando o quanto esses são instáveis, promovendo um processo de eletropolimerização muito rápido na superfície do eletrodo. Pequenos desvios nos gráficos de frequência e massa ocorrem no potencial de surgimento do par redox do poli(2-aminofenol), como também pode ser visto pelo **gráfico A1**, onde o processo de formação do polímero ainda é inicial. No caso do poli(3-aminofenol) é de conhecimento que os valores de corrente são pouco alterados no par redox (**B1**), e pouca variação foi observada. Devemos levar em consideração que estamos trabalhando em um sistema líquido onde o solvente, no caso a água e os contra íons podem estar sendo adsorvidos juntamente com a polimerização no eletrodo, fazendo com que o valor de massa obtido não seja o valor real, mas um valor aparente.

5.4) Estudos de formação de filmes em diferentes valores de pH

Um novo estudo foi realizado alterando-se o pH do meio reacional para valores de pH mais básicos utilizando-se uma solução diluída de hidróxido de sódio. Os primeiros voltamogramas cíclicos em cada pH analisado pode ser visto na **figura 31**, abaixo:

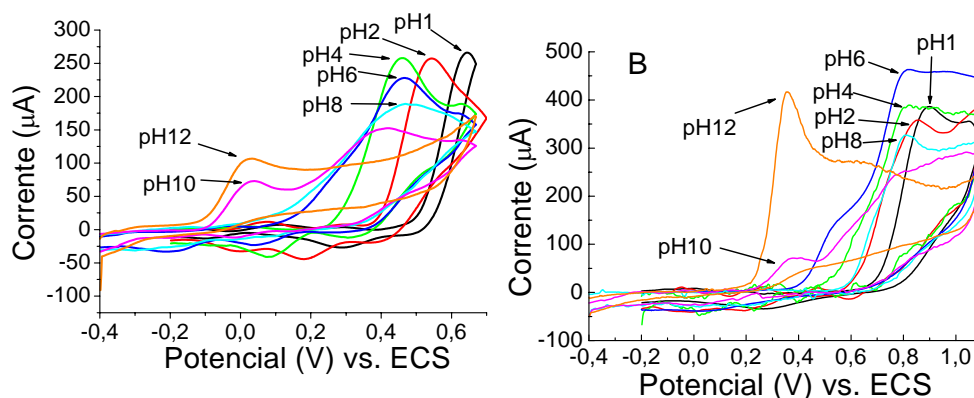


Figura 31: primeiros voltamogramas cíclicos em eletrodos de grafite obtidos da eletropolimerização em solução contendo $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de 2-aminofenol (A) e 3-aminofenol (B) em meio de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de HClO_4 em diferentes valores de pHs, sobre eletrodos de carbono grafite, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

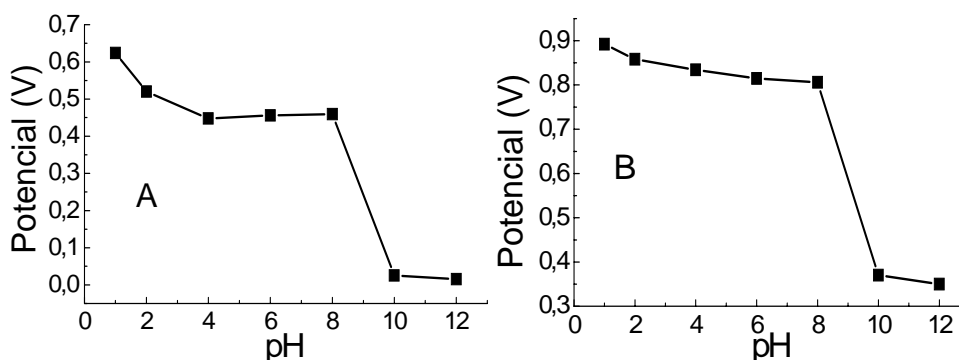


Figura 32: dependência do potencial com o valor de pH para poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).

À medida que o pH aumenta ocorre um deslocamento no potencial de oxidação do monômero para potenciais mais catódicos e uma diminuição nos valores de corrente. Essa facilidade de eletrooxidação do monômero se deve ao fato deste estar cada vez menos protonado, deixando os pares de elétrons mais disponíveis para a reação. O decréscimo acentuado entre o pH 8 e 10 (+0,46 e +0,03 V) (ver **figura 32A**) e (+0,89 e +0,36V) (ver **figura 32B**) pode ser atribuído ao equilíbrio fenol/fenóxido. Os valores do pKa dos monômeros em relação ao grupo $-\text{OH}$: 9,83 para o 3-aminofenol e 10,35 para o 2-aminofenol [168]. Na forma de fenóxido a oxidação ocorre mais facilmente devido a um aumento na nuvem eletrônica pela presença de um átomo de oxigênio carregado negativamente, aumentando o efeito de ressonância no anel aromático. Os mesmos estudos com 100 varreduras sucessivas de potencial e medidas em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foram realizados, como podem ser vistos na **figura 33**:

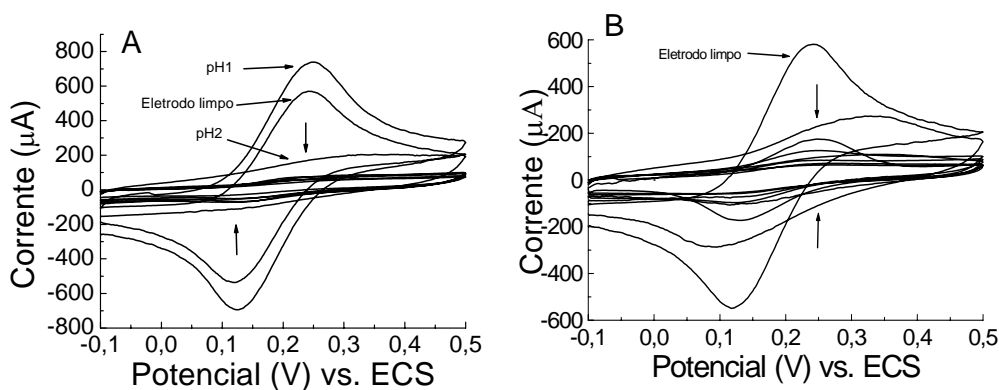


Figura 33: voltamogramas cíclicos em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B), após 100 varreduras sucessivas de potencial em diferentes valores de pH, 100 mV.s^{-1} .

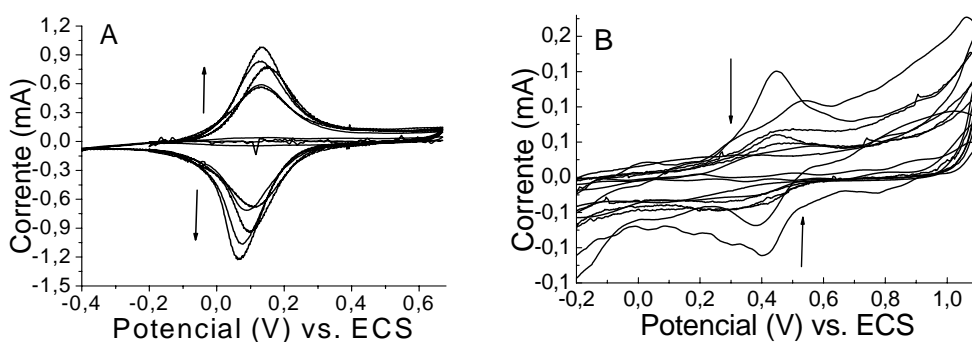


Figura 34: voltamogramas cíclicos em $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de solução de HClO_4 , de eletrodos de carbono grafite e eletrodos modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B), após 100 varreduras sucessivas de potencial em diferentes valores de pH, $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$.

Embora os filmes fossem formados em diferentes valores de pH, o caráter não-condutor e os valores de potencial redox no poli(3-aminofenol) não foram alterados em solução do eletrólito suporte. Já para o poli(2-aminofenol), a partir do $\text{pH} > 1$ (**figura 34A**), ocorre um bloqueio no eletrodo para a transferência eletrônica. Mesmo assim, um filme com mesma resposta redox na solução contendo o eletrólito suporte e com valores crescentes de corrente foi observado com o aumento de pH. O problema com os estudos em pHs mais básicos é o surgimento de ondas durante o processo de eletropolimerização. A presença de um grupo fenóxido, altamente reativo, pode propiciar reações secundárias e paralelas com uma formação de um filme de difícil caracterização.

5.5) Microscopias eletrônicas de varredura

A morfologia dos eletrodos modificados foi investigada por MEV.

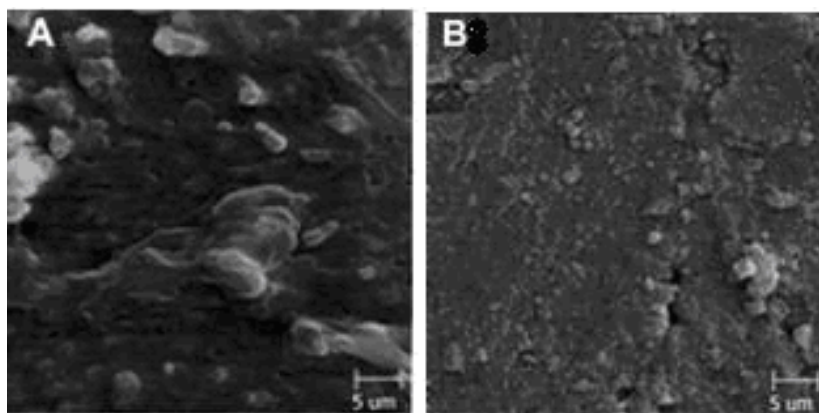


Figura 35: Microscopias eletrônicas de varredura de eletrodos modificados poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).

Na **figura 35** pode-se analisar a morfologia de estruturas poliméricas globulares distribuídas aleatoriamente na superfície do grafite. O número de estruturas globulares e a rugosidade dependem fortemente do monômero originando a matriz polimérica. No caso do poli(3-aminofenol) o recobrimento não é capaz de preencher totalmente as cavidades do grafite sugerindo a formação de uma camada polimérica que apresenta um crescimento auto-limitado. Isto é consistente com o comportamento voltamétrico mostrado na **figura 26**.

5.6) Microscopia de força atômica

Medidas realizadas por microscopia de força atômica (MFA) foram realizadas para se verificar a espessura das camadas poliméricas no eletrodo de grafite.

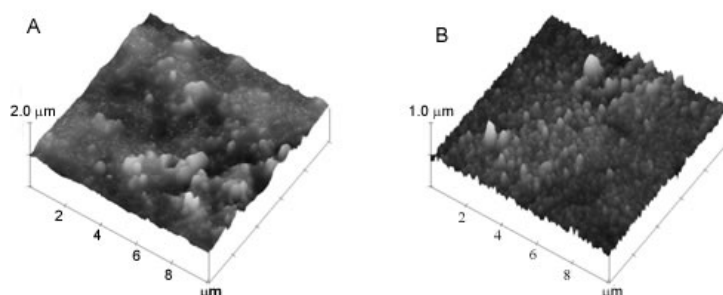


Figura 36: microscopias de força atômica de eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B).

As imagens de MFA revelam morfologias de superfície similares, entretanto, o poli(2-aminofenol) apresenta uma morfologia mais rugosa devido aos glóbulos de maior diâmetro. Os valores de rugosidade para poli(2-aminofenol) e poli(3-aminofenol) são de 649 nm e 518 nm, respectivamente. A maior rugosidade observada para o poli(2-aminofenol) está de acordo com o aumento de corrente do eletrodo modificado na presença do par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$.

A espessura do filme polimérico foi medida por MFA seguindo o procedimento proposto por Lobo *et al*, 1999 [169]. A espessura do filme foi de cerca de 2200 nm e 180 nm para poli(2-aminofenol) e poli(3-aminofenol), respectivamente. A menor espessura do poli(3-aminofenol) suporta a observação da formação de um filme polimérico de menor condução na superfície do eletrodo. Este resultado está de acordo com o decréscimo dos valores de corrente do eletrodo modificado observado em solução contendo o par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$.

5.7) FTIR (espectroscopia do infravermelho: transformada de Fourier)

A caracterização desses filmes poliméricos foi realizada utilizando espectroscopia do infravermelho. Um eletrodo de FTO foi utilizado para se realizar a eletropolimerização. Filmes derivados de 2-aminofenol e 3-aminofenol foram formados com 100 varreduras sucessivas de potencial em pH ácido. O eletrodo foi removido da solução e o filme formado foi removido com o jato de água de uma pisseta. O filme foi recolhido em um becker, lavado e seco à vácuo por uma semana. Os espectros obtidos com o monômero e seu respectivo filme podem ser vistos na **figura 37**:

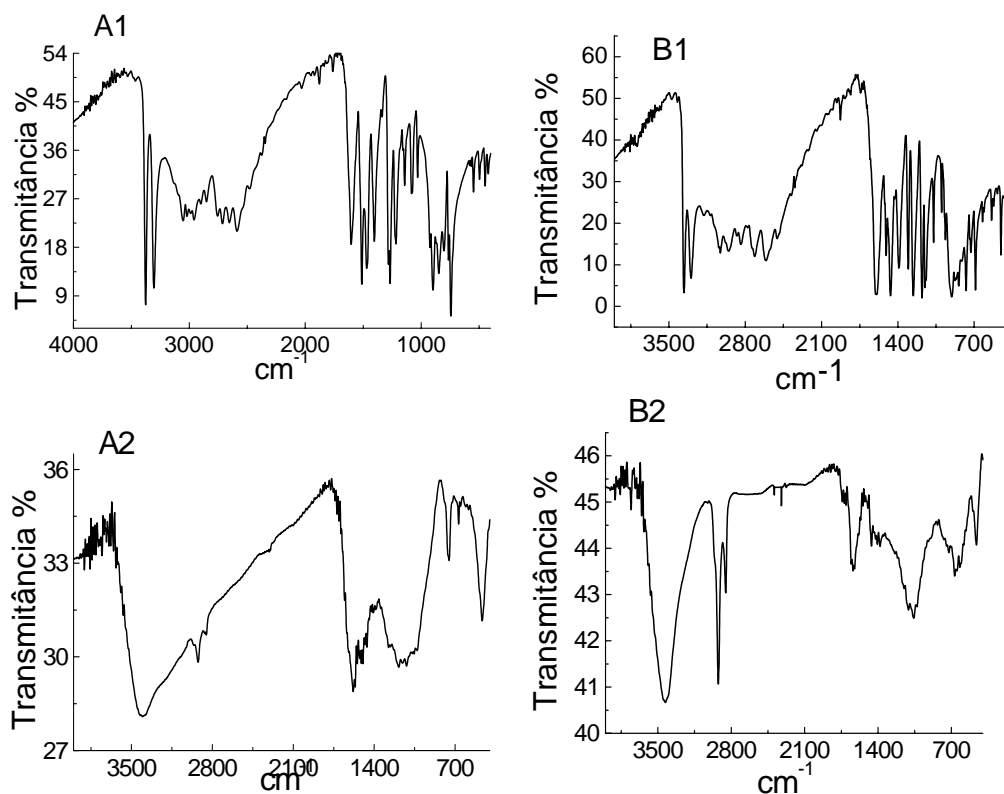


Figura 37: FTIR de 2-aminofenol (A1), 3-aminofenol (B1), poli(2-aminofenol) (A2) e poli(3-aminofenol) (B2).

Podem-se observar uma semelhança em ambos, os monômeros e os polímeros formados. Na **figura 37 (A1)**, as bandas em 3376 cm^{-1} e 3305 cm^{-1} e na **figura 37 (B1)**, as bandas em 3364 cm^{-1} e 3296 cm^{-1} são referentes aos modos de distorção assimétricos ν_2 e simétricos ν_3 do N-H. A distorção tesoura fundamental do NH_2 é observada em 1600 cm^{-1} . As bandas em 1287 e 1138 cm^{-1} (A1) e as bandas 1307 e 1178 cm^{-1} (B1) são referentes à distorção de $=\text{C}-\text{O}-$ e das ligações OH, respectivamente [170]. De acordo com os valores de fase gasosa [171] para o 3-aminofenol, a banda em 3650 cm^{-1} é referente ao modo de distorção de O-H.

Nas **figura 37 (A2 e B2)**, as bandas relacionadas à distorção assimétrica ν_2 e simétrica ν_3 do N-H desaparecem e uma banda larga toma lugar em 3402 cm^{-1} (A2) e 3428 cm^{-1} (B2), referentes à distorção das ligações de hidrogênio intramoleculares de O-H [172]. As bandas em 2850 cm^{-1} (A2) e 2853 cm^{-1} (B2) ($\nu(\text{C}-\text{H})$); 750 cm^{-1} (A2) e 770 cm^{-1} (B2) ($\gamma(\text{C}-\text{H})$); 665 cm^{-1} (A2) e 668 cm^{-1} (B2) ($\Phi(\text{C}-\text{C})$); 2920 cm^{-1} (A2) e 2923 cm^{-1} ($\nu(\text{C}=\text{C})$) (B2) indicam a presença de núcleos aromáticos. As bandas referentes a amins aromáticas primárias não aparecem nos espectros dos polímeros. As bandas em $\sim 1059\text{ cm}^{-1}$ podem ser as distorções de N-H de amins aromáticas secundárias

deslocadas para valores menores no comprimento de onda devido ao aumento das forças de ligação constantes pela ressonância com o anel aromático.

Estes resultados sugerem possível polimerização via NH_2 com presença de bandas de $-\text{OH}$ livres, pela possibilidade de ligações tipo C-N-C de bandas de aminas aromáticas secundárias.

5.8) Imobilização e detecção de bases nitrogenadas do DNA e produtos de PCR

Após os estudos feitos sobre a formação e caracterização dos filmes, estes foram utilizados para a etapa seguinte, a imobilização de bases nitrogenadas do DNA. Filmes poliméricos formados em meio ácido, com 100 varreduras sucessivas de potencial foram preparados. Uma quantidade de $15\mu\text{L}$ de solução de guanina em meio aquoso básico foi imobilizada, nas superfícies dos eletrodos por meio de adsorção. Os eletrodos modificados foram secos à temperatura ambiente por um período de aproximadamente 24 horas. A detecção foi feita através de voltametria de pulso diferencial, em tampões acetato e fosfato, $0,1\text{ mol.L}^{-1}$. O mesmo procedimento foi realizado com as outras bases nitrogenadas do DNA; adenina, citosina e timina. As detecções podem ser vistas na **figuras 38 e 39**:

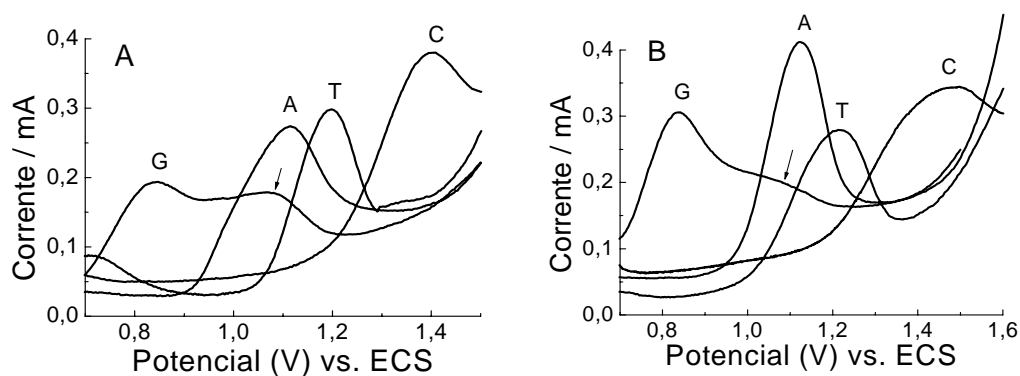


Figura 38: voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão acetato, pH 4,5, de eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B). As setas indicam formação de dímeros, $v = 5\text{ mV.s}^{-1}$.

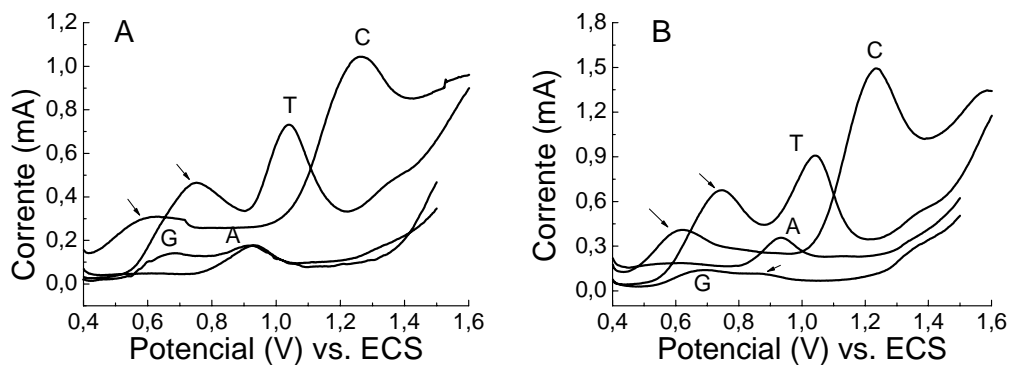


Figura 39: voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4, de eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B). As setas indicam formação de dímeros, $v = 5\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Foi possível observar que todas as bases nitrogenadas foram detectadas em ambos os tampões, isoladamente, em seus respectivos potenciais de oxidação. A oxidação da guanina apresenta a formação de um dímero, a 8-oxoguanina, comum nos experimentos. Em tampão fosfato, novas ondas puderam ser observadas nas detecções de timina e citosina. Estudos [173] sobre potenciais de ionização e propriedades de doação de elétrons comprovaram que as bases pirimidínicas são mais difíceis de serem oxidadas, sendo piores doadores de elétrons π e menos eletroativas que as bases purínicas, com a necessidade, então de trabalhar com uma concentração elevada. Os sinais apontados nas setas nas suas detecções são referentes aos seus complementares de hibridização, presentes como impurezas em solução. Desse modo, por apresentar valores de corrente maiores, com picos de oxidação mais bem definidos, sendo assim, mais sensível às detecções o tampão fosfato foi escolhido, para realizar o estudo com um *mix* das quatro bases, como pode ser visto na **figura 40**, abaixo:

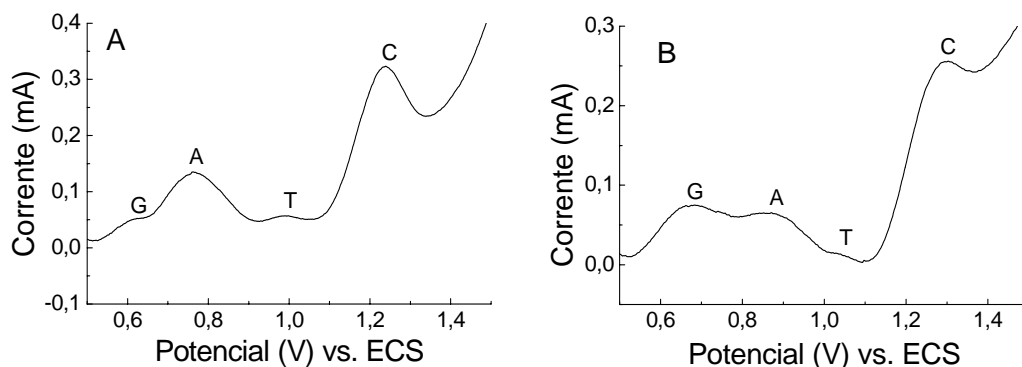


Figura 40: voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação da mistura de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4, de eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) (A) e poli(3-aminofenol) (B), $v = 5\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

A detecção das bases purínicas e pirimidínicas em uma mistura única foi possível mostrando que as interações entre elas e os filmes poliméricos ocorrem por um mecanismo similar dado os resultados obtidos. As matrizes poliméricas podem ser utilizadas, em uma etapa seguinte, para a construção dos biossensores.

Foram realizados experimentos de imobilização dos produtos de PCR, específicos para câncer de próstata, com 277 pares de base, desnaturados e hibridizados, com a utilização do ferrocenocarboxialdeído como mediador do processo de detecção. Resultados para a detecção da hibridização com o alvo complementar são mostrados na **figura 41**:

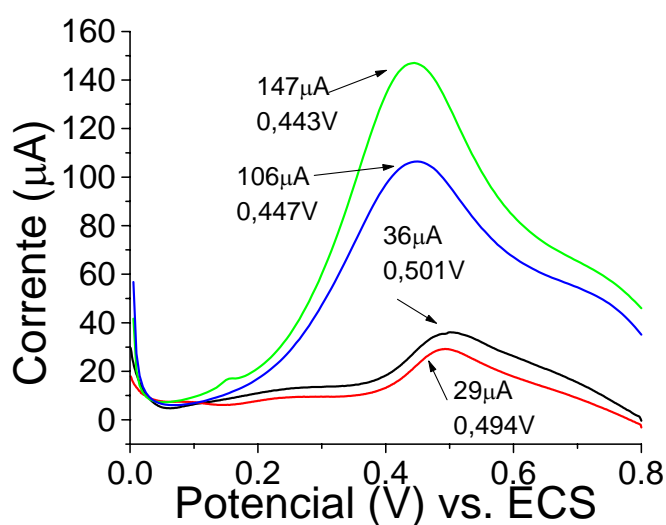


Figura 41: voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite modificado com poli(2-aminofenol) antes (—) e depois da hibridização (—); poli(3-aminofenol) antes (—) e depois da hibridização (—), em meio aquoso contendo tampão fosfato, pH = 7,4, $10\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Sonda utilizada: gene DD3.

Estes resultados mostram a detecção da oxidação do ferrocenocarboxialdeído antes e após a hibridização do produto de PCR. Pode-se observar diferenças tanto nos valores de potencial e corrente com as duas matrizes poliméricas. Comparando a mesma matriz, há apenas um pequeno desvio no potencial de pico, menor que 10mV, nas duas hibridizações. Contudo, quando comparamos os dois filmes, observamos uma grande diferença de potencial antes (+58mV) e após a hibridização (+47mV), com valores mais anódico para o poli(2-aminofenol). Isto indica que este filme apresenta maior resistência ao processo oxidativo, sendo necessário um potencial maior para promover a reação. Os valores de corrente decaem com a hibridização dos produtos de PCR. Para o poli(3-aminofenol) a queda é mais acentuada (41μA), enquanto que para o poli(2-aminofenol)

há um pequeno decréscimo ($7\mu\text{A}$). Contudo, os valores de corrente de hibridização do poli(3-aminofenol) ainda são valores maiores do que o realizado com o poli(2-aminofenol) em cerca de quatro vezes de ordem de grandeza. Essas diferenças nas detecções são devido às diferentes estruturas poliméricas utilizadas. O poli(3-aminofenol), apresenta valores de corrente mais altos, indicando uma maior quantidade de produto sendo oxidado em sua superfície. A diminuição do sinal de hibridização é reprodutível e com valores diferentes, o que permite uma leitura confiável da medida. Em comparação com o poli(2-aminofenol) o poli(3-aminofenol) é a matriz que necessita de um potencial mais catódico para promover a oxidação, facilitando o processo de detecção, além de se obter um voltamograma bem definido, mostrando um bom processo difusional no sensor.

6) Conclusões

Foi possível construir eletrodos modificados com filmes derivados de poli(2-aminofenol) e poli(3-aminofenol). Estudos de eletropolimerização utilizando-se voltametria cíclica mostraram uma grande diferença entre os dois polímeros formados. Em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Poli(2-aminofenol) contribui para um aumento na transferência eletrônica na superfície do eletrodo, e poli(3-aminofenol) reduz a transferência eletrônica.

Com o aumento da basicidade do meio, poli(3-aminofenol) não apresenta diferenças em relação à transferência eletrônica, enquanto que o poli(2-aminofenol), a partir de pH 2, assemelha-se ao poli(3-aminofenol), impedindo a reação redox do par $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$.

Poli(3-aminofenol) apresenta um recobrimento com uma menor espessura em relação ao poli(2-aminofenol), devido a ser um filme automontado e fino. Análises de AFM mostraram a formação de glóbulos de maior espessura para o poli(2-aminofenol).

Investigação de impedância mostrou que o eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) apresenta resistência à transferência de carga mais elevada em comparação com o poli(2-aminofenol).

Medidas de frequência utilizando-se microbalança de cristal de quartzo mostraram um pequeno aumento de massa durante a eletropolimerização do poli(2-aminofenol) enquanto que, logo na primeira varredura, um filme de poli(3-aminofenol) foi depositado com uma grande massa.

Espectros de infravermelho mostram a semelhança dos polímeros em relação aos grupos funcionais presentes e sugerem que a polimerização esteja ocorrendo via grupo NH_2 e não via $-\text{OH}$.

As bases purínicas e pirimidínicas foram imobilizadas nos eletrodos modificados e detectadas separadamente e em uma mistura, escolhendo o tampão fosfato como melhor eletrólito para as detecções. Eletrodos de grafite modificado com poli(3-aminofenol) foram eficientes para a imobilização das bases adenina, guanina, citosina e timina, tanto isoladas quanto simultaneamente. Os picos de oxidação das bases apresentam valores de corrente mais altos com poli(3-aminofenol) do que com poli(2-aminofenol).

As imobilizações feitas sobre o poli(3-aminofenol) mostraram melhores resultados na detecção de hibridização, com maiores valores de corrente e menores potenciais de oxidação.

7) Perspectivas futuras

Análise via ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono para se caracterizar o filme formado como também para se propor um mecanismo de eletropolimerização aceitável para esse sistema.

Melhoramento nas respostas dos biossensores construídos, estudos sobre hibridizações não-complementares para se avaliar a diferença nos resultados, otimização do processo para se obter reprodutibilidade e estudos feitos com amostras reais em sangue de pacientes infectados com o tumor.

Ainda, estudos utilizando a microbalança eletroquímica de cristal de quartzo serão realizados para se descobrir a massa molar aparente, utilizando os valores de carga e frequência, disponíveis no aparelho.

8) Referências

- [1] Instituto Nacional do Câncer: www.inca.gov.br
- [2] SROUGI, M.; Simon, S. D. **Câncer de próstata: câncer urológico**. São Paulo: Platina, 281-359, 1996.
- [3] Ravery, V.; Schimid, H. P.; Toubanc, M.; Boccon-Gibod, L. **Is the percentage of cancer in biopsy cores predictive of extracapsular disease in T1-T2 prostata carcinoma?** *Cancer*. 78, 1079-1084, 1996.
- [4] Hering, F. L. O.; Srougi, M. **Adenocarcinoma da próstata: correlação entre o valor sérico do PSA pré-operatório, doença extraprotástica e progressão do tumor**. São Paulo: Platina, 1995.
- [5] Rose, D. P.; Boyar, A. P.; Winder, E. L. **International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption**. *Cancer*. 58(11), 2363-2371, 1986.
- [6] Smith, J.R.; Freije, D.; Carpten, J.D.; Groenberg, H.; Xu, J.; Isaacs, S.D.; Brownstein, M.J.; Bova, G.S.; Guo, H.; Bujnovszky, P.; Nusskern, D.R.; Damber, J.E.; Bergh, A.; Emanuelsson, M.; Kallioniemi, O.P.; Daniels, J.W.; Wilson, J.E.B.; Beaty, T.H.; Meyers, D.A.; Walsh, P.C.; Collins, F.S.; Trent, J.M.; Isaacs, W.B. **Major Susceptibility Locus for Prostate Cancer on Chromosome 1 Suggested by a Genome-Wide Search**. *Science*. 22, 1371-1374, 1996.
- [7] The American Joint Committee on Cancer : <http://www.cancerstaging.org/>
- [8] Lefort, A.; Almeida, J.C. **Câncer de próstata: A importância das campanhas de prevenção**. Monografia apresentada ao Centro Interdisciplinar de Assistência e Pesquisa em Envelhecimento, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2004.

[9] Calvete, A. C.; Srougi, M.; Nesrallah, L. J. **Avaliação da extensão da neoplasia em câncer da próstata: valor do PSA, da porcentagem de fragmentos positivos e da escala de Gleason.** *Rev. Assoc. med. Bras.* 49(3), 250-254, 2003.

[10] **The American Urological Association Prostate Cancer Clinical Guidelines Panel, The Management of Localized Prostate Cancer, A patient's Guide.** *Members:* Richard G. Middleton, MD, Co-Chair, Ian M. Thompson, MD, Co-Chair, Mark S. Austenfeld, MD, Facilitator, William H. Cooner, MD, Roy J. Correa, Jr., MD, Robert P. Gibbons, MD, Harry C. Miller, Jr., MD, Joseph E. Oesterling, MD, Martin I. Resnick, MD, Stephen R. Smalley, MD, John H. Wasson, MD. *Consultants:* Claus G. Roehrborn, MD, Hanan S. Bell, PhD, Brent Blumenstein, PhD, Scott Optenberg, Dr. PH, Patrick M. Florer, Curtis Colby, Editor.

[11] Nadler, R.B.; Humphrey, P.A.; Smith D.S.; Catalona, W.J.; Ratliff, T.L. **Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate-specific antigen levels.** *J. Urol.* 154(2), 407–413, 1995.

[12] Lilja, H. **Regulation of the enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular protease inhibitors in prostate cancer.** *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55, 47–56, 1995.

[13] Kuriyama, M.; Wang, M.C.; Papsidero, L.D.; Killian, C.S.; Shimano, T.; Valenzuela, L.; Nishiura, T.; Murphy, G.P.; Chu, T.M. **Quantitation of prostate specific antigen in serum by a sensitive enzyme immunoassay.** *Cancer Res.* 40, 4658–4662, 1980.

[14] Myrtle, J.F. **Normal levels of prostate-specific antigen (PSA),** in Edited by WJ Catalona, DS Coffey, JP Karr: *Clinical aspects of prostate cancer: assessment of new diagnostic and management procedures.* New York: Elsevier, 183–189, 1989.

[15] Thompson, I.; Pauler, D.; Goodman, P.; Tangen, C.; Lucia, M.; Parnes, H.; Minasian, L.; Ford, L.; Lippman, S.; Crawford, E.; Crowley, J.; **Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or = 4.0 ng per milliliter.** *N Engl J Med.* 350(22), 2239-2246, 2004.

- [16] Roddam, A.W.; Duffy, M.J.; Hamdy, F.C.; Ward, A.M.; Patnick, J.; Price, C.P.; Rimmer, J.; Sturgeon, C.; White, P.; Allen, N.E. **Use of prostate-specific antigen (PSA) isoforms for the detection of prostate cancer in men with a PSA level of 2-10 ng/ml: systematic review and meta-analysis.** *Eur Urol.* 48(3), 386-399, 2005.
- [17] Feigenberg, S.J.; Hanlon, A.L.; Horwitz, E.M.; Uzzo, R.G.; Eisenberg, D.; Pollack, A. **A prostate specific antigen (PSA) bounce greater than 1.4 ng/mL Is clinically significant after external beam radiotherapy for prostate cancer.** *Am J Clin Oncol.* 29(5), 458-462, 2006.
- [18] Severi, G.; Hayes, V.M.; Neufing, P.; Padilla, E.J.; Tilley, W.D.; Eggleton, S.A.; Morris, H.A.; English, D.R.; Southey, M.C.; Hopper, J.L.; Sutherland, R.L.; Boyle, P.; Giles, G.G. **Variants in the prostate-specific antigen (PSA) gene and prostate cancer risk, survival, and circulating PSA.** *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 15(6), 1142-1147, 2006.
- [19] Collette, L.; Burzykowski, T.; Schroder, F.H. **Prostate-specific antigen (PSA) alone is not an appropriate surrogate marker of long-term therapeutic benefit in prostate cancer trials.** *Eur. J. Cancer.* 42(10), 1344-1350, 2006.
- [20] Constantinou, J.; Feneley, M.R. **PSA testing: an evolving relationship with prostate cancer screening.** *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 9(1), 6-13, 2006.
- [21] Fournier, G.; Valeri, A.; Mangin, P.; Cussenot, O. **Prostate cancer: Diagnosis and staging.** *Ann. Urol. (Paris).* 38(5), 207-224, 2004.
- [22] Goulart, L.R.; Meola, J.; Oliveira, J.D.D.; Neves, A.F.; Oliveira, J.R., W.P.; Saraiva, A.C.M.; Borba, S.a.; Prado, L.D. **Uso combinado das técnicas moleculares, RT-PCR multiplex semiquantitativa e nested, compostos químicos e os biomarcadores Receptor de Andrógeno (AR), Calicreína Glandular Humana 1 (KLK2) e o gene DD3 para o monitoramento do câncer de próstata e seu tratamento.** Patente depositada no INPI, PI-0303013-0, fevereiro 2003.

- [23] Goulart, L.R.; Meola, J.; Oliveira, J.D.D.; Neves, A.F.; Oliveira JR, W.P.; Borba, S.A.; Prado, L.D. **Genética molecular aplicada ao diagnóstico do câncer de próstata.** *Urologia Contemporânea*: 1-4, 2003.
- [24] Goulart, L.R.; Oliveira, J.D.D.; Neves, A.F.; Oliveira, J.R, W.P.; Saraiva, A.C.M. **Prostate cancer diagnostics, tumor staging, disease recurrence and clinical management by analyses of multiple molecular markers.** *Eur. Urol. Suppl.* 2, 156-156, 2003.
- [25] Meola, J. **Expressão gênica diferencial da Calicreína Glandular Humana 1 (KLK2) e da Calicreína 3 (PSA) em biópsias e sangue periférico de paciente com câncer de próstata.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, 90p.
- [26] Healy, D.A.; Hayes, C.J.; Leonard, P.; McKenna, L.; O’Kennedy, R. **Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection.** *TRENDS in Biotechnol.* 25(3), 125-131, 2007.
- [27] Riccardi, C.S.; Costa, P.I.; Yamanaka, H. **Amperometric immunosensor.** *Quím Nova*, 25(2), 316-320, 2002.
- [28] Ferreira, A.A.P.; Yamanaka, H. **Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios.** *Quim. Nova.* 29(1), 137-142, 2006.
- [29] De la Guardia, M. **Biochemical sensors: The state of the art.** *Mikrochim. acta.* 120, 243-255, 1995.
- [30] Wang, J. **Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review.** *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19(1), 47-53, 1999.
- [31] Tarley, C.R.T.; Sotomayor, M.D.P.T.; Kubota, L.T. **Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP ("Molecularly Imprinted Polymers") em técnicas de extração e separação.** *Quím Nova.* 28(6), 1076-1086, 2005.

- [32] Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J. **Fundamentals of Analytical Chemistry**. Saunders College Publishing. Orlando, Flórida, EUA, 1996.
- [33] Wilson, G.S in **Biosensors: Fundamentals and applications**. Turner A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S. eds. Oxford University Press, p. 165, 1987.
- [34] Trojanowicz, M.; Krawczyk, T.K. **Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films**. *Mikrochim. Acta*. 121, 167-181, 1995.
- [35] Calvoa, E.J.; Danilowiczb, C. **Amperometric Enzyme Electrodes**. *J. Braz. Chem. Soc.* 8(6), 563-574, 1997.
- [36] Marquette, C.A.; Blum, L.J. **State of the art and recent advances in immunoanalytical systems**. *Biosens Bioelectron*. 21(8), 1424-1433, 2006.
- [37] Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B.D. **Application of conducting polymers to biosensors**. *Biosens. Bioelectron*. 17(5), 345-359, 2002.
- [38] Sawata, S.; Kai, E.; Ikebukuro, K.; Iida, T.; Honda, T.; Karube, I. **Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by polymerase chain reaction**. *Biosens. Bioelectron*. 14(4), 397-404, 1999.
- [39] Millan, K.M.; Mikkelsen, S.R. **Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators**. *Anal. Chem.* 65(17), 2317-2323, 1993.
- [40] Kerman, K.; Kobayashi, M.; Tamiya, E. **Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology**. *Meas. Sci. Technol.* 15, R1-R11, 2004.
- [41] La-Scalea, M.A.; Serrano, S.H.P.; Gutz, I.G.R. **Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise**. *Quim. Nova*. 22(3), 417-424, 1999.
- [42] Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. **Electrochemical DNA sensors**. *Nat. biotechnol.* 21(10), 1192-1199, 2003.

- [43] Chiti, G.; Marrazza, G.; Mascini, M. **Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring.** *Anal. Chim. Acta.* 427(2), 155–164, 2001.
- [44] Millan, K.M.; Saraullo, A.; Mikkelsen, R.S. **Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode.** *Anal. Chem.* 66(18), 2943–2948, 1994.
- [45] Singhal, P.; Kuhr, W.G. **Ultrasensitive voltammetric detection of underivative oligonucleotides and DNA.** *Anal. Chem.* 69(23), 4828–4832, 1997.
- [46] Napier, M.E.; Thorp, H.H. **Modification of electrodes with dicarboxylate self assembled monolayers for attachment and detection of nucleic acids.** *Langmuir.* 13(23), 6342–6344, 1997.
- [47] Caruana, D.J.; Heller, A. **Enzyme-amplified amperometric detection of hybridization and of a single base pair mutation in a 18-base oligonucleotide on a 7-mm diameter microelectrode.** *J. Am. Soc.* 121(4), 769–774, 1999.
- [48] Dryhurst, G.; In **Comprehensive Treatise of Electrochemistry**; Srinivasan, S.; Chizmadzhev, Y. A.; Bockris, J. O'M.; Conway, B. E.; Yeager, E.; Eds.; Plenum Press, New York 1985; v. 10, p. 131.
- [49] Dryhurst, G.; **Adsorption of guanine and guanosine at the pyrolytic graphite electrode : Implications for the determination of guanine in the presence of guanosine.** *Anal. Chim. Acta.* 57(1), 137-149, 1971.
- [50] Dryhurst, G. **Dicarbonium Ions as Products of Electrochemical Oxidation of Biologically Important Purines at the Pyrolytic Graphite Electrode.** *J. Electrochem. Soc.* 116, 1411-1412, 1969.
- [51] Jelen, F.; Fojta, M.; Palecek, E. **Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs.** *J. Electroanal. Chem.* 427(1-2), 49–56, 1997.

- [52] Palecek, E. In **Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics**; Milazzo, G.; Ed.; Wiley, New York 1983; vol.5, p. 65.
- [53] Hart, J. P; **Electroanalysis of Biologically Important Compounds**; Ellis Horwood, London 1990, 213.
- [54] Erdem, A.; Kerman, K.; Meric, B.; Akarca, U.S.; Ozsoz, M. **Electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus.** *Electroanalysis*. 11, 586–587, 1999.
- [55] Napier, M.E.; Loomis, C.R.; Sistare, M.F.; Kim, J.; Eckhardt, A.E.; Thorp, H.H. **Probing biomolecule recognition with electron transfer: electrochemical sensors for DNA hybridization.** *Bioconjug. Chem.* 8, 906–913, 1997.
- [56] Hason, S.; Dvorak, J.; Jelen, F.; Vetterl, V. **Interaction of DNA with echinomycin at the mercury electrode surface as detected by impedance and chronopotentiometric measurements.** *Talanta*, 56(5), 905–913, 2002.
- [57] Erdem, A.; Ozsoz, M. **Interaction of the anticancer drug epirubicin with DNA.** *Anal. Chim. Acta.* 437(1), 107–114, 2001.
- [58] Ozkan, D.; Kara, P.; Kerman, K.; Meric, B.; Erdem, A.; Jelen, F.; Nielsen, P.E.; Ozsoz, M. **DNA and PNA sensing on mercury and carbon electrodes by using methylene blue as an electrochemical label.** *Bioelectrochemistry*. 58(1), 119–126, 2002.
- [59] Swaile, B.A. H.; Chambers, J. Q. **Electrochemical release of ethidium into and fluorescence detection of DNA-ethidium complexes in the diffusion layer at a carbon paste electrode.** *Anal. Biochem.* 196(2), 415-420, 1991.
- [60] Motorola Life Sciences Inc. <http://www.motorola.com/lifesciences/>
- [61] Toshiba Corporation <http://dna-chip.toshiba.co.jp/eng/>

- [62] de Lumley-Woodyear, T.; Campbell, C.N.; Freeman, E.; Freeman, A.; Georgiou, G.; Heller, A. **Rapid amperometric verification of PCR amplification of DNA** *Anal. Chem.* 71(3), 535–538, 1999.
- [63] Campbell, C.N.; Gal, D.; Cristler, N.; Banditrat, C.; Heller, A. **Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA**. *Anal. Chem.* 74(1), 158–162, 2002.
- [64] Wang, J.; Polsky, R.; Xu, D. **Silver-enhanced colloidal Au electrochemical stripping detection of DNA hybridization**. *Langmuir.* 17(19), 5739–5741, 2001.
- [65] Ozsoz, M.; Erdem, A.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Tugrul, B.; Topcuoglu, N.; Ekren, H.; Taylan, M. **Electrochemical genosensor based on colloidal Au nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes**. *Anal. Chem.* 75(9), 2181–2187, 2003.
- [66] Zhu, N.; Zhang, A.; He, P.; Fang, Y. **Cadmium sulfide nanocluster-based electrochemical stripping detection of DNA hybridization**. *Analyst.* 128(3), 260–264, 2003.
- [67] Cai, H.; Xu, Y.; Zhu, N.; He, P.; Fang, Y. **An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label**. *Analyst.* 127(6), 803–808, 2002.
- [68] Wang, J.; Xu, D.; Polsky, R. **Magnetically induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization**. *J. Am. Chem. Soc.* 124(16), 4208–4209, 2002.
- [69] Authier, L.; Grossiord, C.; Brossier, P.; Limoges, B. **Au nanoparticle-based quantitative electrochemical detection of amplified human cytomegalovirus DNA using disposable microband electrodes**. *Anal. Chem.* 73(18), 4450–4456, 2001.
- [70] Patolsky, F.; Katz, E.; Willner, I. **Amplified DNA detection by electrogenerated biochemiluminescence and by the catalysed precipitation of an insoluble product on electrodes in the presence of the doxorubicin intercalador**. *Angew. Chem. Int. Edn.* 41(18), 3398–3402, 2002.

[71] Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I. **Highly sensitive amplified electronic detection of DNA by biocatalysed precipitation of an insoluble product onto electrodes.** *Chem. Eur. J.* 9, 1137-1145, 2003.

[72] GeneOhm Sciences, Inc. <http://www.geneohm.com/>

[73] Ramanathan, K. **Application of some conducting polymers to biosensor,** Ph.D Thesis, IIT Delhi, India, 1995.

[74] Ramanathan, K.; Mehrotra, R.; Jayaram, B.; Murthy, A.S.N.; Malhotra, B.D. **Simulation of electrochemical process for glucose oxidase immobilized conducting polymer.** *Anal. Lett.* 29, 1477–1484, 1996.

[75] Ramanathan, K.; Ram, M.K.; Verghese, M.M.; Malhotra, B.D. **Dielectric spectroscopic studies on polypyrrole glucose oxidase films.** *J. Appl. Polym. Sci.* 60, 2309–2316, 1996.

[76] Gambhir, A., Gerard, M., Mulchandani, A., Malhotra, B.D. **Characterization of DNA Immobilized on Electrochemically Prepared Conducting Polypyrrole-Polyvinyl Sulfonate Films.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 96, 303–309, 2001.

[77] Chaubey, A.; Gerard, M.; Singhal, R.; Singh, V.S.; Malhotra, B.D. **Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinyl sulphonate composite films for application to lactate biosensors.** *Electrochim. Acta.* 46(5), 723– 729, 2000.

[78] Ramanathan, K.; Pandey, S.S.; Kumar, R.; Gulati, A.; Murthy, A.S.N.; Malhotra, B.D. **Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor.** *J. Appl. Polym. Sci.* 78, 662–667, 2000.

[79] Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B.D. **Application of conducting polymers to biosensors.** *Biosens. Bioelectron.* 17(5), 345-359, 2002.

- [80] Cosnier, S. **Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review.** *Biosens. Bioelectron* 14(5), 443–456, 1999.
- [81] Lewis, T.W.; Wallace, G.G.; Smyth, M.R. **Electrofunctional polymers: their role in the development of new analytical systems.** *Analyst*. 124(3), 213–219, 1999.
- [82] Kranz, C.; Wohlschlager, H.; Schmidt, H.L.; Schuhmann, W. **Controlled electrochemical preparation of amperometric biosensor based on conducting polymer multilayers.** *Electroanalysis*. 10(8), 546–552, 1998.
- [83] Santhanam, K.S.V. **Conducting polymers for biosensors: rationale based on models.** *Pure. Appl. Chem.* 70(6), 1259–1262, 1998.
- [84] Trojanowicz, M.; Vel Krawczyk, T.K.; Alexander, P.W. **Organic conductings as active materials in electrochemical chemosensors and biosensors.** *Chem. Anal.* 42, 199–213, 1997.
- [85] Adeloju, S.B.; Wallace, G.G. **Conducting polymers and the bioanalytical sciences.** *Analyst*. 121(6), 699–703, 1996.
- [86] Trojanowicz, M.; Vel Krawczyk, T.K. **Electrochemical biosensors based on enzymes immobilized in electropolymerized films.** *Mikrochim. Acta*. 121, 167–181, 1995.
- [87] Alva, S.; Phadke, R.S. **Conducting polymers in the fabrication of efficient biosensors.** *Ind. J. Chem.* 33(A), 561–564, 1994.
- [88] Contractor, A.Q.; Sureshkumar, T.N.; Narayanan, R.; Sukeerthi, S.; Lal, R.; Srinivasa, R.S. **Conducting polymers based biosensors.** *Electrochim. Acta*. 39, 1321–1324, 1994.
- [89] Bartlett, P.N.; Cooper, J.M. **A review of the immobilization of enzymes in electropolymerized films.** *J. Electroanal. Chem.* 362, 1–12, 1993.

- [90] Schuhmann, W.; Kranz, C.; Huber, J.; Wohlschlager, H. **Conducting polymer-based amperometric enzyme electrodes. Towards the development of miniaturized reagentless biosensors.** *Synth. Metals*. 61, 31–35, 1993.
- [91] Deshpande, M.V.; Amalnerkar, D.P. **Biosensors prepared from electrochemically synthesized conducting polymers.** *Prog. Polym. Sci.* 18(4), 623–649, 1993.
- [92] Boyle, A.; Genies, E.M.; Lapkowski, M. **Application of electronic conducting polymers as sensors: polyaniline in the solid state for detection of solvent vapours and polypyrrole for detection of biological ions in solutions.** *Synth. Metals*. 28(1-2), 769–774, 1989.
- [93] Bidan, G.; Ehui, B.; Lapkowski, M. **Conductive polymers with immobilized dopants: ionomer composites and auto-doped polymers - a review and recent advances.** *J. Apys. D. Appl. Phys.* 21, 1043–1054, 1988.
- [94] Saoudi, B.; Jammul, N.; Abel, M.L.; Chehimi, M.M.; Dodin, G. **DNA adsorption onto conducting polypyrrole.** *Synth. Met.* 87, 97–103, 1997.
- [95] Chehimi, M.M.; Abel, M.L.; Saoudi, B.; Delamar, M.; Jammul, N.; Watts, J.F.; Zhdan, P.A. **Adsorption of macromolecules onto conducting polymers.** *Polymery.* 41, 75–84, 1996.
- [96] Bruno, F.F.; Marx, K.A.; Tripathi, S.K.; Akkara, J.A.; Samuelson, L.A.; Kaplan, D.L. **Enzyme catalyzed polymerization of phenol and aniline derivatives on a langmuir trough to form ordered 2-D polymer films.** *J. Int. Mat. Sys. Struct.* 5, 631–634, 1994.
- [97] Yuqing, M.; Jianrong, C.; Xiaohua, W. **Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors.** *TRENDS in Biotechnol.* 22(5), 227-231, 2004.

- [98] Carelli, I.; Chiarotto, I.; Curulli, A.; Palleschi, G. **Electropolymerization of hydroxybenzene and aminobenzene isomers on platinum electrodes to assemble interference-free electrochemical biosensors.** *Electrochim. Acta.* 41(11-12), 1793–1800, 1996.
- [99] Calvoa, E.J.; Danilowicz, C. **Amperometric enzyme electrodes.** *J. Braz. Chem. Soc.* 8(6), 563–574, 1997.
- [100] Schinichi, K.; Seyama, M.; Momma, T.; Osaka, T. **Potentiometric biosensor for urea based on electropolymerized electroinactive polypyrrole.** *Electrochim. Acta.* 42, 383–388, 1997.
- [101] Osaka, T. **High-sensitivity urea sensor based on the composite film of electroinactive polypyrrole with polyion complex.** *Sens. Actuators. B. Chem.* 36(1-3), 463–469, 1996.
- [102] Yang, H.; Chung, T.D.; Kim, Y.T.; Choi, C.A.; Jun, C.H.; Kim, H.C. **Glucose sensor using a microfabricated electrode and electropolymerized bilayer films.** *Biosens. Bioelectron.* 17(3), 251–259, 2002.
- [103] Ammon, H.P.; Ege, W.; Oppermann, M.; Göpel, W.; Eisels, S. **Improvement in the long-term stability of an amperometric glucose sensor system by introducing a cellulose membrane of bacterial origin.** *Anal Chem.* 67, 466–471, 1995.
- [104] Sangodkar, H.; Sukeerthi, S.; Srinivasa, R.S.; Lal, R.; Contractor, A.Q. **A biosensor array based on polyaniline.** *Anal Chem.* 68, 779–783, 1996.
- [105] Zhang, Z.; Liu, H.; Deng, J. **A glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized oaminophenol film on platinized glassy carbon electrode.** *Anal Chem.* 68, 1632–1638, 1996.
- [106] Umana, M.; Waller, J. **Protein-modified electrodes. The glucose oxidase/polypyrrole system.** *Anal Chem.* 58, 2979–2983, 1986.

- [107] Cooper, J.C.; Schubert, F. **A biosensor for L-amino acids using polytyramine for enzyme immobilization.** *Electroanal.* 6, 957–961, 1994.
- [108] Miland, E.; Ordieres, A.J.M.; Blanco, P.T.; Smyth, M.R.; Fa'ga'in, C.O. **Poly(o-aminophenol)-modified bienzyme carbon paste electrode for the detection of uric acid.** *Talanta.* 43, 785–796, 1996.
- [109] Su, L-X.; Xu, F.; Okada, T. **New glucose sensor based on polymer modified electrodes optimized by chemometrics method.** *Chem. Sens.* 13, 45–48, 1997.
- [110] Bartlett, P.N.; Birkin, P.R. **A microelectrochemical enzyme transistor responsive to glucose.** *Anal Chem.* 66, 1552–1559, 1994.
- [111] Tatsuma, T.; Gondaira, M.; Watanabe, T. **Peroxidase-incorporated polypyrrole membrane electrodes.** *Anal Chem.* 64, 1183–1187, 1992.
- [112] Foulds, N.C.; Lowe, C.R. **Immobilization of GOD in ferrocenemodified pyrrole polymers.** *Anal Chem.* 60, 2473–2478, 1988.
- [113] Wolowacz, S.E.; Hin, B.F.Y.Y.; Lowe, C.R. **Covalent electropolymerization of glucose oxidase in polypyrrole.** *Anal Chem.* 64, 1541–1545, 1992.
- [114] Nakabayashi, Y.; Wakuda, M.; Imai, H. **Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as electron transfer mediator.** *Anal. Sci.* 14, 1069–1077, 1998.
- [115] Nakabayashi, Y.; Yoshikawa, H. **Amperometric biosensors for sensing of hydrogen peroxide based on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as a mediator.** *Anal. Sci.* 16, 609–613, 2000.
- [116] H. Shirakawa.; Louis, E.J.; MacDiarmid, A.G.; Chiang, C.K.; Heeger, A.J. **Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x.** *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 16, p.578, 1977.

- [117] Duke, C.B.; Schein, L.B. **Organic solids: is energy-based theory enough?** *Phys. Today*. 33, 42–48, 1980.
- [118] Bloor, D.; Movaghar, B. **Conducting polymers.** *IEEE Proceedings* 130, 225–232, 1983.
- [119] Scrosati, B. **Applications of electroactive Polymers.** Chapman & Hall; Londres, p.32, 1993.
- [120] Inzelt, G.; Pineri, M.; Schultze, J.W.; Vorotyntsev, M.A. **Electron and proton conducting polymers: recent developments and prospects.** *Electrochim. Acta*. 45, 2403–2421, 2000.
- [121] Harris, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 5ª. ed., Rio de Janeiro: LTC, p. 408, 418-419, 2001.
- [122] Bard, A.J.; Faulkner, L.R. **Electrochemical Methods Fundamentals and Applications.** John Wiley & Sons, Inc. USA, p.22-23, 1980.
- [123] Varela, H.; Malta, M.; Torresi, R.M. **Técnicas In Situ de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo.** *Quim. nova*. 23(5), 664-679, 2000.
- [124] Girotto, E.M.; Paoli, M-A. De. **Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: Importância, técnicas e modelos teóricos.** *Quim. nova*. 22(3), 358-368, 1999.
- [125] Sauerbrey, G.; **Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung.** *Z. Phys.* 155(2), 206-222, 1959.
- [126] Kanazawa, K.K.; Gordon, J.G. **Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid.** *Anal. Chem.* 57(8), 1770-1771, 1985.

- [127] Damos, F.S.; Mendes, R.K.; Kubota, L.T. **Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores.** *Quim. Nova.* 27(6), 970-979, 2004.
- [128] Bull, R. A.; Fan, F. R. F.; Bard, A. J.; **Polymer Films on Electrodes.** *J. Electrochem. Soc.* 129, p.1009, 1982.
- [129] Hall, E. A. H.; Skinner N. G.; **The relevance of an equivalent circuit for polyaniline using immittance spectroscopy.** *Synth. Met.* 63(2), 133-145, 1994.
- [130] Armstrong, R. D.; Hamnett, A.; Christensen, P.; Read, D. C.; Johnson, B. W.; **Impedance characteristics of conducting polythiophene films.** *J. Electroanal. Chem.* 364(1-2), 103-109, 1994.
- [131] Geniés, E.M.;Boyle, A.; Lapkowski, M.; Tsintavis, C. **Polyaniline: a historical survey.** *Synth. Met.* 36, 139 – 182, 1990.
- [132] Lapuente, R.; Cases, F.; Garces, P.; Morallon, P.; Vazquez, J.L. **A voltammetric and FTIR–ATR study of the electropolymerization of phenol on platinum electrodes in carbonate medium: Influence of sulfide.** *J. Electroanal. Chem.* 451(1-2), 163-171, 1998.
- [133] Lofrano, R.C.Z.; Madurro, J.M.; Abrantes, L.M.; Romero, J.R. **Electrocatalytic hydrogenation of carbonylic compounds using an electrode with platinum particles dispersed in films of poly-[allyl ether p-(2-aminoethyl) phenol] co-polymerized with allyl phenyl ether.** *J. Mol. Catalysis. A:Chem.* 218, 73-79, 2004.
- [134] Lofrano, R.C.Z.; Queiroz, J.V.; Romero, J.R. **Preparation and properties of na electrode with platinum microcrystals dispersed in films of poly(allyl ether p-benzeneammonium derivatives).** *J. Mol. Catalys. A:Chemical.* 174(1-2), 231-238, 2001.

- [135] Lofrano, R.C.Z.; Madurro, J.M.; Romero, J.R. **Preparation and properties of an electrode coated with a cerium poly(allyl ether p-benzenesulfonate) film for electroorganic reactions.** *J. Mol. Catalys. A:Chemical.* 153, 237-242 2000.
- [136] Salavagione, H.J.; Arias, J.; Garces, P.; Morallon, E.; Barbero, C.; Vazquez, J.L. **Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium.** *J. Electroanal. Chem.* 565, 375–383, 2004.
- [137] Franco, D.L.; Naoum, D.N.; Castro, C.M.; Braghiroli, R.; Gonçalves, R.A.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. **Preparação de Eletrodos Modificados com Filmes Poliméricos a Partir de P-Anisidina.** *Horizonte Científico.* Edição nº5, Vol. 2, 2005.
- [138] Franco, D.L.; Gonçalves, R.A.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. **Sensores eletroquímicos para detecção da base nitrogenada do DNA guanosina trifosfato.** *Horizonte Científico.* Edição nº6, Vol.1, 2006.
- [139] Castro, C.M.; Vieira, S.N.; Gonçalves, R.A.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. **Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine.** *J. Mat. Sci.* 2007 (in press).
- [140] Vieira, S.N.; Ferreira, L.F.; Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Gonçalves, R.A.; Madurro, A.G.B.; Madurro, J.M. **Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol).** *Macromol. Symp.* 245-246(1), 236-242, 2006.
- [141] Madurro, A.G.B.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Gonçalves, R.A.; Filho, L.R.G.; Madurro, J.M. **Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix.** *J. Mater. Sci.* 42(9), 3238-3243, 2007.
- [142] Taj, S.; Ahmed, M.F.; Sankarapavinasam, S. **Electro-oxidative polymerization of m-aminophenol.** *Synth. Met.* 52, 147-158, 1992.
- [143] Sankarapavinasam, S. **Kinetics and mechanism of electropolymerization of m-aminophenol.** *J. Pol. Sci: Part A: Pol. Chem.* 31, 1105-1109, 1993.

- [144] Zhang, J.; Shan, D.; Mu, S. **Electrochemical copolymerization of aniline with *m*-aminophenol and novel electrical properties of the copolymer in the wide pH range.** *Electrochim. Acta.* 51, 4262–4270, 2006.
- [145] Ying-Sing, F.; Shi-Hui, Si.; De-Rong, Z. **Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-*m*-aminophenol film.** *Talanta.* 51, 151–158, 2000.
- [146] Barbero, C.; Zerbino, J.; Sereno, L.; Posadas, D. **Optical properties of electropolymerized orthoaminophenol.** *Electrochim. Acta.* 32(4), 693-697, 1987.
- [147] Kunimura, S.; Ohsaka, T.; Oyama, N. **Preparation of thin polymeric films on electrode surfaces by electropolymerization of o-aminophenol.** *Macromol.* 21, 894-900, 1988.
- [148] Barbero, C.; Silber, J.J.; Sereno, L. **Formation of a novel electroactive film by electropolymerization of ortho-aminophenol. Study of its chemical structure and formation mechanism. Electropolymerization of analogous compounds.** *J. Electroanal. Chem.* 263, 333-352, 1989.
- [149] Barbero, C.; Silber, J.J.; Sereno, L. **Electrochemical properties of poly-ortho-aminophenol modified electrodes in aqueous acid solutions.** *J. Electroanal. Chem.* 291, 81-101, 1990.
- [150] Jackowska, K.; Bukowska, J.; Kudelski, A. **Electro-oxidation of o-aminophenol studied by cyclic voltammetry and surface enhanced Raman scattering (SERS).** *J. Electroanal. Chem.* 350, 177—187, 1993.
- [151] Posadas, D.; Tucceri, R.I.; Barbero, C.; Silber, J.J.; Sereno, L. **Spectroelectrochemical study of poly-o-aminophenol.** *Electrochim. Acta.* 42(6), 919-927, 1997.
- [152] Ortega, J.M. **Conducting potential range for poly-o-aminophenol.** *Thin Solid Films.* 371, 28-35, 2000.

- [153] Gonçalves, D.; Faria, R.C.; Yonashiro, B.; Bulhões, L.O.S. **Electrochemical oxidation of *o*-aminophenol in aqueous acidic medium: formation of film and soluble products.** *J. Electroanal. Chem.* 487, 90–99, 2000.
- [154] Tucceri, R.I. **Surface resistance measurements on thin gold film electrodes coated with poly(*o*-aminophenol) films.** *J. Electroanal. Chem.* 505, 72–84, 2001.
- [155] Mu, S. **Electrochemical copolymerization of aniline and *o*-aminophenol.** *Synth. Met.* 143, 259–268, 2004.
- [156] Tucceri, R.I. **The change of the electron scattering at the gold film–poly(*o*-aminophenol) film interface after partial degradation of the polymer film: its relation with the electron transport process within the polymer film.** *J. Electroanal. Chem.* 562, 173–186, 2004.
- [157] Pan, D.; Chen, J.; Yao, S.; Nie, L.; Xia, J.; Tao, W. **Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized *o*-aminophenol film at copper-modified gold electrode.** *Sens. Actuators. B. Chem.* 104, 68–74, 2005.
- [158] Tao, W.; Liu, Y.; Pan, D.; Nie, L.; Yao, S. **Study on the enhancement of catalytic activity for hemoglobin by quinhydrone in poly(*o*-aminophenol) film.** *Bioelectrochem.* 65, 51–58, 2004.
- [159] Guenboura, A.; Kacemia, A.; Benbachira, A.; Áries, L. **Electropolymerization of 2-aminophenol electrochemical and spectroscopic studies.** *Prog. Org. Coat.* 38, 121–126, 2000.
- [160] Palecek, E. **From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acid-modified electrodes.** *Electroanalysis.* 8(1), 7–14, 1996.
- [161] Hashimoto, K.; Ito, K.; Ishimori, Y. **Sequence-Specific Gene Detection with a Gold Electrode Modified with DNA Probes and an Electrochemically Active Dye.** *Anal. Chem.* 66(21), 3830–3833, 1994.

- [162] 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.** *Anal. Chim. Acta.* 273(1), 175-186, 1993.
- [163] Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Palecek, E.; Nielsen, P.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D.; Parrado, C.; Chicharro, M.; Farias, P. A. M.; Valera, F. S.; Grant, D. H.; Ozsos, M.; Flair, M.N. **DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review.** *Anal. Chim. Acta.* 347(1-2), 1-8, 1997.
- [164] Pang, D.-W.; Zhang, M.; Wang, Z.-L.; Qi, Y.-P.; Cheng, J.-K.; Liu, Z.-Y. **Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA.** *J. Electroanal. Chem.* 403(1-2), 183-188, 1996.
- [165] Brabec, V. **Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes.** *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8(4), 437-449, 1981.
- [166] Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** (2nd ed.). Vol 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [167] www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
- [168] J.A. Dean in **Handbook of Organic Chemistry.** McGraw-Hill, New York, USA, 1987.
- [169] Lobo, R.F.M.; Pereira-da-Silva, M.A.; Raposos, M.; Faria, R.M.; Oliveira Jr, O.N. **In situ thickness measurements of ultra-thin multilayer polymer films by atomic force microscopy.** *Nanotechnology.* 10, 389-393, 1999.
- [170] Buyukmurat, Y.; Akyuz, S. **Infrared and Raman spectra, ab initio calculations, force field refinement and vibrational assignment of 3-aminophenol.** *J. Mol. Struct.* 744-747, 2005.
- [171] NIST Chemistry WebBook, IR database, <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

[172] R.M. Silverstein; F.X. Webster in **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 6th Ed.; New York, USA,

[173] Berthod, H.; Giessner-Pretre, C.; Pullman, A. **Theoretical study of the electronic properties of the purine and pyrimidine components of the nucleic acids.** *Theoret. Chim. Acta.* 5, 53-68, 1966.