

Programa de Pós-Graduação em Química – Doutorado

Instituto de Química - UFU

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utilizando matriz polimérica modificada com biomoléculas, para o diagnóstico de câncer de próstata e hepatite C

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Química

Doutorando: Msc. Diego Leoni Franco

Orientador: Prof. João Marcos Madurro

Co-orientadora: Profa. Ana Graci Brito-Madurro

Uberlândia



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química
E-mail: cpqquimica@ufu.br - Fone: (34) 3239-4385

ALUNO: DIEGO LEONI FRANCO

NÚMERO DE MATRÍCULA: 90478

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL DOUTORADO

TÍTULO DA TESE:

***“Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos
utilizando-se matriz polimérica com biomoléculas para o
diagnóstico de doenças infecciosas”***

ORIENTADOR:

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO

A Tese foi **APROVADA** em apresentação pública realizada na sala 205 do Bloco 3D, no Campus Santa Mônica, no dia 6 de dezembro de 2010, às 13:30 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

PROF. DR. JOÃO MARCOS MADURRO
(Instituto de Química / UFU)

PROFª. DRA. SONIA REGINA BIAGGIO
(Universidade Federal de São Carlos)

PROFª DRA. MARIA DEL PILAR TABOADA SOTOMAYOR
(Universidade Estadual de São Paulo / Araraquara)

PROF. DR. RODRIGO ALEJANDRO ABARZA MUÑOZ
(IQUFU)

PROF. DR. NILSON PENHA SILVA
(INGEB / UFU)

Uberlândia, 6 de dezembro de 2010.

*“Todo grande avanço da ciência
resultou de uma nova audácia da imaginação”*
John Dewey

Agradecimentos

Nesse momento mais do que especial em minha vida profissional, venho simplesmente agradecer. Agradecer a Deus, a quem devo todo o meu esforço, pois me deu força, a quem devo minhas conquistas, pois me deu capacidade, a quem devo minha vida, abençoada de realizações.

Agradeço à minha família, presente em todos os meus momentos, sejam bons ou ruins, sempre me apoiando e me amando. Ao meu pai, minha mãe, meu irmão, minha avó, todos, agradeço de coração pelas lições de vida, pelo amor e pelos exemplos que me passaram e me passam até hoje.

Agradeço a Angelita, minha namorada, meu amor. Apesar do pouco tempo em que nós nos conhecemos, é um tempo válido por toda uma vida. Tanto ela como sua família, sua mãe e irmãos me acolheram como um membro em sua casa. Agradeço por ter surgido em minha vida, por tê-la tornado mais simples, mais forte e mais feliz.

Agradeço aos amigos de sempre, Alexandre e Rafaela, aos novos amigos, Ana Paula, Thaís, Rosângela, Talita, Danilo, Osvaldo, Marcilene, Dani, Dani Saiago, Fabíola, Fátima, José Carlos, Marcos, minha linda e querida afilhada Victória, por todos os momentos de amizade proporcionados, há muito ou há pouco, obrigado. Aos amigos de vida, Tuk, Rick, Vitor, Cesa, Neno, Tatá, Guilherme e toda a família Negretto por existirem. Admiro a todos e agradeço.

Aos meus colegas de profissão, Lucas Franco, Walans Torres, Douglas Queiroz, Rodrigo Teodoro, Sabrina Nunes, Cláudio Márcio, aos meus colegas de laboratório, Lucas, Erick, Heden, Luciano, Miquéias, Deusmaque, Ana Consuelo, Ana Cristina, Lara, Pâmela, Leandro (17), Leandra, Camila, Carla, Daniel, a todos e cada um que eu possa ter me esquecido de mencionar.

Agradeço aos membros da banca de qualificação e de defesa, professores Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, Nilson Penha Silva, Sebastião de Paula Eiras, Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, Sonia Regina Biaggio, pela presença, paciência, compreensão e pelas excelentes discussões e sugestões. Tenho certeza que foram essenciais para minha formação profissional e agradeço de todo o coração.

Agradeço ao professor João Marcos Madurro e a professora Ana Graci Brito-Madurro pela presença no meu desenvolvimento profissional desde o início e até então, por toda a paciência, compreensão, ensinamentos e suporte para me tornar quem sou profissionalmente e pessoalmente.

Agradeço a todos, do fundo do meu coração.

Índice

<i>Índice de tabelas</i>	xi
<i>Lista de abreviaturas e siglas</i>	xii
<i>Materiais</i>	xiv
<i>Resumo</i>	xv
<i>Abstract</i>	xvi
<i>1. Introdução</i>	1
<i>1.1. Hepatite C</i>	1
<i>1.2. Câncer de próstata</i>	5
<i>1.3. Diagnóstico</i>	10
<i>1.3.1. Hepatite C</i>	10
<i>1.3.2. Câncer de próstata</i>	12
<i>1.4. Biossensores</i>	13
<i>1.4.1. Transdutores</i>	14
<i>A. Transdutores piezoelétricos</i>	14
<i>B. Transdutores ópticos</i>	15
<i>C. Transdutores térmicos</i>	17
<i>D. Transdutores eletroquímicos</i>	19
<i>a. Voltametria</i>	20
<i>b. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	23
<i>1.4.2. Camada de reconhecimento</i>	24
<i>A. Enzimas</i>	25
<i>B. Antígenos e anticorpos</i>	27
<i>C. DNA</i>	30
<i>1.4.3. Imobilização da camada de reconhecimento sobre o transdutor</i>	35
<i>1.5. Polímeros condutores aplicados em biossensores</i>	36
<i>1.5.1. 3-aminofenol</i>	40
<i>1.6. Estudo da interação de DNA de Calf Thymus e Brometo de Etídio</i>	42
<i>1.6.1. Espectroscopia de absorção e de fluorescência</i>	44
<i>1.7. Métodos de otimização em Química</i>	46
<i>2. Objetivos</i>	48
<i>3. Materiais e métodos</i>	49
<i>3.1. Reagentes</i>	49
<i>3.2. Aparato</i>	49
<i>3.3. Procedimento</i>	50
<i>3.3.1. Estudo da formação e das propriedades do Poli(3-aminofenol)</i>	50
<i>3.3.2. Desenvolvimento dos genossensores para câncer de próstata e hepatite C</i>	51
<i>3.3.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	54
<i>3.3.4. DNA de Calf Thymus e brometo de etídio</i>	54
<i>4. Resultados e discussão</i>	55
<i>4.1. Estudo da formação e das propriedades do poli(3-aminofenol)</i>	55
<i>4.2. Desenvolvimento dos genossensores para câncer de próstata e hepatite C</i>	61
<i>4.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica</i>	71
<i>4.4. Planejamento Fatorial para otimização de DNA de Calf Thymus e brometo de etídio</i>	75
<i>5. Conclusão</i>	92
<i>6. Agradecimentos</i>	93
<i>7. Referências Bibliográficas</i>	94

Índice de figuras

Figura 1: Estrutura modelo para o vírus da hepatite C e proteínas codificadas pelo genoma do vírus -----	2
Figura 2: Ciclo de vida do vírus da hepatite C -----	3
Figura 3: Esquema do aparelho reprodutor masculino-----	5
Figura 4: Ações da p53 e rb no ciclo celular -----	7
Figura 5: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010 na população brasileira	9
Figura 6: Esquema de um biossensor-----	14
Figura 7: Esquemas de um transdutor piezoelétrico utilizando cristal de quartzo (a) e um transdutor piezoelétrico utilizando cantilever (b)-----	15
Figura 8: Esquema de funcionamento de uma fibra óptica (A) e da SPR (B)-----	17
Figura 9: Esquema de um sensor baseado em transdução térmica -----	18
Figura 10: Variação de corrente em função do tempo em voltametria, i_f para corrente faradaica e i_c para corrente capacitiva -----	21
Figura 11: Esquemas de possíveis transduções eletroquímicas-----	24
Figura 12: Esquema de um biossensor enzimático -----	26
Figura 13: Estrutura da imunoglobulina IgG-----	28
Figura 14: Ligação do anticorpo IgG ao antígeno -----	29
Figura 15: Esquema de funcionamento de um imunossensor: (a) detecção direta por técnicas como SPR e EIE e (b) detecção por marcadores específicos, os quais podem ser ópticos ou eletroquímicos -----	29
Figura 16: Estruturas de desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos -----	31
Figura 17: (a) padrão de ligação de hidrogênio nos pares de base e (b) modelo tridimensional para a estrutura do DNA definido por Watson e Crick -----	32
Figura 18: Esquema de um genossensor -----	33
Figura 19: Estrutura do brometo de etídio -----	34
Figura 20: Estrutura de polímeros condutores -----	37

Figura 21: Polimerização eletroquímica da anilina: (a) oxidação da anilina e formação de cátion-radical com perda de um elétron, (b) rearranjo e acoplamento de dois cátions-radicaís para a formação do dímero p-aminodifenilamina e (c) possíveis caminhos de reação para a oxidação da anilina para formar o polímero, onde 1 e 2 são adições nucleofílicas do monômero, 3 é adição radicalar e 4 e 5 adições eletrofilicas de duas formas oxidadas do monômero----- 38

Figura 22: Diagrama de Jablowsky ----- 45

Figura 23: (A) desnaturação térmica do produto de PCR; (B) construção do genossensor e detecção indireta através de oxidação do BE apenas no sistema contendo sonda; (C) detecção indireta feita através de oxidação do BE no sistema contendo alvo complementar ----- 52

Figura 24: Voltamogramas cíclicos em eletrodos de grafite: (A) $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ ($5,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$) em KCl ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), 100 mV.s^{-1} e (B) $HClO_4$ ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$), 50 mV.s^{-1} ----- 55

Figura 25: Voltamogramas cíclicos em eletrodo de grafite em solução de 3-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$) contendo $HClO_4$ ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$), 100 ciclos, 50 mV.s^{-1} ----- 56

Figura 26: Voltamograma cíclico em eletrodo de grafite modificado com poli(3-aminofenol): (A) antes (-) e após (-) polimerização em solução de $HClO_4$ ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$) e (B) voltamograma de pulso diferencial de eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4, 20 mV.s^{-1} ----- 57

Figura 27: Porcentagem de carga contra tempo de medida para eletrodo modificado com poli(3-aminofenol); (A) (—■—) controle negativo realizado à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) e (—▲—) após tratamento térmico e (B) porcentagem de carga obtida a partir de 100 voltamogramas cíclicos consecutivos realizados em $HClO_4$ ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$), faixa de potencial entre 0,0 e +0,7 V, 50 mV.s^{-1} ----- 59

Figura 28: Porcentagem de carga versus tempo de armazenagem para eletrodo modificado com poli(3-aminofenol), obtida a partir dos voltamogramas cíclicos realizados em $HClO_4$ ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$), faixa de potencial entre 0,0 e +0,7 V, 50 mV.s^{-1} . 60

Figura 29: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodos de grafite (A), eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) (B) e eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) (C) (-), contendo apenas as sondas (-) e contendo as sondas e os alvos complementares (-) hibridizado à $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms . ----- 62

Figura 30: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodos modificados com poli(3-aminofenol) (-), contendo apenas as sondas (-) e contendo as sondas e os alvos complementares hibridizados à $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos (-) para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR do vírus da hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , tempo do pulso = 60 ms . ----- 63

Figura 31: Estrutura da 3-aminofenoxazina (esquerda) e poli(2-aminofenol) (direita). 64

Figura 32: (A) Possível estrutura do poli(3-aminofenol) e (B) cálculos teóricos realizados para o dodecâmero de 3-aminofenol (comunicação pessoal de Prof. Odonório Abrahão Junior) ----- 65

Figura 33: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodos modificados com poli(3-aminofenol) contendo sondas e alvos complementares hibridizados à $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR de hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$, $5,4 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$, $54 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$, $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e $5,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms ----- 67

Figura 34: Perfil de corrente versus tempo para detecções utilizando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 sobre eletrodos modificados com poli(3-aminofenol) contendo sondas e alvos complementares hibridizado em 5, 10, 15, 20 e 25 minutos a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR de hepatite C, concentração da sonda e alvo = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms ----- 68

Figura 35: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) contendo apenas as sondas (-), contendo as sondas e os alvos complementares hibridizados a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos (-) e contendo as sondas e alvos não-complementares hibridizados a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos (-) para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR para o vírus da hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms . ----- 69

Figura 36: Curva de calibração para alvos complementares a diferentes concentrações para (A) câncer de próstata e (B) hepatite C ----- 70

Figura 37: Tempo de vida do genossensor. Medida realizada usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$, pH 7,4 em eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) contendo sondas e os alvos complementares hibridizados a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR para vírus da hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms ----- 70

Figura 38: Diagramas de Nyquist realizados em (A) eletrodos de grafite modificados com poli(3-aminofenol) (—□—), sonda de câncer de próstata (—□—) e sonda/alvo de câncer de próstata (—□—) e (B) eletrodos de grafite modificados com poli(3-aminofenol) (—□—), sonda de hepatite C (—□—) e sonda/alvo de hepatite C (—□—) em $K_3Fe[CN]_6/K_4Fe[CN]_6$ ($5,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$) contendo KCl ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$). Potencial aplicado de $+0,24 \text{ V}$, amplitude 10 mV , concentração das sondas = 100 ng . As linhas são referentes aos ajustes realizados às curvas experimentais ----- 72

Figura 39: Circuito equivalente proposto para os ajustes realizados sobre os dados experimentais de impedância, onde R_s (resistência à solução), R_{tc1} (resistência à transferência de carga entre eletrodo e polímero), Q_{dl1} (capacitância entre eletrodo e polímero), R_{tc2} (resistência à transferência de carga entre o material biológico e o polímero) e Q_{dl2} (capacitância entre o material biológico e o polímero) ----- 72

Figura 40: Esquema proposto para a hibridização da sonda com alvo através dos resultados obtidos por EIE: eletrodo de grafite (preto) modificado com poli(3-aminofenol) (vermelho) e possíveis funcionalizações (linhas retas), ferro/ferricianeto de potássio (sinais negativos), sondas e sondas com alvos para (A) apenas polímero em solução, (B) polímero mais sonda com grupos fosfato livres para a solução, (C) polímeros interagindo com grupos fosfato da sonda e (D) polímero mais sonda e alvo complementar em solução ----- 74

Figura 41: Medidas realizadas em tampão TE pH 8,0 com brometo de etídio ($40 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) (—) e brometo de etídio ($40 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) mais DNA de Calf Thymus ($240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) (—) através de (A) Espectroscopia de UV-visível, (B) Espectroscopia de Fluorescência, emissão à 595 nm e (C) Voltametria de Pulso Diferencial, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms ----- 76

Figura 42: Perfis de sinais espectroscópicos de fluorescência (—■—) e UV-visível (—○—) mantendo a concentração de DNA de Calf Thymus ($240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de brometo de etídio a ($40 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$), mas variando a concentração de $NaCl$ de $0, 10, 20, 40, 80, 160, 320$ e 640 mmol.dm^{-3} ----- 78

Figura 43: Perfis de sinais de corrente (—■—) e de potencial (—○—), mantendo a concentração de DNA de Calf Thymus ($240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de brometo de etídio a ($40 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$), mas variando a concentração de $NaCl$ de $0, 10, 20, 40, 80, 160, 320$ e 640 mmol.dm^{-3} ----- 79

Figura 44: Perfis de sinais espectroscópicos de fluorescência (—■—) e espectroscopia de UV-visível (—○—), mantendo a concentração de DNA de Calf Thymus ($240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de $NaCl$ a (20 mmol.dm^{-3}), mas variando a concentração de brometo de etídio de $16, 20, 24, 26.67, 34.28, 40, 80, 120$ e $240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ----- 80

Figura 45: Perfis de sinais de corrente (—■—) e de potencial (—○—), mantendo a concentração de DNA de Calf Thymus ($240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de $NaCl$ a (20 mmol.dm^{-3}), mas variando a concentração de brometo de etídio de $16, 20, 24, 26.67, 34.28, 40, 80, 120$ e $240 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ ----- 81

Figura 46: Gráfico normal para os efeitos, editado a partir dos dados da tabela 6----- 86

Figura 47: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de Calf Thymus e brometo de etídio.....	87
Figura 48: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de Calf Thymus e brometo de etídio.....	88
Figura 49: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de Calf Thymus e brometo de etídio.....	89
Figura 50: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de Calf Thymus e brometo de etídio.....	90

Índice de tabelas

Tabela 1: População infectada pela hepatite C por região.....	4
Tabela 2: Métodos de imobilização convencionais.....	35
Tabela 3: Dados obtidos do ajuste: P3AF(poli-3-aminofenol), ss(sonda), ds(alvo), HepC (vírus da hepatite C) e CP(câncer de próstata).....	73
Tabela 4: Planejamento Fatorial a dois níveis 2^3 com ponto central para concentrações de DNA/BE/NaCl. Concentrações são dadas em $\mu\text{mol.dm}^{-3}$, com exceção de NaCl, que é dado em mmol.dm^{-3} . I.F para Intensidade de Fluorescência (a.u), nm para comprimento de onda, μA para corrente e V para potencial.....	82
Tabela 5: Efeito das variáveis.....	83
Tabela 6: Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento fatorial e os valores de probabilidade cumulativa.....	85

Lista de abreviaturas e siglas

A – adenina

AC – *alternate current* (corrente alternada)

BE – brometo de etídio

C - citosina

C_{dl} – capacitância

CD81 – *cluster of differentiation 81* (conjunto de diferenciação 81)

CDK – *cyclin dependent kinase* (quinases dependentes de ciclinas)

CLDN-1 – gene *claudin-1*

DNA – *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

DRE – *digital rectal exam* (exame de toque retal)

dsDNA – *double strand* (dupla fita do DNA)

E1 – glicoproteína do envelope 1

E2 – glicoproteína do envelope 2

ECE – *electrochemical-chemical-electrochemical* (reação eletroquímica-química-eletroquímica)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EFC – elementos de fase constante

EIE – espectroscopia de impedância eletroquímica

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

EWI-2 – também conhecida como CD316, conjunto de diferenciação 316.

FRIT – fluorescência de reflexão interna total

G - guanina

HBP – hipertrofia benigna da próstata

Hz – hertz

i – corrente

i_c – corrente capacitiva

i_f – corrente faradaica

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry* (União Internacional de Química Pura e Aplicada)

LDL – *low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade)

MFA – microscopia de força atômica

NAT – *nucleic acid testing* (teste de ácido nucléico)
NS – *non-structural* (domínio não-estrutural)
OMS – Organização Mundial da Saúde
P3AF – poli(3-aminofenol)
PCR – *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PSA – *prostate specific antigen* (antígeno prostático específico)
qb – quilobase
R – resistência
rb – retinoblastoma
RCBP - registros de câncer de base populacional
RIBA – *recombinant immunoblot assay* (ensaio de imunoblot recombinante)
RIT – refletância interna total
RNA – *ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)
 R_s – resistência da solução
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase – transcriptase reversa
 R_{tc} – resistência à transferência de carga
SIM - sistema de informação sobre mortalidade
SPR – *surface plasmon resonance* (ressonância plasmônica de superfície)
SR-BI – *scavenger receptor class B type I* (receptor *scavenger* classe B tipo I)
ssDNA – *single strand* (simples fita do DNA)
SVS – Secretaria de Vigilância à Saúde
T – timina
t – tempo
TERF – transferência de energia ressonante por fluorescência
UTR - *untranslated region* (região não-translacional)
V – volts
VC – voltametria cíclica
VHC – vírus da hepatite C
VLDL – *very low density lipoprotein* (lipoproteína de muita baixa densidade)
VPD – voltametria de pulso diferencial
 Z' – impedância real
 Z'' – impedância imaginária
W – impedância de Warburg

Materials

- 2-aminofenol (C_6H_7NO) 99% - Acros Organics. Massa molar: $109,13 \text{ g.mol}^{-1}$
- 3-aminofenol (C_6H_7NO) 98% - Aldrich. Massa molar: $109,13 \text{ g.mol}^{-1}$
- 4-aminofenol (C_6H_7NO) 97,5 % - Acros. Massa molar: $109,13 \text{ g.mol}^{-1}$
- Ácido nítrico (HNO_3) P.A (65%) – Cinética. Massa molar: $63,01 \text{ g.mol}^{-1}$
- Ácido perclórico ($HClO_4$) P.A (70%) – A.C.S. Massa molar: $100,46 \text{ g.mol}^{-1}$,
 $1 \text{ dm}^3 = 1,675 \text{ g}$
- Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.A (99,5%).-A.C.S. Massa molar: $46,07 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Brometo de etídio ($C_{21}H_{20}BRN_3$) – Merck. Massa molar: $394,29 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Cloreto de sódio ($NaCl$) P.A. – Vetec. Massa molar: $58,44 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Cloreto de potássio (KCl) P.A. – Vetec. Massa molar: $74,56 \text{ g.mol}^{-1}$
- DNA de Calf Thymus – CalBiochem
- EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) P.A. – Vetec. Massa molar: $372,24 \text{ g.mol}^{-1}$.
- Ferrocianeto de potássio [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] P.A. – Vetec. Massa molar: $422,39 \text{ g.mol}^{-1}$
- Ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$] P.A – Reagen. Massa molar: $329,25 \text{ g.mol}^{-1}$
- Hidrogenofosfato dissódico (Na_2HPO_4) P.A. – Vetec. Massa molar: $141,96 \text{ g.mol}^{-1}$
- Dihidrogenofosfato de sódio anidro (NaH_2PO_4) P.A. – Vetec. Massa Molar: $119,98 \text{ g.mol}^{-1}$
- Hidróxido de sódio ($NaOH$) P.A. – Vetec. Massa molar: $40,00 \text{ g.mol}^{-1}$
- 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol [($HOCH_2$)₃CNH₂-HCl] – Gibco BRL. Massa molar: $157,64 \text{ g.mol}^{-1}$.

Resumo: A construção de sensores biológicos tem se tornado uma atividade ampla no ramo da ciência visando principalmente questões de saúde e de meio ambiente. O desenvolvimento desses biossensores em laboratório tem sido trabalhado por vários grupos de pesquisa, buscando dispositivos, específicos, de baixo custo e de fácil manuseio e preparação. As técnicas eletroquímicas são as que concentram o maior número de trabalhos realizados devido à facilidade no processo e na instrumentação, permitindo obter resultados rápidos e confiáveis. Eletrodos modificados com polímeros condutores estão sendo utilizados, pois melhoram a resposta analítica além de auxiliar na imobilização das biomoléculas em questão. Este trabalho visou a utilização de eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com o polímero poli(3-aminofenol) para construção de biossensores baseados em DNA para detecção do vírus da hepatite C e câncer de próstata. O polímero apresenta condições adequadas (facilidade na formação, estabilidade térmica e eletroquímica, além da possibilidade de funcionalizações na estrutura) para a construção dos sensores. Os produtos de PCR desnaturados foram imobilizados com sucesso na matriz polimérica. A detecção indireta de hibridização foi realizada utilizando sinal de oxidação de brometo de etídio (BE). O sistema de detecção para o câncer de próstata e hepatite C foi otimizado com 15 minutos de interação do alvo com a sonda, concentração de BE a $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, limite de detecção de 16 e 19 ng e quantificação de 54 e 64 ng para o câncer de próstata e hepatite C, respectivamente, e estabilidade para os sensores de 60 dias. Espectros de impedância eletroquímica foram obtidos comprovando a eficiência na imobilização da sondas e alvos devido às diferenças eletrostáticas entre a solução aniônica e os materiais imobilizados. Aumento nos valores de resistência e capacitância dos sistemas contendo a sonda para os sistemas contendo os alvos mostraram qualitativamente uma diferença nas respostas. Um modelo matemático baseado em planejamentos fatoriais entre BE e DNA de *Calf Thymus* foi feito através de medidas de espectroscopia de fluorescência, UV-visível e voltametria de pulso diferencial. Uma proporção de 6:1 de DNA/BE foi determinada como melhor e, na faixa trabalhada neste estudo, a influência de cloreto de sódio foi investigada, com melhores resultados a uma concentração de 20 mmol.dm^{-3} .

Abstract: The development of biologic sensors has become a wide activity in science seeking mainly health and environmental issues. The biosensor development in laboratory has been investigated by many researchers seeking sensitivity, specific, low cost and portable devices. The electrochemical techniques are used in the largest number of works due to the easiness in the process and in the instrumentation, allowing for the rapid and reliable results. Modified electrodes with conducting polymers have been used because they improve the analytical response in addition to aid in the biomolecule immobilization. This work aimed the use of graphite electrodes and graphite electrodes modified with poly(3-aminophenol) for the construction of DNA-based biosensors for the detection of hepatitis C virus and prostate cancer. The polymer presents adequate conditions (ease in formation, thermal and electrochemical stability besides the presence of functionalizations in its structure) for the sensor construction. The denatured PCR products were successfully immobilized over the polymeric matrix. The hybridization indirect detections were performed using ethidium bromide (EB) oxidation signal. The detection system for prostate cancer and hepatitis C was optimized with 15 minutes of interaction between target and probe, concentration of EB at $0.54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, detection limit of 16 and 19 ng and quantification limit of 54 and 64 ng for prostate cancer and hepatitis C, respectively and lifetime for the sensors of 60 days. Electrochemical impedance spectra were obtained proving the probe and target immobilization efficiency due to electrostatic differences between the anionic solution and the immobilized material. Increase in resistance and capacitance values of the systems containing the probe for the systems containing the targets shown a response difference, qualitatively. A mathematic model based on factorial design planning between EB and *Calf Thymus* DNA was performed through fluorescence spectroscopy, UV-visible spectroscopy and differential pulse voltammetry. A proportion of 6:1 for DNA/EB was found the best condition and, in the working range of this study, the influence of sodium chloride was investigated, with the better results for a concentration of 20 mmol.dm^{-3} .

1. Introdução

1.1. Hepatite C

A hepatite é uma inflamação do fígado associada a um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde a infecção assintomática, passando pela hepatite icterícia até a necrose hepática. Foram identificados 5 tipos de vírus da hepatite, denominados, vírus da hepatite A, da hepatite B, C, D e E [1].

O vírus da hepatite C (VHC) é um vírus de ácido ribonucléico (RNA) pertencente à família *Flaviridae*, mesma da dengue e da febre amarela [2]. É uma doença transmissível pelo sangue, ocorrendo com maior frequência através de transfusões sangüíneas ou de hemoderivados, bem como por via parenteral não-transfusional e percutânea em toxicômanos, pacientes expostos a métodos diagnósticos invasivos, tatuagens, hemodiálise, transplantes, e em profissionais da área de saúde. Práticas tradicionais, como acupuntura com agulhas não esterilizadas, e acidentes ocasionais, como lesões incisivas com facas não esterilizadas, foram identificadas como modos prováveis de transmissão. Existe também associação com relações sexuais e promiscuidade. Profissionais de saúde apresentam uma prevalência de infecção por VHC três a quatro vezes maiores do que a população em geral [3].

Uma compreensão da estrutura viral e do mecanismo de ação no organismo auxilia a compreensão da gravidade da doença. O vírus da hepatite C foi primeiramente identificado por clonagem molecular do genoma do vírus em 1989 [4]. Possui genoma de cadeia simples de RNA medindo 9,6 quilobases (qb). Possui uma fase de leitura aberta grande de 9030 à 9099 para codificar uma grande poliproteína contendo de 3010 a 3033 aminoácidos. Esta poliproteína é processada por uma combinação de proteinases virais e proteinases do hospedeiro e produz no mínimo 10 proteínas pós-translacionais. As proteínas que estão mais próximas dos grupos terminais amino da poliproteína são chamadas de proteínas estruturais, contendo a proteína central (nucleocapsídeo) seguida por duas proteínas glicosiladas E1 e E2, que concentram a parte mais variada do genoma. As proteínas mais próximas dos grupos carboxila terminais da poliproteína são chamadas de não-estruturais (NS), NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B [5]. Além desses, mais dois domínios são encontrados, chamados de regiões não-translacionais (do

inglês, *untranslated region*, UTR), uma na posição 5' e a outra na posição 3' do genoma, como podem ser vistos na Figura 1:

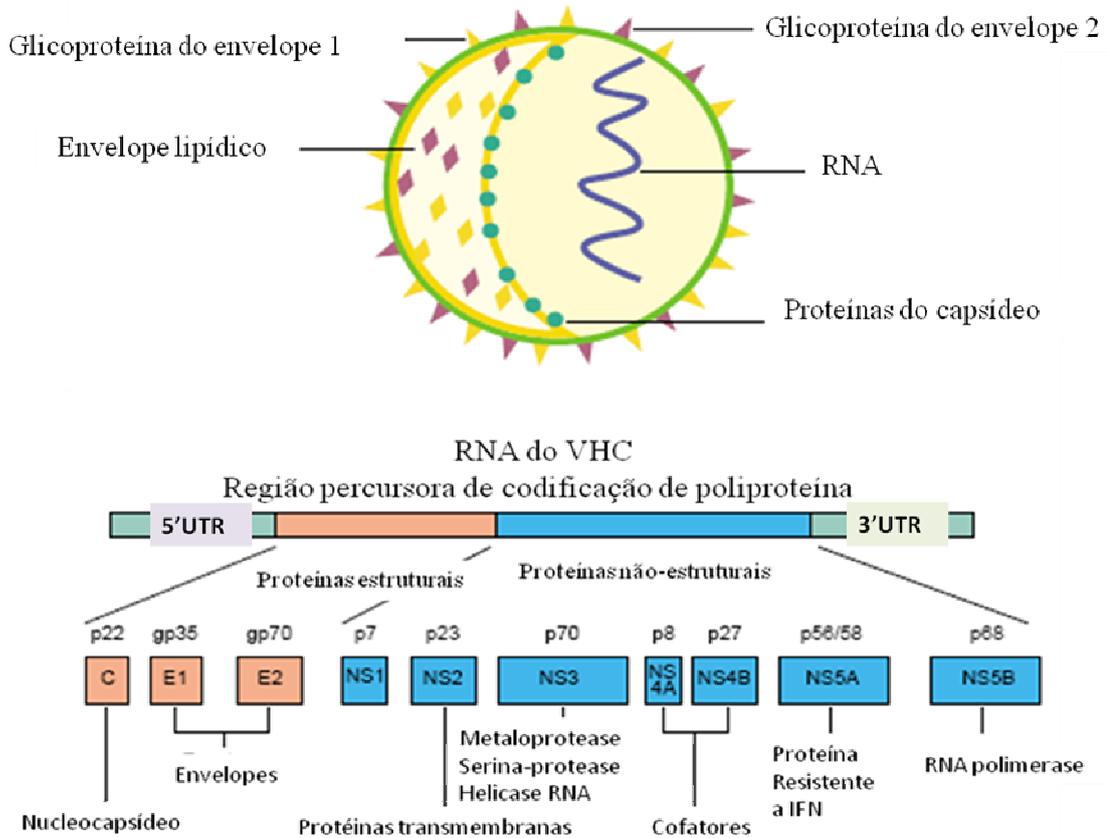


Figura 1: Estrutura modelo para o vírus da hepatite C e proteínas codificadas pelo genoma do vírus [6].

A inserção viral no citoplasma da célula hospedeira se dá via glicoproteínas dos envelopes, mediada por receptores que interagem entre si para formar um heterodímero não-covalente E1E2 [7]. Embora ainda não completamente elucidados, vários estudos apontam que certas moléculas expressas nas superfícies das células do fígado são responsáveis pela entrada do vírus; a CD81, SR-BI e CLDN-1. Tais células são encontradas em todo o organismo, porém a infecção pelo VHC foi estudada e o fígado foi comprovado ser o órgão de replicação do vírus através da detecção das proteínas não-estruturais em pacientes contaminados [8]. A explicação se deve ao estudo de Perugini *et al.* [9] mostra que um produto de clivagem, denominado EWI-2 que apresenta um efeito inibitório para a entrada do VHC nas células, produto que não está presente nas células do fígado. O EWI-2 pode estar reduzindo a acessibilidade das glicoproteínas às moléculas expressas no fígado por impedimentos estéricos como

também por modificações conformacionais nas mesmas, bloqueando a ligação dos heterodímeros. Além das proteínas do envelope estar diretamente associadas às interações com as moléculas do fígado, lipoproteínas como LDL e VLDL interagem com os heterodímeros do vírus em circulação com o sangue e facilitam a entrada nas células mediadas principalmente pela SR-BI [10]. Como o fígado é o principal local de formação de lipoproteínas, as interações e mediações com o VHC ocorrem com maior facilidade. Apesar de pouco conhecido, o mecanismo molecular da replicação do VHC, acredita-se que ele se assemelhe às replicações de outros vírus baseados em RNA de sonda positiva, o que pode ser visualizado no esquema apresentado na Figura 2:

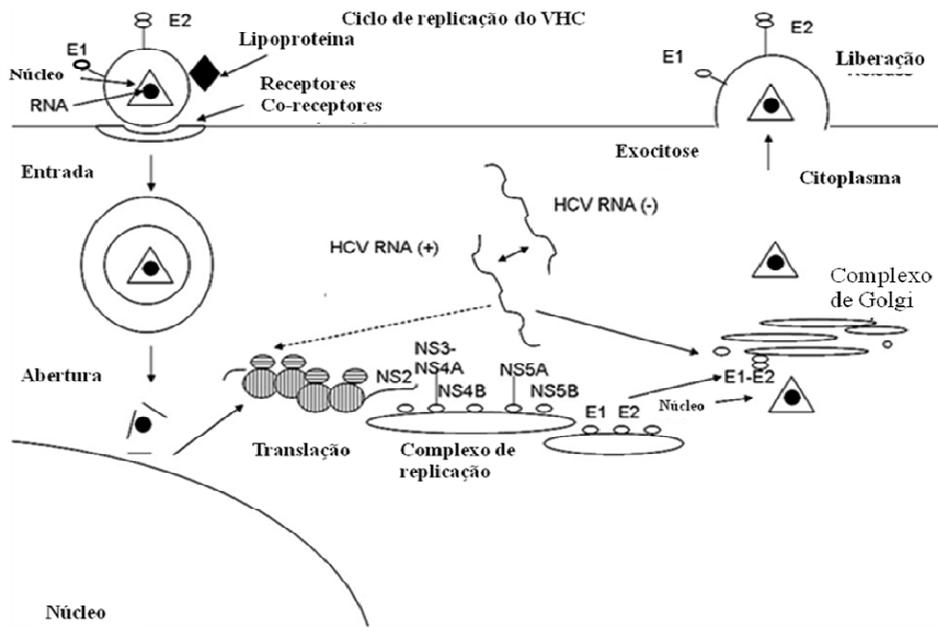


Figura 2: Ciclo de vida do vírus da hepatite C [11].

Após a entrada do VHC na célula, os nucleocapsídeos são liberados na célula onde o RNA viral age como RNA mensageiro para translação. Na replicação do RNA, RNA - dependente converte a sonda positiva VHC RNA (+) em sonda negativa VHC RNA (-), a qual serve como base para futuras sínteses de RNA (+). Replicação citoplasmática ocorre via complexos de replicação associados à membrana em uma rede membranosa perinuclear. RNA genômico contém plasmídeos iniciadores dentro das vesículas citoplásmicas através de membranas celulares, as quais se fundem com a membrana plasmática [11]. O processo de replicação é geralmente não-citolítico (a célula alvo é infectada, mas não morre). Na maioria dos casos, a infecção crônica

continua por muitos anos sem a evidência de dano ao hepatócito, ou seja, uma doença silenciosa, pois seria assintomática nos primeiros estágios de desenvolvimento.

Devido à variabilidade genética do VHC, um sistema consensual de nomenclatura foi proposto [12], onde os grupos principais do vírus são designados como genótipos e discriminados com numerais arábicos e os subtipos dentro de um mesmo genótipo são indicados por letras minúsculas, por ordem de descoberta. Existem pelo menos 6 genótipos e mais de 50 subtipos descritos. Embora todos os genótipos possam ser encontrados ao redor do mundo, existe clara distribuição geográfica. Os genótipos 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, e 3a somam mais de 90% das infecções por VHC na América do Norte e do Sul, Europa, Rússia, China, Japão, Austrália e Nova Zelândia. Os genótipos 1a e 1b são responsáveis por 80% (40% cada) dos casos de infecção pelo VHC nos Estados Unidos [13]. O genótipo 1b soma aproximadamente dois terços isolados de VHC no sul da Europa, China, Rússia e Japão. O genótipo 4a é o mais predominante no Egito e o genótipo 5a é isolado em 50% de pessoas infectadas pelo VHC na África do Sul. O genótipo 6 é encontrado no Sudeste Asiático [14]. Na maior parte das regiões brasileiras, o genótipo 1 é o agente etiológico em 60-75% das infecções pelo VHC. O genótipo 3 é o segundo predominante e o genótipo 2 constitui menos de 5% dos casos [15].

A infecção pelo vírus da hepatite C é um problema de saúde pública em todo o mundo, inclusive no Brasil. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que aproximadamente 3% da população mundial estariam infectadas por este vírus [16], com uma alta diversidade na distribuição da doença por região, especialmente no Pacífico Oeste, como pode ser visto na tabela, abaixo:

Tabela 1: População infectada pela hepatite C por região [17]

Região	População infectada (milhões)
Europa	8,9
Américas	13,1
Sudeste asiático	32,3
Pacífico Oeste	62,2
Mediterrâneo Leste	21,3
África	31,9

1.2. Câncer de próstata

A próstata é um pequeno órgão glandular situado logo abaixo da bexiga, como pode ser visto na Figura 3, 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. 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.

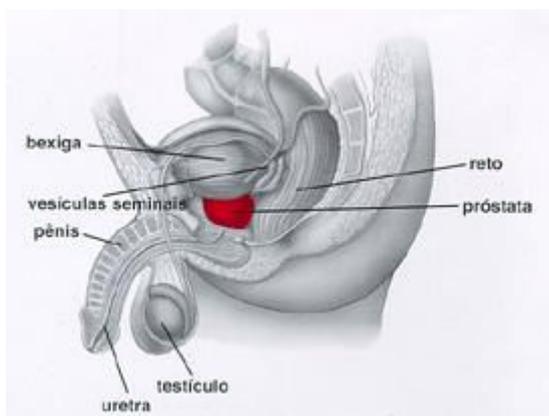


Figura 3: Esquema do aparelho reprodutor masculino.

As doenças não cancerosas relacionadas a esse órgão podem ser classificadas como:

- a) prostatite aguda, inflamação de origem 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;
- b) prostatite crônica, inflamação de origem 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;
- c) hipertrofia benigna da próstata (HBP), também conhecida como adenoma de próstata, consiste em um crescimento das glândulas prostáticas e, conseqüentemente, de toda a próstata. Suas causas ainda são indeterminadas. 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.

Câncer não é apenas uma doença, mas um termo genérico utilizado para englobar um grupo de mais de duzentas doenças compartilhando características comuns. Os carcinomas são os tipos de câncer caracterizados por seu crescimento irregular e espalhamento das células a outras partes do corpo [18].

O câncer da próstata possui a sua etiologia indeterminada. Hering [19] 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.

Um estudo de Srougi e Simon [20] 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.

Segundo Rose [21], 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 a retinoblastoma (rb).

A ativação dos genes supressores de crescimento celular excessivo, p53 e rb ocorrem quando alguns tipos de complexos formados por proteínas citoplasmáticas que controlam o ciclo das células não são completados corretamente. Dentre as principais proteínas estão as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK), responsáveis na formação do complexo ciclina-CDK, promovendo uma ativação de um fator de transcrição pela remoção do inibidor do fator de transcrição. Este fator ativa a

transcrição dos genes requerida para os próximos estágios do ciclo celular, incluindo os genes ciclina e CDK. Durante o ciclo celular, níveis de ciclina dentro das células elevam e diminuem, mas os níveis de CDK permanecem praticamente constantes. Ativação das CDKs é um evento central na regulação do ciclo celular e suas ativações são, portanto, reguladas de diferentes maneiras, como pode ser visto no esquema apresentado na Figura 4:

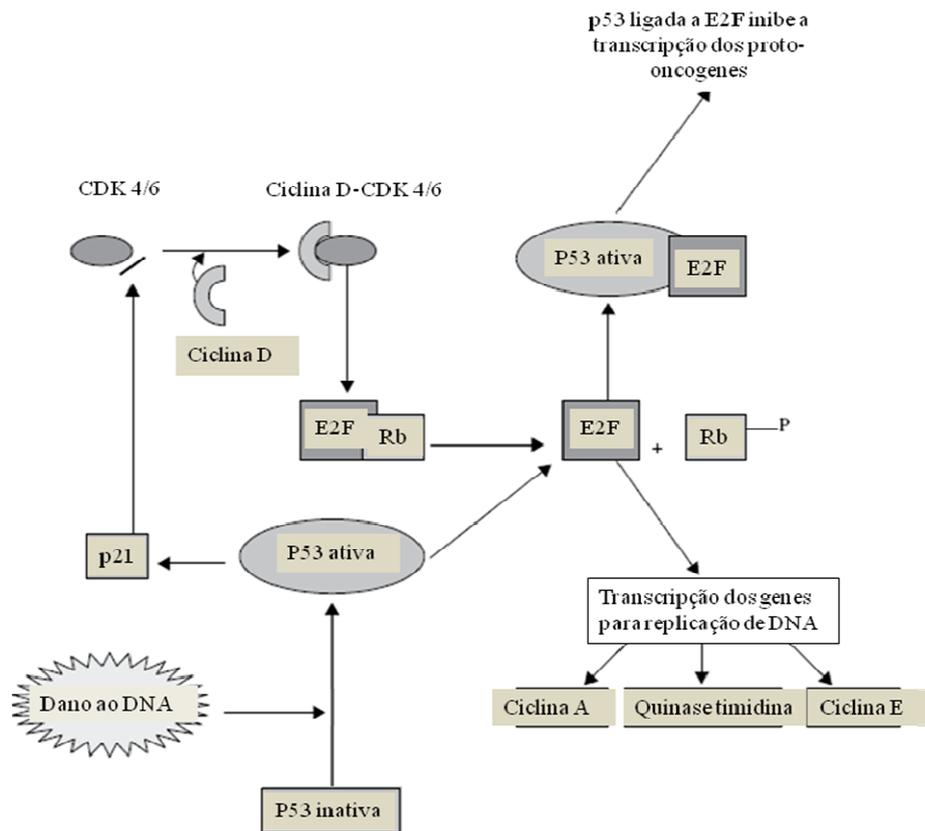


Figura 4: Ações da p53 e rb no ciclo celular [18].

A rb é ativada quando a ciclina D forma um complexo com CDK4/6 o que fosforila o gene, permitindo a liberação de fatores de transcrição, necessário para replicação do DNA e para a progressão do ciclo celular. A p53 funciona por detectar dano ao DNA e impedindo o ciclo celular. Isso é essencial devido ao impedimento da replicação de DNA danificado, que poderia ser manifestado na forma de mutação. A p53 é ativada e inicia a transcrição do gene para p21, a qual é inibidora da CDK.

O câncer, conhecido pelo crescimento anormal das células, ocorre quando os genes p53 não funcionam corretamente. Mais da metade dos tumores humanos apresentam mutações na p53 e, portanto, sua inativação. Dessa maneira, não há inibição

dos proto-oncogenes na mitose. Os proto-oncogenes, importantes promotores no crescimento celular e divisão, podem ser mutados em oncogenes e promover um efeito negativo. Um simples oncogene não seria capaz de originar o câncer, mas pode causar a perda do controle inibitório do ciclo celular aumentando a taxa de mitose. Quando isso ocorre, pode ser o começo do caminho que leva ao desenvolvimento do câncer [18]. Com o passar dos anos (eis o motivo do câncer se desenvolver em indivíduos em idades avançadas) acumulam-se perdas dos genes supressores, ocasionando liberação da atividade dos proto-oncogenes e permitindo a degeneração das células prostáticas.

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 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.

Desenvolvido pelo *The American Joint Committee on Cancer* [22], o TNM 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. A escala de Gleason serve para classificar a evolução do tumor baseado em tecido da possível região afetada por biópsia. A escala é numérica, variando de 1 a 10, onde a partir de sete (7) delimita-se a presença de tumores mais agressivos. A escala é assim chamada em homenagem ao Dr. Donald Gleason, um patologista de Mineápolis que a desenvolveu juntamente com outros colegas do Hospital dos Veteranos de Mineápolis na década de 60 [23].

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, o que tem sido um recurso indispensável para o planejamento destas ações. A última estimativa realizada mostrou que o número de novos casos de câncer de próstata estimados para o Brasil no ano de 2010 é de 52350, 54 casos para cada 100 mil homens, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma (53410 casos) [24], como pode ser visto na Figura 5:

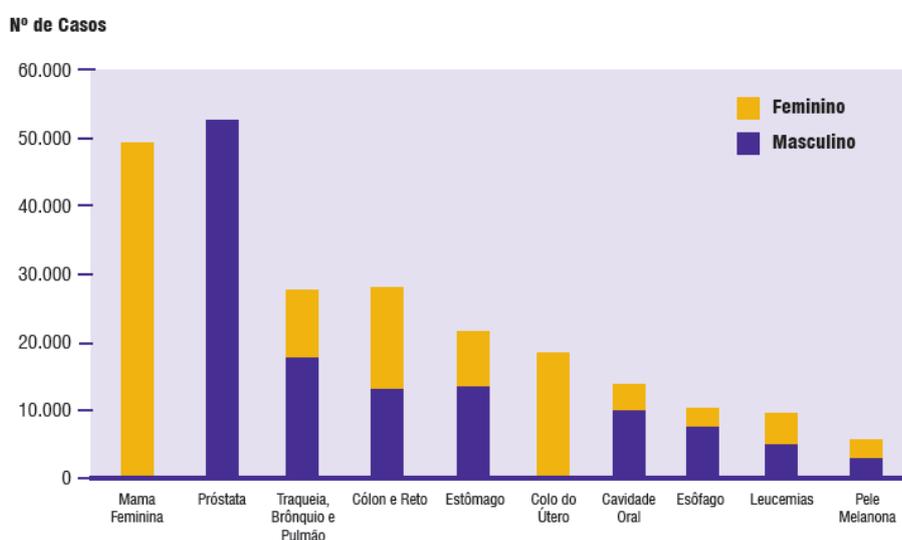


Figura 5: Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010 na população brasileira [24].

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.

1.3. *Diagnóstico*

Ambas as doenças descritas nos tópicos anteriores possuem em comum o fato de serem assintomáticas nos estágios iniciais e que, sem um diagnóstico precoce, podem evoluir e causar danos sérios e irreparáveis aos indivíduos.

1.3.1. *Hepatite C*

O diagnóstico da hepatite C pode ser dividido em dois grupos: sorológicos e moleculares. Os testes comercializados para detecção do anti-VHC são os ELISA (ensaio de enzimas imuno-adsorvidas), que apresentam vantagens como rapidez no processamento, facilidade de automação, alta confiabilidade e custo relativamente baixo. As três gerações de ELISA desenvolvidas até o momento utilizam proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos para a captação do anti-VHC. O teste ELISA I, de primeira geração (não mais utilizado na prática clínica), tinha como alvo somente um antígeno, o polipeptídeo c100-3. A segunda geração do teste ELISA (ELISA II) surgiu em 1992 nos Estados Unidos, tendo incorporado duas proteínas recombinantes do VHC: c22-3 (derivada da região estrutural, ou *core*) e c33-c (derivada da região não-estrutural NS3). O teste ELISA de terceira geração (ELISA III) incluiu antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos para captura de anticorpos e adicionou um antígeno da região NS5. Com a última geração, reduziu-se o tempo médio de soroconversão de detecção para 7 a 8 semanas. Além disso, aumentou-se a sensibilidade para detecção da infecção, atribuída à nova configuração dos antígenos já presentes no ELISA II e não à presença do antígeno NS5 [25].

A baixa especificidade dos ELISA determinou o desenvolvimento de testes suplementares para confirmação diagnóstica da infecção pelo VHC em indivíduos com resultados positivos. Nos testes suplementares, a especificidade indica a proporção de indivíduos com resultado negativo quando a infecção está ausente. Contudo, um resultado positivo mesmo em um teste suplementar nem sempre é indicativo de infecção, visto que os pacientes que se recuperam da infecção podem permanecer anti-VHC positivos durante anos. Um dos testes por *imunoblot* mais utilizados é comercializado com o nome de RIBA (ensaio de *imunoblot* recombinante) e produzido pela Chiron Corporation. As modificações de configuração do RIBA foram surgindo

concomitantemente com as dos testes ELISA, havendo até o momento três gerações, sendo que o RIBA I não é mais comercializado. No RIBA, incuba-se o soro do paciente com tiras de nitrocelulose. Nessas tiras estão imobilizados, em bandas individuais, os diferentes antígenos recombinantes do VHC, a superóxido dismutase — já que, pela tecnologia utilizada, todos os antígenos são misturados com a superóxido dismutase — e duas bandas controle de imunoglobulina G. Como a taxa de falso-positivos dos testes ELISA II ou III nesse grupo é elevada, justifica-se o uso de um teste suplementar para estabelecer o diagnóstico da infecção [25].

Os testes moleculares qualitativos informam a presença ou não do RNA viral. O teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) detecta diretamente a presença de RNA a um período mais curto que o ELISA e o RIBA, de 1 a 3 semanas após a infecção [26]. Mesmo o teste sendo de alta sensibilidade, deverá ser usado apenas quando há resultados inconclusivos nos testes sorológicos. Isso se deve porque virtualmente todos os pacientes que apresentam testes positivos anti-HCV, históricos de risco e valores de alanina aminotransferase no soro serão virêmicos (apresentarão resultados positivos por PCR, não havendo necessidade do teste a não ser que o paciente vá iniciar terapia antiviral). Pacientes que devem ser testados por PCR incluem os imunocomprometidos (HIV ou em processo de hemodiálise) que não podem gerar anticorpos para a infecção, pacientes que estejam em um período de infecção aguda, onde os anticorpos ainda não foram produzidos e pacientes com testes positivos para o HCV, mas com níveis normais de alanina aminotransferase [26,27].

A PCR juntamente com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR), que catalisa a síntese do DNA complementar a partir da região 5'RNC do RNA viral, é utilizada para amplificar o DNA, produzindo quantidades suficientes para serem detectadas em gel de agarose [28]. O limite teórico de detecção, por PCR, em condições ótimas, é de aproximadamente 1000 cópias do genoma/ml [29], mas existem variações da técnica e uma das mais sensíveis é capaz de detectar até 100 cópias do genoma/ ml de soro [30]. A RT-PCR é uma técnica laboriosa que requer cuidados extremos para evitar resultados falso-positivos ou falso-negativos [31]. Como os protocolos não são padronizados, os resultados variam entre os laboratórios. Um estudo comparando os resultados da determinação do RNA do VHC por RT PCR em 31 laboratórios (principalmente europeus) constatou que apenas cinco (16%) identificaram corretamente todas as amostras do painel de controle [32].

Com o objetivo de tornar a administração de sangue e derivados mais segura, tem sido preconizado pesquisar o RNA do VHC através de técnicas de amplificação de ácidos nucléicos (NAT) [33]. Recentemente, a OMS estabeleceu o primeiro padrão de referência para esses testes [34]. Apesar de a técnica indicar aumento de segurança no uso de derivados de sangue, há registro de transmissão do VHC através da transfusão de concentrado de plaquetas feito a partir de sangue com teste de amplificação negativo [35]. O tempo atual para detecção com a técnica NAT é de aproximadamente 2 dias, porém o custo do exame ainda é bem alto para os padrões brasileiros, 25 dólares por bolsa de sangue [36].

1.3.2. Câncer de próstata

O diagnóstico clínico mais comum para pacientes com suspeita de tumor na próstata ocorre através de exames de rotina pelo exame de toque retal (DRE) [37], o qual depende da sensibilidade manual do operador em encontrar anormalidades no órgão.

Um segundo diagnóstico é feito pelo antígeno prostático específico (PSA), uma protease sérica produzida pelo epitélio prostático para manter o fluido seminal [38]. É composta de uma cadeia única de glicoproteína que exibe atividade proteolítica similar à quimiotripsina [39]. O primeiro arranjo imunológico criado para medir o PSA foi de tipo *sandwich*, ELISA [40], suficientemente sensível para detectar PSA no soro de um homem normal e de pacientes com HBP e câncer de próstata. Os níveis de PSA [41] 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 [42] indiquem que a biópsia ainda pode ser evitada nesse nível.

Trabalhos [43,44] 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% [45,46]. Ainda, entretanto, 50% dos pacientes com câncer no estágio T1 e 40% em T2 não são detectados por marcadores moleculares em sangue periférico [47].

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 diagnósticos para a hepatite C e para o câncer de próstata que conseguem detectar as doenças em estágios não avançados baseiam-se em métodos que ainda apresentam controvérsias na literatura, como é o caso dos níveis de PSA, os resultados falsos do ELISA, RIBA e PCR, além do pouco sucesso de detecção nos estágios iniciais das doenças. Embora estudos estejam sendo realizados [44,48], ainda não há uma plataforma diagnóstica confiável para a detecção precoce, o que reduziria o potencial para infecção e disseminação das doenças. Diante do contexto atual do diagnóstico das diversas doenças, propõe-se desenvolver plataformas diagnósticas que possam gerar resultados com rapidez, especificidade, sensibilidade, baixo custo e de fácil manuseio, características encontradas nos sensores biológicos.

1.4. Biossensores

Biossensores são dispositivos analíticos que contêm um material biológico, também chamado de camada de reconhecimento, sensível, imobilizada a um transdutor, responsável por transduzir, ou seja, identificar e converter um sinal baseado nas alterações biológicas em um sinal quantitativo, proporcional à concentração do analito em questão e mensurável através de um sistema de detecção específico [49].

Uma definição mais elaborada, proposta pela IUPAC [50], um biossensor é um dispositivo integrado que é capaz de fornecer quantidade específica de informação analítica usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) em contato espacial direto com o transdutor. Um biossensor deve ser claramente distinguível de um processo bioanalítico, o qual requer etapas de processamento adicional tal como adição de reagente. Um esquema de um biossensor pode ser visto na Figura 6:

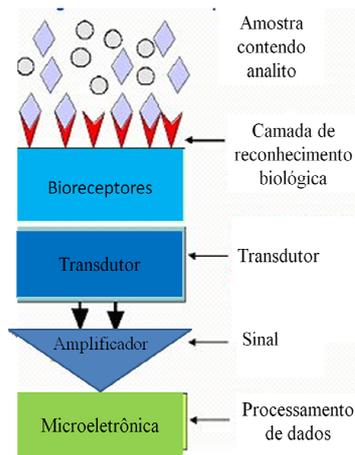


Figura 6: Esquema de um biossensor.

Desde a construção do primeiro biossensor para detecção de glicose por Clark e Lyons em 1962 [51], vários pesquisadores de todo o mundo têm trabalhado nessa nova área da ciência. O próprio biossensor de glicose até hoje é motivo de estudos, como mostram algumas revisões [52,53], com mais de 40 tipos de dispositivos no mercado. Isso mostra a evolução dos sistemas e da constante busca por melhoria nas detecções, não só nas áreas médicas, como o controle de diabetes por monitoramento de glicose e outras doenças, mas também no monitoramento e controle de fármacos, alimentos e do meio ambiente. Dentre os diversos tipos de biossensores, o transdutor, a camada de reconhecimento e o modo de interação entre ambos são a chave para a construção dos dispositivos. O conhecimento e compreensão dessas peças-chave são fundamentais para o pesquisador

1.4.1. Transdutores

A. Transdutores piezoelétricos

O transdutor pode variar em forma e função para se adequar à medida de interesse. Dentre os principais utilizados estão os piezoelétricos [54]. Esse tipo de sensor avalia variações de frequência de um cristal de quartzo oscilante originadas por um aumento ou diminuição de massa na superfície. Assim, um sensor construído com uma biomolécula imobilizada sobre um cristal de quartzo trabalha com o princípio da

molécula alvo em solução interagir especificamente com a camada de reconhecimento, provocando uma alteração na frequência de oscilação e, conseqüentemente, um aumento de massa do sistema, como pode ser visto na Figura 7A. Baseado no mesmo princípio de alteração de massa, biossensores também são construídos sobre *cantilevers* conhecido nos microscópios de força atômica (MFA) [55]. Devido à flexibilidade intrínseca dos *cantilevers*, as detecções podem ser medidas através da incorporação de sistemas piezoelétricos ou através de desvios do *laser* em medidas microscópicas [56].

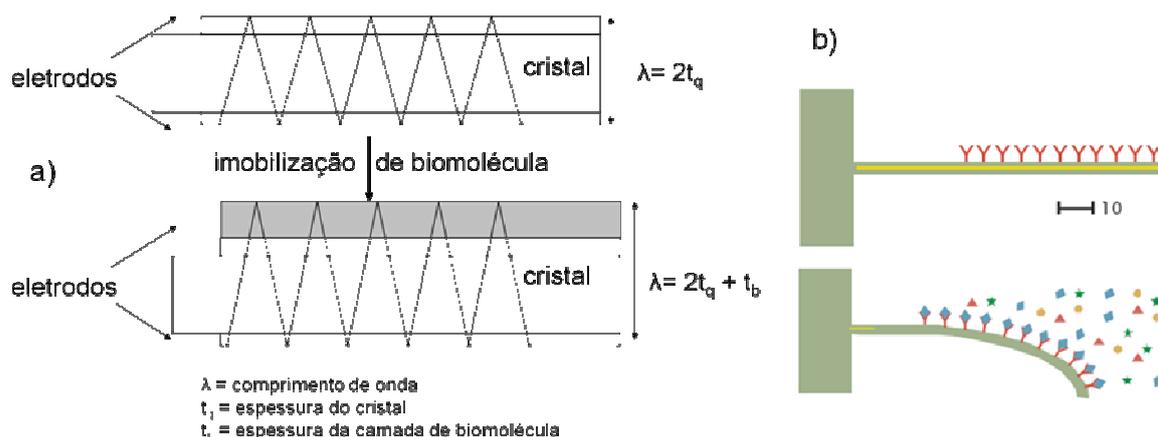


Figura 7: Esquemas de um transdutor piezoelétrico utilizando cristal de quartzo (a) e um transdutor piezoelétrico utilizando *cantilever* (b) [56].

B. Transdutores ópticos

Outro tipo de transdutor muito utilizado é o óptico [57]. Sistemas colorimétricos são amplamente utilizados em análises bioquímicas de rotina, como o ELISA, nos quais utilizam enzimas que promovem reações substrato-produto com variações na cor das soluções. Uma delas é a peroxidase que utiliza substratos produzidos por várias empresas, LumiGlo^R HRP Substrate e LumiGlo ReserveTM, ambos da KPL [58], 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e sal de ácido 2,2'-azénobis [3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico]-diamônio da Thermo Scientific Pierce [59]. Outra enzima importante é a fosfatase alcalina que utiliza kits contendo substratos colorimétricos como 4-nitrofenil fosfato pela Biovision [60], Bioassay [61] e pela Anaspec [62] e kits fluorimétricos de 4-metilumbeliferil fosfato dissódico da Biovision [60]. Compostos fluorescentes ou quimioluminescentes são utilizados como marcadores ópticos baseados nas medidas

fluorescentes de excitação e emissão dos compostos ou de seus derivados, normalmente acoplados às amostras biológicas presentes no analito-alvo, como a fluoresceína [63] e o luminol [64]. Outras medidas, que não sejam por absorbância, fluorescência, fosforescência, luminescência, que necessitam de marcadores que apresentem tais propriedades, são baseadas em fenômenos ópticos, promovendo detecções através de diferenças nos índices de refração e espalhamento de luz.

Os transdutores que são comumente combinados a essas técnicas são fibras ópticas, as quais transmitem luz baseados no fenômeno de refletância interna total (RIT) e são feitas de sílica ou plástico [65]. Quando esse fenômeno ocorre, os raios de luz são guiados através do núcleo da fibra com reduzida perda para a vizinhança. A fibra óptica é formada por um núcleo com índice de refração n_1 e um revestimento com índice de refração n_2 bem menor que n_1 . Quando um raio de luz atinge os limites da interface entre esses meios transparentes de diferentes índices de refração e o ângulo de incidência é maior do que o ângulo crítico, será totalmente refletido internamente e propagado através da fibra. Uma pequena porção de luz penetra o meio de reflexão por uma fração de comprimento de onda, o suficiente para o reconhecimento de diferentes índices de refração. Esse campo eletromagnético é conhecido como onda evanescente. Possui intensidade que decai exponencialmente com a distância, começando na interface e estendendo-se ao meio de menor índice de refração, onde estariam as biomoléculas, que interagiriam com a onda dentro da distância de penetração, produzindo uma rede de fluxo de energia através da superfície de reflexão na vizinhança, para manter o campo [66].

Ressonância plasmônica de superfície (SPR) utiliza o espalhamento de luz, em princípio semelhante ao mencionado acima, em que não é necessária a modificação dos sistemas biológicos com marcadores. É um fenômeno óptico causado pela oscilação de densidade de carga na interface de dois meios com constantes dielétricas opostas como um metal e um dielétrico e constantes [67]. Quando a luz em certo comprimento de onda interage com a interface metal-dielétrico a um ângulo definido, há uma combinação da ressonância entre a energia do fóton de luz e o elétron superficial do metal. Dessa forma, a energia do fóton é transferida para a superfície do metal como pacotes de elétrons chamados plásmons e a reflexão de luz do filme metálico será atenuada. Esta ressonância é observada como um mínimo de resposta de refletância de luz quando o ângulo de incidência é variado, pela presença de modificações na superfície do metal,

uma biomolécula e seu complementar [68]. Esquemas de fibras ópticas e de SPR podem ser vistos na Figura 8:

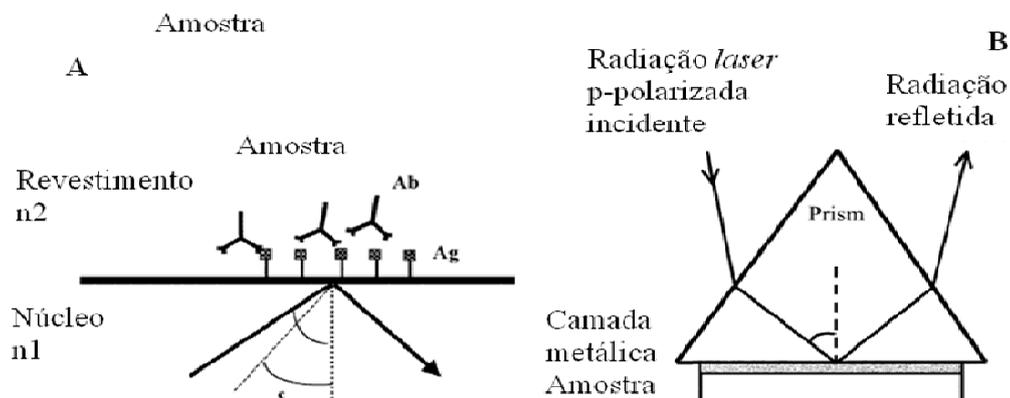


Figura 8: Esquema de funcionamento de uma fibra óptica (A) e da SPR (B) [66].

C. *Transdutores térmicos*

Os transdutores térmicos são utilizados quando nas reações biológicas de interesse ocorre absorção ou liberação de calor. Isto é refletido nas mudanças de temperatura no meio reacional. Dispositivos termométricos mensuram as mudanças em temperatura de um fluido circulante seguindo uma reação sobre o transdutor contendo as biomoléculas imobilizadas. Baseado nos princípios de funcionamento de termômetros convencionais, os transdutores termométricos medem calor a partir de termistores. A liberação de calor total ou absorção é proporcional à entalpia molar e ao número de moléculas de produto criadas na reação bioquímica. Os termistores são resistores com um coeficiente de temperatura de resistência muito baixo. São semicondutores cerâmicos fabricados pela mistura de óxidos de manganês, níquel, cobalto, ferro e urânio. Uma mudança na temperatura é refletida como uma mudança na resistência, melhor descrita pela equação de Steinhart-Hart [69]:

$$1/T=A+B(\ln R)+C(\ln R) \quad (1)$$

$$RT=RT_0e^{(1/T-1/T_0)} \quad (2)$$

Na equação (1), T é a temperatura, $\ln R$ é o logaritmo natural da resistência e A, B e C são coeficientes derivados. Para faixas de temperatura mais estreitas, a equação (2) pode ser empregada, onde RT e R_{T_0} são a resistência de poder zero à temperatura absoluta T e T_0 , respectivamente. B é a constante de material e varia entre 4000 e 5000

K. O coeficiente de temperatura de resistência entre -3 e -5.7 % por °C é obtido [70]. Um esquema de um sensor que envolve a transdução térmica pode ser visto na Figura 9:

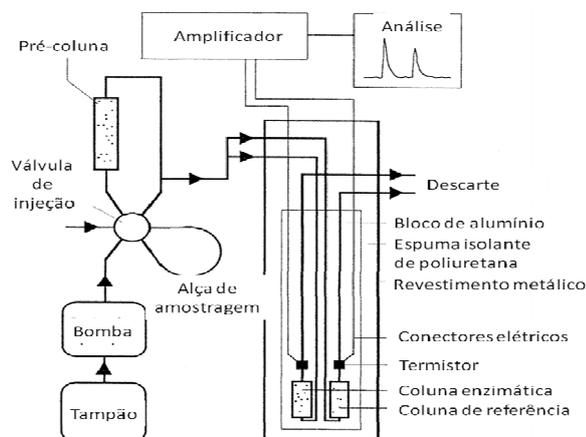


Figura 9: Esquema de um sensor baseado em transdução térmica [70].

Vários tipos de termistores estão disponíveis comercialmente na forma de chips, tendo sido utilizadas para a construção de biossensores. Um exemplo é um dispositivo microfluídico capaz de detectar mudanças de entalpia em tempo real de reações bioquímicas e propriedades térmicas de fluidos biológicos. O dispositivo consiste de uma microtermopilha autônoma integrada com uma câmara de reação de vidro microfluidica [71]. Biossensores foram desenvolvidos para detecção de pesticidas utilizando calorímetro acoplado a sistemas de análise por injeção em fluxo e a enzima esterase de fígado de galinha como componente da camada de reconhecimento [72].

Na área alimentícia e farmacêutica, foram construídos biossensores baseados na calorimetria diferencial de microplacas em que a geração de calor, associada a reação exotérmica entre o ácido ascórbico e a enzima ascorbato oxidase é diferencialmente monitorada entre os poços vizinhos de um circuito integrado construído sobre pastilhas [73]. A detecção de trealose, um aditivo em alimentos, foi realizada através de um microcalorímetro, onde a concentração do analito por meios do receptor colocados no interior do reator calorimétrico é determinada simplesmente via a reação enzimática que ocorre no núcleo do calorímetro com o efeito do calor, revelado diretamente [74]. Foi utilizado também chips de silicone para detecção de aptâmeros e biotina em um calorímetro de fluxo, sendo considerado um dos métodos mais promissores para a detecção de biomoléculas livres de marcadores [75].

D. *Transdutores eletroquímicos*

Os transdutores eletroquímicos são os mais encontrados na literatura [76]. A diversidade de técnicas e materiais dos transdutores, aliadas à facilidade de construção e de mensuração explicam o alto interesse de utilização da eletroquímica como sistema para a construção de biossensores. Eletrodos de diversos materiais tais como: platina, ouro, carbono grafite, carbono vítreo e pasta de carbono são usados para a construção dos dispositivos. Além disso, os sistemas podem ser miniaturizados em eletrodos impressos (*screen-printed*), para serem comercializados, de baixo custo, fácil manuseio, além da mínima quantidade de amostra utilizável, porém mantendo a alta sensibilidade necessária.

As detecções podem ser realizadas com base nas propriedades eletroquímicas das biomoléculas. A presença de grupamentos oxidáveis nas estruturas biológicas pode ser detectada por medidas de corrente e carga. Estas podem ser oxidadas ou reduzidas utilizando voltametrias de pulso, na qual uma faixa de potencial é aplicada e a corrente é medida proporcionalmente à concentração do analito em questão [77]. A partir daí, conhecendo-se o sistema, pode-se realizar uma amperometria, na qual há a aplicação de um potencial fixo, geralmente descoberto por voltametria e a medida de corrente é realizada diretamente em função do tempo. Esse tipo de biossensor é conhecido como amperométrico e é um dos mais encontrados utilizando transdutores eletroquímicos [78]. Biossensores coulométricos baseiam-se no mesmo princípio dos amperométricos, utilizando os valores de carga ao invés de corrente [79]. A presença de pares redox, ou seja, substâncias que apresentam simultaneamente potenciais de oxidação e redução podem ser trabalhadas por voltametria cíclica, na qual, assim como nas voltametrias de pulso, uma faixa de potencial é aplicada, só que como um ciclo, tanto anódico quanto catódico. Isso permite a avaliação das regiões redox das biomoléculas. Assim, após tal estudo, reconhecendo o potencial redox da biomolécula, pode-se realizar uma voltametria de onda quadrada. Nesta, o sinal de redução é invertido e somado ao de oxidação, ampliando o sinal e possibilitando uma detecção mais sensível. Biossensores voltamétricos também são comuns na literatura [80]. Dentre os métodos voltamétricos em eletroquímica, destacam-se a voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial. A primeira, dentre outras funções, normalmente é utilizada para modificação dos eletrodos de trabalho com polímeros e sua caracterização. A segunda costuma ser usada

na construção de sensores. A compreensão do funcionamento de ambas auxilia a entender a importância delas nos estudos mencionados.

a. Voltametria

Quando as técnicas eletroquímicas foram desenvolvidas, eram baseadas em eletrodos de trabalho de mercúrio. Como o mercúrio é um metal líquido, os sistemas utilizavam medidas em gotas e o eletrodo era conhecido como eletrodo gotejante de mercúrio. Surgia a polarografia, por utilizar mercúrio como eletrodo de trabalho. Com o passar do tempo novos eletrodos surgiram pela necessidade de trabalho em regiões de potencial diferentes da qual o mercúrio atuava. Eletrodos sólidos de platina, ouro e carbono (vítreo, grafite) são os mais importantes.

O comportamento eletroquímico completo de um sistema pode ser obtido através de uma série de etapas a diferentes potenciais com a obtenção de curvas corrente-tempo para fornecer uma superfície tridimensional corrente-tempo-potencial. Entretanto, o acúmulo e análise desses dados podem ser tediosos especialmente quando um eletrodo estacionário é usado. Também, não é fácil reconhecer a presença de espécies diferentes de curvas corrente-tempo somente e etapas de potenciais muito pouco espaçadas são necessárias para a derivação de curvas bem resolvidas. Dessa forma, mais informação pode ser adquirida fazendo uma varredura de potencial com o tempo e amostrando a corrente em curvas corrente-potencial diretamente. A mais simples dessas técnicas chama-se voltametria de varredura linear. A voltametria é a técnica onde as informações quantitativas e qualitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas de potencial-corrente, feitas durante uma eletrólise da espécie química em questão contida em uma célula eletroquímica, com a presença de, no mínimo, dois eletrodos, um de trabalho e um de referência. Uma modificação nessa técnica, tornando-a mais completa é a voltametria cíclica. Nela, a varredura de potencial-tempo possui uma forma triangular e não linear, pois o potencial é varrido de um valor inicial a um valor específico e, em um tempo t , o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial. Dessa forma, ambas as contribuições catódicas e anódicas de processos eletroquímicos podem ser avaliadas. Devido a essa técnica apresentar tais características, as informações obtidas são muito úteis para descrever os sistemas com as análises de corrente e potencial de oxidação e redução, concentração das espécies, coeficientes de difusão, área dos eletrodos, cinética das reações, dentre

outros. Nesse sentido, a voltametria cíclica é bastante usada no estudo de formação e caracterização de filmes poliméricos.

Embora bastante úteis para descrever os processos eletroquímicos, a polarografia clássica, voltametria linear ou cíclica não permitem obter resultados de corrente quando a concentração das espécies é menor do que $10^{-4} - 10^{-5} \text{ mol.dm}^{-3}$. Isso ocorre devido à presença da corrente capacitiva, corrente presente em todos os sistemas, originada em fenômenos relacionados à dupla camada elétrica. Essa camada funciona como um capacitor (por isso o nome capacitiva) entre a superfície do eletrodo e a solução logo em contato com essa superfície, devido à diferença de cargas presente nos sistemas. A cada medida de potencial em voltametria, há um carregamento e descarregamento da dupla camada, o que desenvolve essa corrente. As variações da corrente capacitiva (devido à dupla camada elétrica) e corrente faradaica (devido a processos redox), responsáveis pelas reações nos sistemas podem ser vistas na Figura 10:

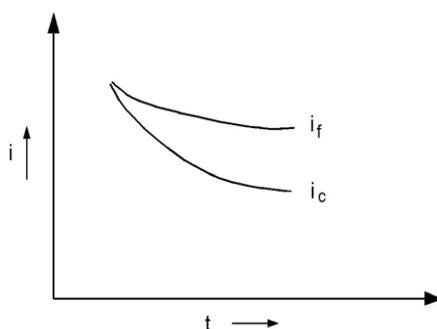


Figura 10: Variação de corrente em função do tempo em voltametria, i_f para corrente faradaica e i_c para corrente capacitiva.

Durante uma eletrólise, as contribuições de ambas as correntes são muito semelhantes no início, porém com uma queda mais acentuada no decorrer da medida na capacitiva. A partir desse conhecimento, foram estudadas maneiras de diminuir a contribuição da corrente capacitiva, objetivo este que se alcançado, promoveria um aumento na sensibilidade da técnica, obtendo-se, assim, valores de corrente em concentrações mais baixas de amostras.

A primeira técnica trabalhada com esse fim foi a polarografia de corrente amostrada, na qual a medida da corrente era realizada perto do final do tempo de vida da gota de mercúrio, onde a contribuição da corrente capacitiva apresenta-se bem menor do que a faradaica, fazendo-se a medida nos últimos mili-segundos da duração da gota.

O potenciostato está ativo em todos os tempos de medida e o potencial é variado linearmente com o tempo ou em etapas pequenas. A importância dessa técnica é a alta razão de corrente faradaica-capacitiva, eliminando o aspecto ruidoso do polarograma, ruídos que interferem com as medidas quantitativas das correntes faradaicas provenientes dos solutos a baixas concentrações.

A sensibilidade é melhorada devido ao esgotamento na região próxima do eletrodo da substância sendo medida e necessariamente reduz seu fluxo para a superfície no tempo de medida real. Embora a técnica de corrente amostrada obtenha valores de corrente apenas durante um pequeno período antes do fim da vida da gota de mercúrio, toda corrente faradaica antes da amostragem é descartada pela técnica. Uma outra técnica, a voltametria de pulso normal foi desenvolvida para eliminar esse efeito por bloquear a eletrólise antes do período de medida. O eletrodo é mantido a um potencial base no qual uma eletrólise desprezível ocorre. Após um período fixo de espera, o potencial é abruptamente alterado por um período de cerca de 50 ms. O pulso de potencial termina pelo retorno ao potencial de base. A corrente é amostrada a um tempo perto do fim do pulso e o processo ocorre novamente com a etapa de potencial aumentando poucos milivolts com cada ciclo adicional. A razão entre as correntes obtidas pela técnica de pulso normal e corrente de amostragem é cerca de 6 devido às diferenças nos tempos de amostragem de corrente. Assim, o aumento esperado da componente faradaica é substancial, preservando inteiramente os melhoramentos na sensibilidade adquiridos na voltametria de amostragem de corrente pela discriminação contra a corrente capacitiva com limites de detecção na ordem de $10^{-6} - 10^{-7} \text{ mol.dm}^{-3}$.

Sensitivities ainda melhores do que as obtidas por voltametria de pulso normal podem ser obtidas com a voltametria de pulso diferencial. Esta técnica apresenta diferenças com a de pulso normal, tais como o potencial de base aplicado não ser constante. Ao invés disso, muda em pequenos incrementos, a altura do pulso é de apenas 10 a 100 mV. Um nível constante em respeito ao potencial de base é mantido e duas correntes são amostradas. Uma imediatamente antes do pulso e outra antes do fim do pulso e o experimento é obtido como uma diferença entre as duas contra o potencial. O nome da técnica é devido ao processo de diferenças entre as duas correntes. O melhoramento da técnica vem, novamente, da maior redução da contribuição da corrente capacitiva. Os melhoramentos na técnica fornecem sensitividades em magnitude melhores do que a voltametria de pulso normal. Limites de detecção menores do que $10^{-8} \text{ mol.dm}^{-3}$ podem ser alcançados [81].

Esses baixos valores são de interesse, dentre outras aplicações, para detecções de biomoléculas em sensores biológicos, cuja finalidade é a análise de amostras em concentrações baixas para identificação de pequenas quantidades de contaminantes em solo, água e alimentos ou diagnóstico em estágios iniciais de doenças.

A presença de biomoléculas também pode alterar o potencial de medida e, a diferença de potencial dada pela equação de Nernst será proporcional ao logaritmo da concentração do analito em questão [82]. Pelo mesmo princípio, biossensores podem utilizar medidas potenciométricas por meios de eletrodos íons-seletivos, como a liberação de íons H^+ , detectáveis por pHmetros comerciais [83]. A presença de biomoléculas sobre a superfície de um eletrodo condutor proporciona uma alteração de valores físicos entre eletrodo e solução de medida, como resistência, capacitância e indutância, que serão proporcionais à concentração do analito. Dependendo do tipo de material estudado sobre a superfície, pode-se escolher a solução de interesse que seja adequada para se obter essas medidas. Isso normalmente é realizado através de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) [84].

b. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

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, $Z = [\Delta E_{sen}(\omega t)]/i$. 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 [85]. 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. Assim, 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 se pode 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). 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 (EFC) e elementos de difusão (T) [86].

Após este breve detalhamento sobre transdutores eletroquímicos sejam eles por medidas de carga, corrente ou potencial, a Figura 11 apresenta um esquema como um resumo das possíveis alternativas em transdução:

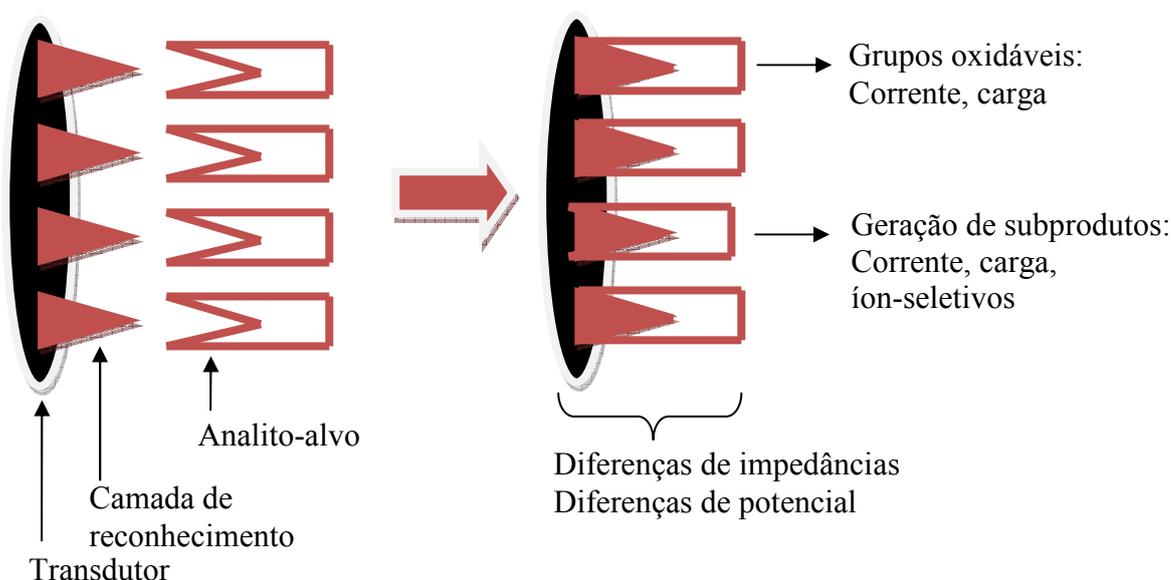


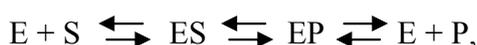
Figura 11: Esquemas de possíveis transduções eletroquímicas.

1.4.2. Camada de reconhecimento

A camada de reconhecimento biológica pode ser constituída principalmente de enzima, antígenos, anticorpos e fragmentos de DNA. Tecidos e micro-organismos também são utilizados, mas em menor proporção com os acima citados, que serão descritos nos tópicos seguintes:

A. Enzimas

Enzimas são proteínas, com exceção de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA, chamadas riboenzimas. Proteínas são polímeros de aminoácidos, em que cada resíduo de aminoácido une-se ao seu vizinho por um tipo de ligação covalente específica. O termo resíduo reflete a perda de elementos de água quando um aminoácido se une a outro. Há 20 aminoácidos diferentes comumente encontrados nas proteínas, assim sendo, nas enzimas como um todo. Estas possuem peso molecular variando entre 12.000 a mais de um milhão de unidades de massa atômica. Algumas não necessitam de grupos químicos para sua atividade a não ser seus próprios resíduos de aminoácidos. Outras necessitam de componentes químicos adicionais chamados co-fatores, tanto com um ou mais íons inorgânicos ou complexos orgânicos ou moléculas metaloorgânicas chamadas coenzimas. E outras necessitam de ambos, co-fatores e coenzimas. Uma lista completa contendo nomes e descrição de centenas de enzimas conhecidas pode ser encontrada no Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular [87]. A catálise enzimática ocorre através dos seus chamados sítios ativos, onde moléculas conhecidas como substratos sofrem ação das enzimas. A superfície dos sítios ativos é alinhada com os resíduos de aminoácidos com substituintes que se ligam ao substrato e catalisam a transformação química. A reação enzimática simplificada pode ser vista como:



onde E é a enzima, S é o substrato, P é o produto, ES é a formação do complexo enzima-substrato e EP o complexo enzima-produto.

Para que a reação de formação dos produtos ocorra, deve-se atingir um nível de energia que ultrapassa uma energia de transição, definida pela energia de ativação do sistema. Quando isso ocorre, a formação dos produtos é favorecida. A enzima não é consumida no processo, apenas catalisa a reação de formação dos produtos, assim, elas são conhecidas como biocatalisadores [88].

O primeiro biossensor desenvolvido utilizou a enzima glicose oxidase para detecção de glicose no sangue, cerca de 36 anos após o isolamento e recristalização da primeira enzima, a urease, em 1926 por James Sumner [89]. A partir desse estudo, vários biossensores utilizando outras enzimas foram estudados, denominados biossensores enzimáticos. O exemplo mais simples de funcionamento desse dispositivo pode ser visto na Figura 12:

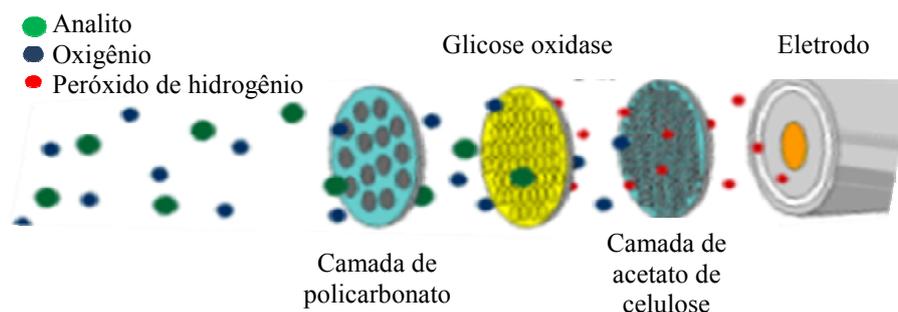
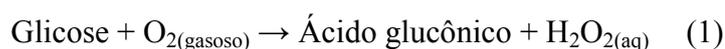
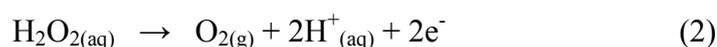


Figura 12: Esquema de um biossensor enzimático [90].

Nesse exemplo, uma amostra de sangue contendo glicose e oxigênio é imobilizada sobre uma superfície de um eletrodo contendo três camadas. Na primeira, feita de policarbonato ocorre a filtragem do sangue, passando apenas moléculas pequenas como a glicose e o oxigênio. Esses alcançam a segunda camada, feita da enzima glicose oxidase, onde a reação enzimática a seguir ocorre:



O peróxido de hidrogênio formado pela reação passa através de uma terceira membrana, feita de acetato de celulose, deixando outras moléculas maiores para trás e entra em contato com o eletrodo de platina, em questão, que através de medidas de oxidação eletroquímica é quantificado, através de seguinte reação:



Grande parte dos estudos envolvendo enzimas ainda são realizados desta maneira. O próprio biossensor para detecção de glicose é estudado até hoje, como em trabalho recente onde eletrodos de carbono grafite foram modificados com o dendrímero poli(amidoamina) contendo nanopartículas de platina encapsuladas que, com cargas positivas foram sintetizados e hibridizados com nanoplaquetas de argila carregadas negativamente. Dessa maneira esperou-se um aumento na estabilidade e na processabilidade, criando um microambiente para a enzima glicose oxidase realizar transferências eletrônicas diretas [91]. A utilização dos biossensores enzimáticos vai além da área médica, sendo construídos para detecção e monitoramento de fármacos, como a utilização da enzima peroxidase imobilizada sobre eletrodos de carbono impressos para a determinação amperométrica de levetiracetam, um anti-convulsivo utilizado para o tratamento de epilepsia [92]; no controle alimentício, como a utilização da enzima xantina oxidase para detecção dos índices de hipoxantina em carne de porco

a diferentes valores de tempo após a morte do animal, avaliando o quão fresco está o produto. A hipoxantina é um produto de degradação pós-morte que se acumula durante o processo de maturação [93]; na análise de pesticidas em solos, como a utilização das enzimas cloroperoxidase e acetilcolinesterase para a detecção de pesticidas fosforotionados construídos sobre eletrodos de grafite impressos [94]. Não apenas detecções baseadas em transdução eletroquímica como também óptica são muito utilizadas [95]. Devido à grande quantidade de enzimas e de substratos existentes, vários exemplos de diferentes estratégias estão sendo estudados. Inclusive a construção de biossensores onde a enzima é o alvo e não a camada de reconhecimento. O estudo realizado recentemente teve como finalidade a detecção da amilase salivar humana através da interação específica com um anticorpo policlonal anti-amilase. As medidas foram realizadas por espectroscopia de impedância eletroquímica sobre eletrodo de carbono grafite modificado com matriz polimérica derivada de poli(4-hidróxi-fenilacético). Medidas de interferente com a enzima lisosima atestaram a boa especificidade do sensor, visto que a resposta se assemelha com o controle [96].

B. Antígenos e anticorpos

Anticorpos são glicoproteínas de formato globular secretadas por linfócitos B que conferem a característica de especificidade da resposta imune humoral adquirida. São formados por duas cadeias polipeptídicas: duas cadeias idênticas entre si denominadas cadeias pesadas e duas cadeias idênticas entre si chamadas cadeias leves. As cadeias leves se ligam às cadeias pesadas por ligações dissulfeto, S-S. Distribuídos pelas cadeias, encontram-se estruturas denominadas domínios, sequências repetitivas de aminoácidos que assumem conformação particular, podendo ser constantes ou variáveis. Os anticorpos são classificados de acordo com o tipo de cadeia pesada que apresentem [isotipos gama (γ), mu (μ), epsilon (ϵ), delta (δ) e alfa (α): γ – IgG (subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), δ – IgD, ϵ – IgE, μ - IgM e α – IgA (subclasses IgA1 e IgA2). As cadeias pesadas de uma molécula de IgG interagem até o fim e, então, se ramificam separadamente com as duas cadeias leves formando uma molécula na forma de um Y. Nas dobradiças de separação, as imunoglobulinas podem ser clivadas por proteases. Clivagem com a papaína libera o fragmento basal chamado Fc devido à sua cristalização imediata e as duas ramificações, chamadas Fab, fragmentos de ligação dos

antígenos. Cada uma das ramificações apresenta um sítio de ligação com antígenos [88]. A estrutura de um anticorpo IgG pode ser visto na Figura 13:

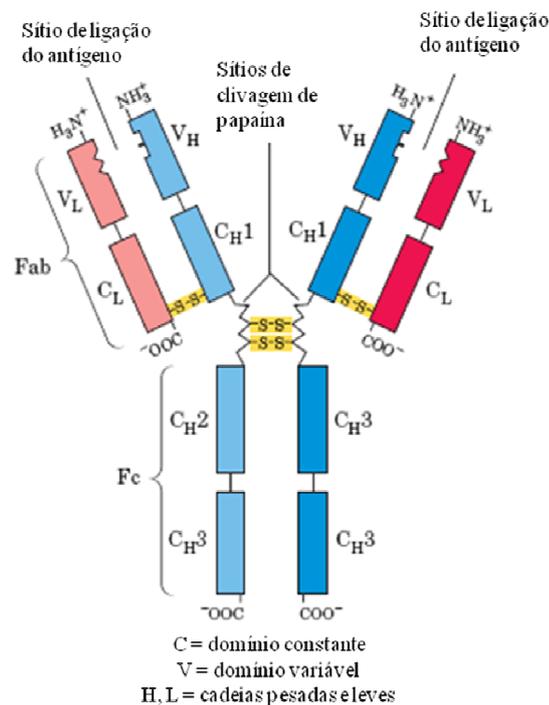


Figura 13: Estrutura da imunoglobulina IgG [88].

Um antígeno é qualquer molécula ou patógeno capaz de provocar uma resposta imunológica. Pode ser um vírus, uma parede celular bacteriana, uma proteína individual ou outra macromolécula. Um antígeno complexo pode ser ligado a um diferente número de anticorpos. Um anticorpo individual ou receptor de célula T se liga apenas à estrutura molecular particular dentro do antígeno, chamado determinante antigênico ou epítopo. Moléculas menores do que 5.000 unidades de massa atômica não são consideradas antigênicas. Entretanto, pequenas moléculas podem se ligar covalentemente a proteínas grandes e induzir uma resposta imunológica. Essas pequenas moléculas são chamadas de haptenos. Anticorpos produzidos em resposta aos haptenos ligados a proteínas se ligarão às mesmas moléculas pequenas quando elas estiverem livres. Esse tipo de situação é realizada para produzir anticorpos para o desenvolvimento de novos testes analíticos. A ligação entre o anticorpo e o antígeno é resultado de ligações químicas entre ambas as moléculas, podendo ocorrer diferentes tipos de interações e diferentes números de ligações. São forças químicas não covalentes reversíveis que regem essa

interação juntamente com as conformações do antígeno e do Fab do anticorpo. A ligação entre anticorpo e antígeno pode ser vista na Figura 14:

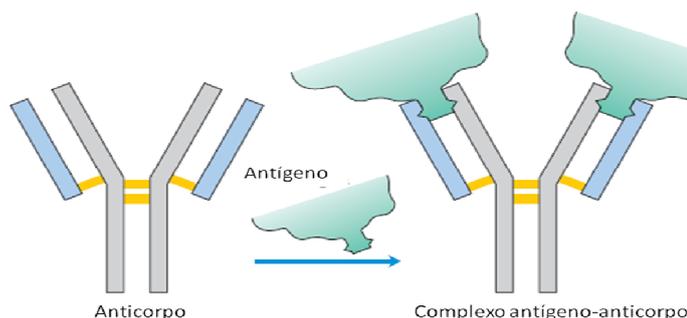


Figura 14: Ligação do anticorpo IgG ao antígeno [88].

Construção de biossensores baseados nas interações antígeno e anticorpos se tornaram importantes, principalmente na área médica, onde está fundamentado o estudo do sistema imunológico. Devido à dificuldade de ambos, antígenos e anticorpos apresentarem respostas eletroquímicas, isto é, variações em corrente e carga, os primeiros imunossensores utilizaram-se de técnicas ópticas e condutimétricas, como pode ser visto em um esquema na Figura 15:

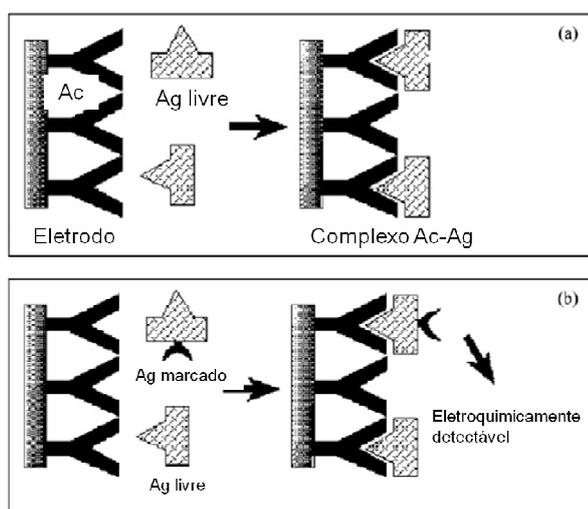


Figura 15: Esquema de funcionamento de um imunossensor: (a) detecção direta por técnicas como SPR e EIE e (b) detecção por marcadores específicos, os quais podem ser ópticos ou eletroquímicos.

Um exemplo desses sistemas é o imunossensor construído para analisar substâncias em amostras de leite utilizando a ressonância plasmônica de superfície. Os

eletrodos de ouro foram modificados com proteínas haptinizadas e anticorpos policlonais para três famílias de antibióticos: fluoroquinolonas, sulfonamidas e fenicóis em seis canais de SPR [97]. Outro caso é do imunossensor para determinação de um herbicida, a atrazina através da imobilização do anticorpo anti-atrazina sobre eletrodos de ouro modificados com polipirrol [98]. Estudos também foram realizados utilizando *cantilevers* para detecção de íons cobre em complexos com EDTA através de anticorpo monoclonal específico e sensível [99] e por microbalança de cristal de quartzo para a detecção de benzo[a]pireno, contaminante de água, ar e solo [100]. A presença de marcadores para detecção de imunossensores é bastante comum como o já comentado teste ELISA, que utiliza interação de anticorpos primários com antígenos e anticorpos secundários marcados com fluoróforos ou enzimas específicas. A nanotecnologia possibilitou o primeiro nanoimunossensor eletroquímico em 2000 [101] baseado em um sistema tipo ELISA. Nele, o anticorpo secundário foi modificado com nanopartículas coloidais de ouro. Na presença de solução de ácido clorídrico, o ouro coloidal foi oxidado e detectado eletroquimicamente através de eletrodo condutor.

C. DNA

O DNA ou ácido desoxirribonucléico é um composto orgânico, um polímero formado por unidades de nucleotídeos, cujo cerne é formado por moléculas de desoxirribose e fosfato unidas por ligações fosfodiéster. A sequência de aminoácidos de cada proteína numa célula e a sequência de nucleotídeo de cada RNA, ou ácido ribonucléico, é especificada por uma sequência de nucleotídeos no DNA da célula. Um segmento de DNA contém informação necessária para a síntese de um produto biológico funcional, visto que para RNA ou proteína, é referido como gene. Uma célula tipicamente contém centenas de genes, e moléculas de DNA tendem a serem grandes. O armazenamento e transmissão da informação biológica é a função conhecida do DNA.

Os nucleotídeos apresentam três componentes característicos. Primeiramente, bases nitrogenadas, divididas em duas classes: purínicas, que compreendem guanina (G) e adenina (A) e pirimidínicas, que compreendem timina (T) e citosina (C). A diferença primária entre DNA e RNA se dá pela presença da base nitrogenada uracila (U) ao invés da timina no RNA. Apenas em raras exceções pode haver timina em RNA e uracila em DNA.

Outro componente é a pentose. Tanto as bases nitrogenadas e pentoses são compostos heterocíclicos e, normalmente, os átomos de carbono são numerados para distinguí-los uns dos outros. Ácidos nucléicos possuem dois tipos de pentoses. As unidades de desoxirribonucleotídeos do DNA contêm 2'-desoxi-D-ribose e do RNA contêm D-ribose. Em nucleotídeos, ambos os tipos de pentoses estão na forma de β -furanose (anéis de cinco membros fechados).

O terceiro componente é o grupo fosfato, presente diretamente nos anéis de ribose. A partir das ligações fosfato, os nucleotídeos interagem covalentemente uns com os outros como “pontes”, na qual o grupo fosfato 5' de uma unidade de nucleotídeo se une ao grupo hidroxila 3' do próximo nucleotídeo, criando a ligação fosfodiéster. Assim, a estrutura covalente dos ácidos nucléicos consiste de resíduos de pentose e fosfatos alternados e as bases nitrogenadas podem ser consideradas como grupos laterais unidos à estrutura a intervalos regulares. As estruturas das bases nitrogenadas, pentoses e fosfato juntamente com os respectivos nomes podem ser vistas na Figura 16:

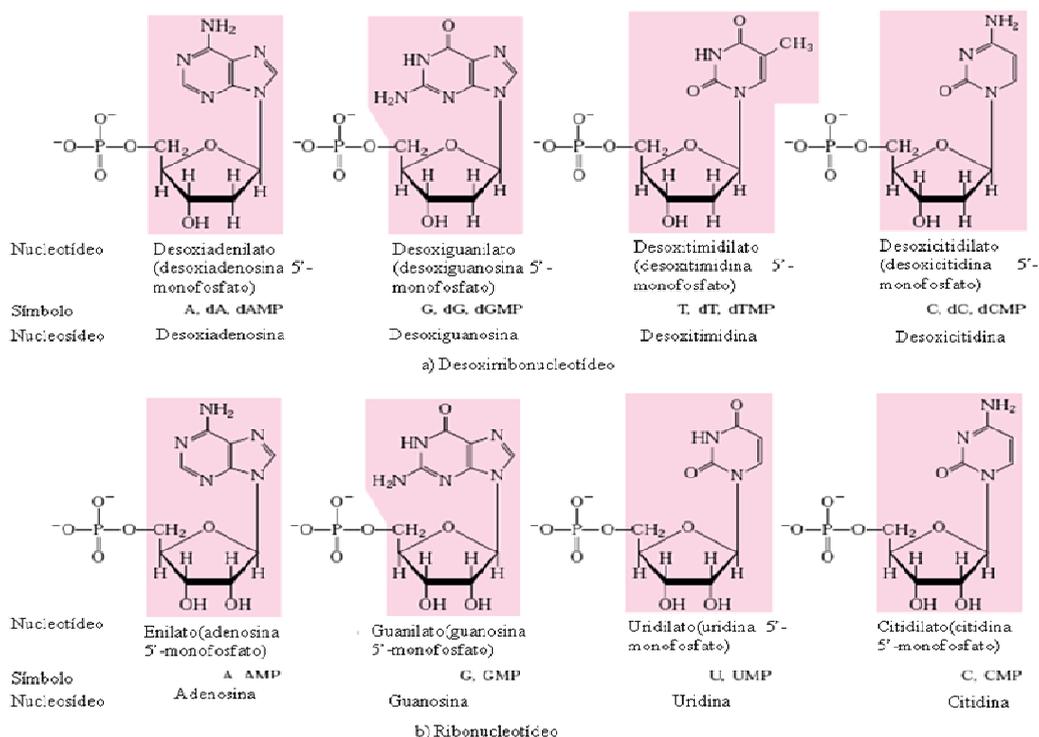


Figura 16: Estruturas de desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos [88].

Ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amino e carbonila permitem uma associação de duas (às vezes três ou quatro) fitas de ácidos nucléicos. Os padrões de ligação mais importantes de ligação de hidrogênio foram definidos por Erwin Chargaff

em 1950 [102], na qual a base nitrogenada adenina se liga especificamente com timina, ou uracila e guanina à citosina. Esse tipo de pareamento de bases predomina no DNA de dupla fita. James Watson e Francis Crick em 1953 [103] postularam um modelo tridimensional que consistia de duas cadeias em forma de hélice de DNA em torno do próprio eixo para formar uma dupla hélice. A estrutura hidrofílica de desoxirribose alternada e grupos fosfato está na parte externa da hélice, em frente à água circundante. As bases purinas e pirimidinas de ambas as fitas estão voltadas para dentro da hélice, com sua estrutura hidrofóbica e quase planar próximas e perpendiculares ao longo eixo. O pareamento das duas fitas cria sulcos denominados sulcos menores e sulcos maiores na superfície da hélice. Cada base de nucleotídeo de uma fita está pareada no mesmo plano com a base da outra fita. Uma ilustração das ligações entre os pares de base e a forma da dupla hélice é mostrada na Figura 17:

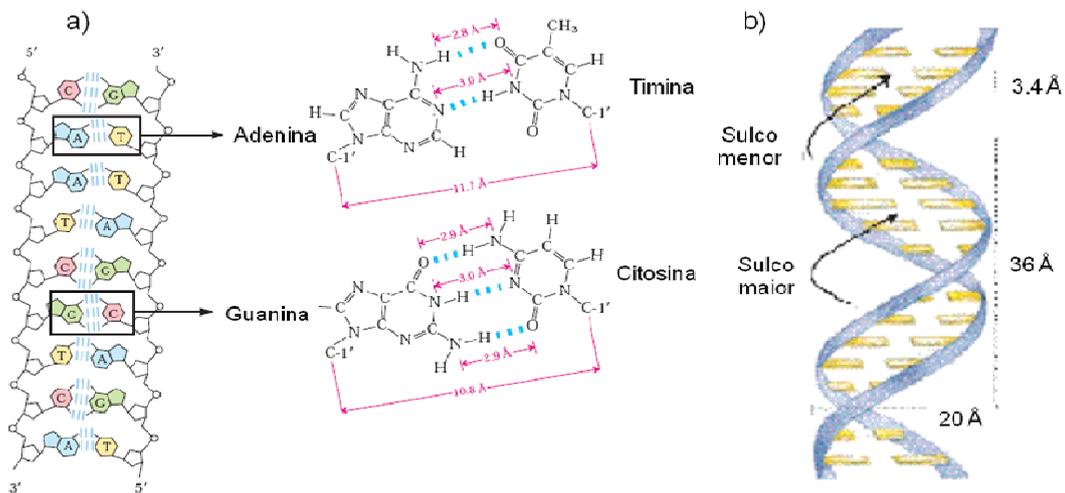


Figura 17: (a) padrão de ligação de hidrogênio nos pares de base e (b) modelo tridimensional para a estrutura do DNA definido por Watson e Crick [88].

Biossensores que utilizam fragmentos de DNA imobilizados em um transdutor são conhecidos como biossensores baseados em DNA ou genossensores. Um genossensor básico é desenvolvido pela imobilização de um oligonucleotídeo [104] de simples fita, produtos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) [105] sobre a superfície de um transdutor para reconhecer a sequência de DNA complementar através de hibridização. Métodos diretos e indiretos são usados para detecção da imobilização de sonda e alvo sobre a matriz. Um esquema de um possível genossensor pode ser visto na Figura 18:

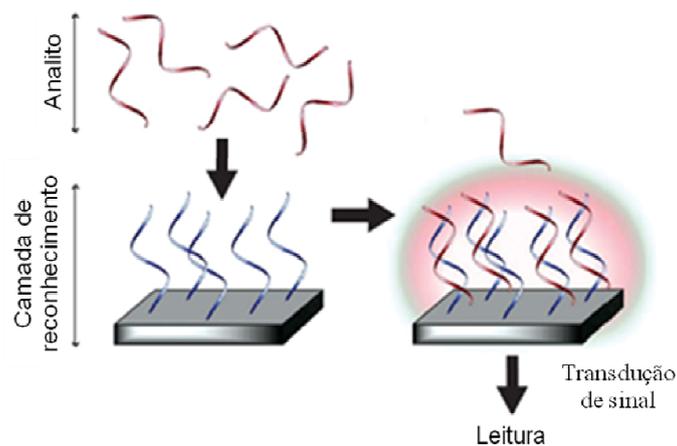


Figura 18: Esquema de um genossensor [106].

A detecção direta baseada na relação de oxidação das bases nitrogenadas do DNA é um ensaio simples [107], mas dependem do comprimento, número de bases oxidáveis e reduzíveis [108], temperatura, conformação [109] e tempo de contato, que pode causar a desnaturação do DNA devido às forças de repulsão entre a superfície do transdutor e os grupos fosfato carregados negativamente [110]. Também, há uma corrente capacitiva significativa em potenciais relativamente altos requeridos para a oxidação do DNA [111].

Assim, foram desenvolvidos métodos indiretos, a fim de se obter uma detecção da hibridização de DNA [106,112] que promovem a modificação das fitas de DNA com marcadores tais como agentes fluorescentes [113] e eletroquímicos [114] no fim de cada fita. Embora eficientes, demandam um custo na síntese e várias etapas de preparação [115], requerendo tempo e possibilidade de perda da reprodutibilidade.

Um método indireto é a detecção usando agentes intercaladores [116,117,118]. A intercalação é considerada o resultado de uma interação hidrofóbica na qual uma molécula aromática é levada ao ambiente hidrofóbico dos pares de base do DNA a partir do meio hidrofílico (normalmente água) [119]. Brometo de etídio (BE), [brometo de (3,8-diamino-5-etil-6-fenil) fenatridina] é um dos mais conhecidos agentes intercaladores, primeiramente sintetizado por Watkins e Woolfe em 1952 [120] como uma alternativa ao tratamento de *Trypanosoma congolense* em gado africano. A estrutura do brometo de etídio pode ser vista na Figura 19:

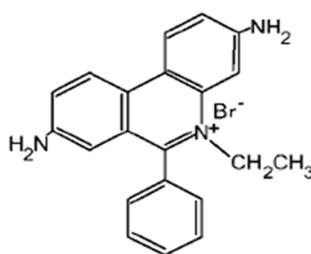


Figura 19: Estrutura do brometo de etídio [121].

Brometo de etídio é extremamente importante, pois age como inibidor da DNA polimerase apresentando efeitos antitumorais [122], propriedades antivirais [123] e inibe a síntese de DNA e a transcrição e translação dos genes [124]. É usado hoje em dia em laboratórios de bioquímica e biologia molecular para visualizar DNA e RNA através de eletroforese de gel de agarose devido à formação de um complexo fluorescente [125,126]. Não há necessidade de mudanças na estrutura do DNA, é um produto barato e o sistema pode ser facilmente construído à medida que a intercalação é imediata [127].

O desenvolvimento de biossensores usando BE sobre DNA tem sido realizado através de meios ópticos e eletroquímicos. Isto é devido às duas propriedades principais envolvendo BE: apresenta aumento na intensidade de fluorescência quando intercalado [128] e é eletroquimicamente oxidável [116].

Mesmo com as grandes promessas do uso de biossensores ópticos, muitos autores têm usado métodos eletroquímicos para estudar as interações de moléculas pequenas com DNA [129,130], incluindo BE [131] devido à praticidade e facilidade do método. BE apresenta eletroatividade, sendo oxidado em torno de +0.70 V (*versus* eletrodo de calomelano saturado). Esta propriedade, juntamente com a interação das duplas fitas do DNA, torna o sistema potencial para construção de genossensores, baseados na detecção indireta da hibridização através da oxidação de BE. Fang *et al.* [116] estudaram a detecção de hibridização de BE através de voltametria cíclica sobre eletrodos de grafite funcionalizados com grupos amino. Oligonucleotídeos curtos (24 pares de base) foram covalentemente inseridos através de ligações fosfordiamidas entre o fim 5' do oligonucleotídeo e o grupo amino do eletrodo de grafite. Zhang *et al.* [131] usaram nanotubos de carbono funcionalizados com ácidos carboxílicos e uma pasta foi preparada usando óleo mineral. Também, oligonucleotídeos foram usados (32 pares de base) e eles foram imobilizados sobre a pasta de carbono através de oclusão

usando eletropolimerização de polipirrol. A detecção foi realizada por voltametria de pulso diferencial. Nos dois casos, a hibridização foi seguida pela imersão em solução contendo BE e sua oxidação foi medida eletroquimicamente. Outra análise usando o mesmo princípio, foi estudada usando espectroscopia de impedância eletroquímica [132], voltametria AC sobre eletrodos de mercúrio de gota pendente [133] e por voltametria de redissolução adsortiva no modo de pulso sobre eletrodos de pasta de carbono [134].

1.4.3. Imobilização da camada de reconhecimento sobre o transdutor

A etapa crucial para o desenvolvimento de um biossensor é, sem dúvida, a imobilização da camada de reconhecimento ao transdutor. Existe uma grande variedade de procedimentos nos quais as imobilizações podem ocorrer. Contudo, das várias vertentes em imobilização, os sistemas podem ser resumidos em quatro grandes técnicas, na qual todos os experimentos são baseados, como podem ser vistos na tabela 2, abaixo:

Tabela 2: Métodos de imobilização convencionais

<i>Técnica</i>	<i>Vantagens</i>	<i>Desvantagens</i>	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.	Ramanathan [135]
Oclusão	Confinamento físico do biocatalisador próximo ao transdutor. Baixo custo.	Alta barreira de difusão.	Gambhir [136]
<i>Cross-linking</i>	Perda do biocatalisador é mínima. Custo moderado.	Tratamento extensivo do biocatalisador por produtos químicos interferentes.	Chaubey [137]
Ligação covalente	Baixa resistência difusional. Estável sobre condições adversas	Tratamento por produtos químicos tóxicos. A matriz não é regenerada.	Ramanatham [138]

As técnicas são estudadas de diferentes maneiras na área de desenvolvimento dos biossensores. Quão melhor ou mais fáceis forem as imobilizações, maior a probabilidade de sucesso no funcionamento dos dispositivos. Uma alternativa para o melhoramento é a modificação da superfície do transdutor com polímeros condutores que apresentem em suas estruturas grupos funcionais que possam interagir com grupamentos específicos das biomoléculas.

1.5. Polímeros condutores aplicados em biossensores

Os polímeros são macromoléculas formadas a partir de ligações covalentes de unidades, chamadas monômeros, que se repetem ao longo da cadeia em formação e são caracterizados por seu tamanho, sua estrutura química e interações intra e intermoleculares [139]. Eles podem ser naturais, como a seda, a celulose, as fibras de algodão, etc., ou sintéticos, como o polipropileno, o poli(tereftalato de etileno), o polietileno, o poli(cloreto de vinila), etc. Os polímeros são classificados como termoplásticos (plásticos), termofixos, borrachas e fibras [140]. A formação de um polímero sintético se dá através de várias etapas e de diferentes maneiras. Podem ser polímeros de adição e condensação. Os polímeros de adição são formados por monômeros iguais que apresentam pelo menos uma dupla ligação, a qual é rompida para que ocorra a reação de adição. A iniciação da formação do polímero pode ocorrer em meio ácido, básico ou através de radicais, onde há a formação de cargas ou radicais na estrutura monomérica responsável pelo ataque a outra estrutura monomérica neutra. Por isso, há a necessidade da baixa concentração dos iniciadores, para que a próxima etapa, a de propagação, ocorra. Assim, a probabilidade de ataque de uma estrutura a outra em uma reação em cadeia é possível. Em um determinado ponto da propagação, ocorrerá a terminação, onde duas estruturas monoméricas modificadas podem se unir formando um dímero neutro, ou atacar a ponta de um polímero em formação, cessando seu crescimento. Os polímeros de condensação são formados geralmente pela reação entre dois monômeros iguais ou diferentes, com eliminação de moléculas pequenas, por exemplo, água. Para que um polímero linear ocorra, os monômeros devem ser bifuncionais para que a reação se estenda, como por exemplo, o nylon, polímero de condensação formado pela condensação de uma diamina e um diácido carboxílico ou de um único monômero contendo um grupo amino e um ácido em cada extremidade [141].

A formação de polímeros pode ser iniciada eletroquimicamente. Até a década de 70, os polímeros eram conhecidos por suas características passivantes. Porém, em 1977, pesquisadores trabalhando com poliacetileno, descobriram que através de dopagem com vapores de cloro, bromo ou iodo a condutividade do polímero aumentava cerca de 10^9 vezes do que era inicialmente sem a dopagem, com um valor de 10^5 Siemens por metro, valor semelhante ao dos metais, conhecidos condutores [142]. Por esse estudo, os pesquisadores receberam o prêmio Nobel de Química em 2000 [143] e uma nova área na ciência foi criada, a dos polímeros condutores. Dentre os principais polímeros condutores estudados até hoje estão a polianilina, o poliacetileno, o polipirrol e o politiofeno, como pode ser visto na Figura 20:

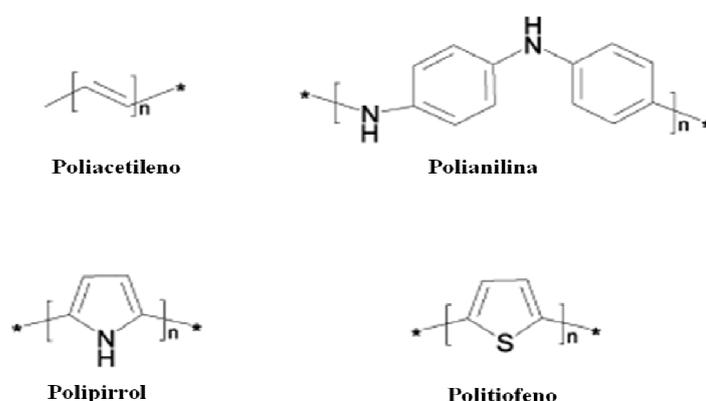


Figura 20: Estrutura de polímeros condutores [144].

A condutividade dos polímeros ocorre devido à presença de duplas ligações conjugadas ao longo da estrutura polimérica. Em conjugação, as ligações entre os átomos de carbono são alternadas em duplas e simples. Toda ligação contém uma ligação sigma localizada, a qual constitui uma forte ligação química. Além da conjugação, a presença de dopantes é necessária e essencial para a condutividade (senão, o poliacetileno seria condutor apenas com sua formação). O funcionamento da dopagem é baseado no princípio de semicondução. A capacidade do semicondutor de transportar corrente elétrica pode ser ampliada: pela adição de elétrons na banda de condução, um semicondutor tipo n, n de negativo, pois há um excesso de elétrons; e pela remoção de elétrons da banda de valência, um semicondutor tipo p, p de positivo, devido à presença de “buracos”, com carga positiva [145]. Eletrodos de diamante dopados com boro são exemplos de semicondutores tipo p, pois o boro, pertencente ao

grupo 13 da tabela periódica, remove um elétron do carbono, do grupo 14, acima, deixando os “buracos” no semiconductor [146].

Os monômeros utilizados para eletrossíntese de polímeros condutores são geralmente compostos aromáticos, como ilustrados na Figura 20. Isto é devido à facilidade com que esses compostos podem ser oxidados a cátions-radicais relativamente estáveis. O acoplamento de dois cátions-radicais ou um radical com o monômero, e sucessiva remoção de dois prótons resulta na formação de um dímero [147]. Um exemplo para essa reação é a polimerização da anilina, mostrada no esquema da Figura 21:

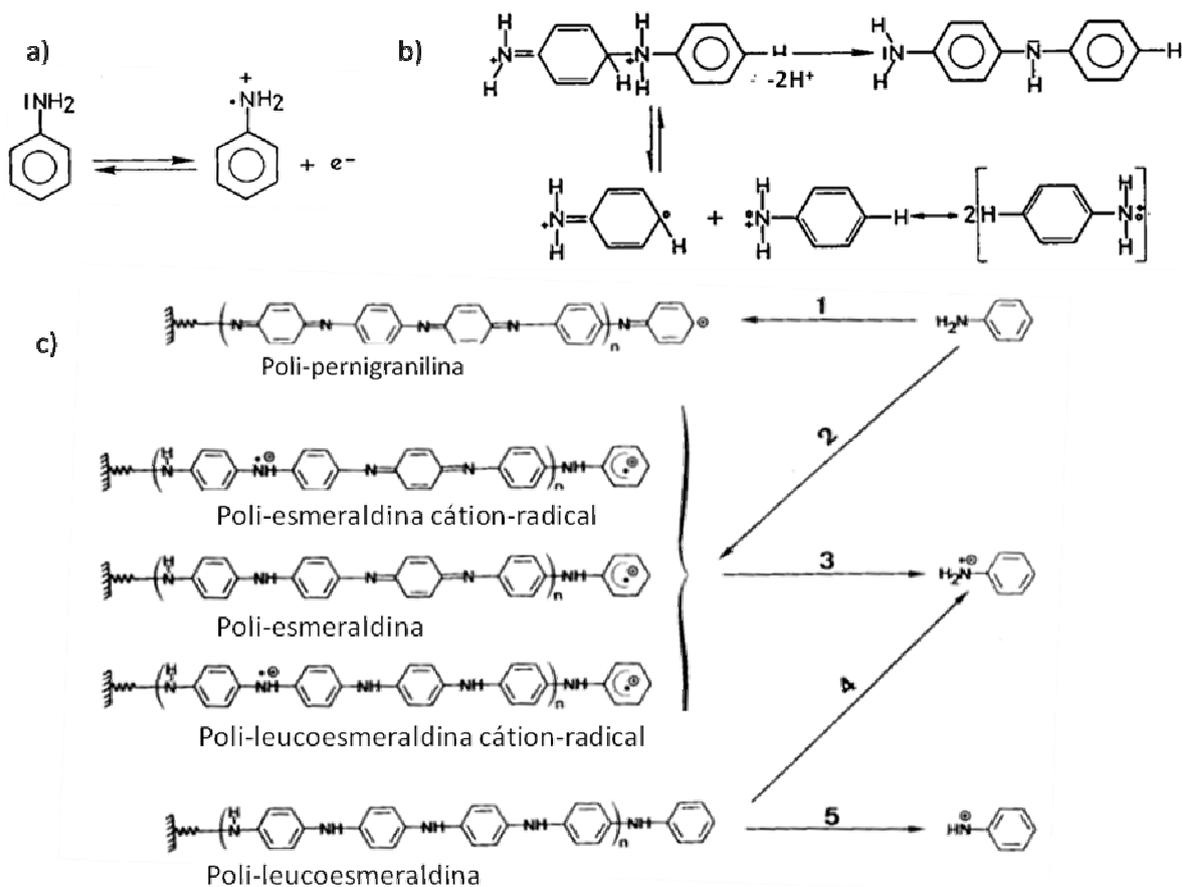


Figura 21: Polimerização eletroquímica da anilina: (a) oxidação da anilina e formação de cátion-radical com perda de um elétron, (b) rearranjo e acoplamento de dois cátions-radicais para a formação do dímero *p*-aminodifenilamina e (c) possíveis caminhos de reação para a oxidação da anilina para formar o polímero, onde 1 e 2 são adições nucleofílicas do monômero, 3 é adição radicalar e 4 e 5 adições eletrofílicas de duas formas oxidadas do monômero [148].

Esta reação envolve a oxidação do monômero e a formação de cátions-radicais inicialmente no átomo de nitrogênio com a perda de um elétron. Ocorre ressonância no anel devido à presença do cátion-radical e acredita-se que a posição preferencial para ataque seja em posição *para*, através de uma EQE, reações eletroquímicas-químicas-eletroquímicas rápidas [149], formando um dímero intermediário, *p*-aminodifenilamina, (PADPA). A posterior oxidação do dímero e acoplamento produz oligômeros, os quais são solúveis em eletrólitos e eletroativos para polimerização. O aumento das cadeias dos oligômeros através dos mesmos processos resulta no polímero final. À medida que as cadeias de oligômeros crescem o suficiente para formar a estrutura polimérica, se tornam insolúveis e são depositadas na superfície dos eletrodos de trabalho. No caso da polianilina, o processo que ocorre após a oxidação do PADPA pode seguir diferentes caminhos de reação, como ilustrados na Figura 20c. Esses mecanismos de ataque simplificados mostram claramente a importância da reatividade da anilina e pode ser vista pelas diferentes sequências de reação, passando da forma completamente reduzida leucoesmeraldina, para a forma mais estável que contém o mesmo número de grupos oxidáveis e reduzíveis, esmeraldina e a forma completamente oxidada, pernigranilina. Como foi discutido anteriormente, a presença de duplas ligações conjugadas não são o suficiente para apresentar condutividade. Há a necessidade de dopagem. Isso pode ser visto nas duas formas intermediárias, sais de esmeraldina e pernigranilina na Figura 20c.

Durante a protonação do polímero presente na forma de esmeraldina, os cátions se envolvem em reações de desproporcionamento formando cátions-radicais de semiquinonas, os quais são responsáveis pelo subsequente aumento na condutividade [148].

Matrizes poliméricas condutoras [150] e não-condutoras [151] eletrodepositadas sobre a superfície do material de reconhecimento podem aumentar a transdução do sinal de hibridização de um genossensor devido às suas características favoráveis, tais como: resistência mecânica dos filmes poliméricos formados, facilidade no controle de formação (quantidade, espessura do filme), estabilidade ao ambiente e em soluções aquosas, condutividade elétrica, proteção do eletrodo de adsorção de analitos não específicos e a presença de grupos funcionalizados em sua estrutura podendo facilitar a interação com o alvo desejado.

A eletroquímica apresenta propriedades interessantes sobre os outros sistemas de medidas devido à detecção dos analitos de interesse utilizando biossensores

eletroquímicos ser rápida, simples e de baixo custo, além de servir para medir os eventos de hibridização usando-se um intercalador eletroativo [152].

Filmes poliméricos derivados de monômeros aromáticos funcionalizados, eletrodepositados em eletrodos condutores têm sido uma das principais atividades do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia (LAFIP/Nanotec), juntamente com sua utilização no estudo de imobilizações de oligonucleotídeos e produtos de PCR. Dentre eles estão o estudo de eletropolimerização de 4-aminofenol [153], 3-aminofenol [154] e tiramina [155]; estudos de imobilização de bases nitrogenadas de DNA sobre aminofenóis [156,157,158] e 4-metóxi-fenetilamina [118]; estudo da eletropolimerização e imobilização de estruturas de DNA utilizando ácido 4-hidroxi-fenilacético [159,160] e ácido 3-hidróxi-fenilacético [161]. Todos apresentam estabilidade e interações com os materiais biológicos trabalhados. Um dos polímeros com grande possibilidade de ser utilizado como matriz pra a construção de biossensores é o derivado do monômero 3-aminofenol.

1.5.1. 3-aminofenol

Um dos primeiros estudos envolvendo a polimerização de 3-aminofenol foi descrita por Prater [162] em 1973, dentre diversos derivados de anilina, em solução de acetonitrila. Informações em trabalhos mais específicos sobre esse polímero foram obtidas sobre eletrodo de trabalho de platina em soluções de acetonitrila e metanol na presença de perclorato de sódio [163], com uma sequência de estudos publicada referente às características dos solventes e solução em cinética e mecanismo de polimerização [164]. O polímero foi formado em ambas as soluções e apresentou-se insolúvel na maioria dos solventes, porém foi solubilizado em ácido nítrico e dimetil sulfóxido. Devido às propriedades passivantes do polímero, ele foi dissolvido e disperso em folhas de cobre para estudos de corrosão. O estudo realizado em sequência por Sankarapavinasam [165] focou nas características do polímero, onde foi constatada a baixa eficácia em corrosão em aplicações em longo prazo devido à sua possível estrutura. Isso foi comprovado por estudos em aço inoxidável em solução de cloreto de sódio por espectroscopia de impedância eletroquímica [166] na tentativa de utilizar o polímero para inibição de corrosão, além do polímero formado em meio de cloreto de potássio a pH neutro, estável em solução de ácido sulfúrico, porém rapidamente

degradado em meio de hidróxido de sódio [167]. O mesmo autor escolheu o poli(3-aminofenol) após um estudo dentre outros polímeros *meta* substituídos através de voltametria, cálculos teóricos e espectroscopia de raios-X [168]. Espectroscopia de infravermelho foi realizada com os polímeros solubilizados e esses estudos sugerem que a polimerização ocorre no grupo –OH, embora publicações, através de estudos espectroeletróquímicos sobre eletrodo de platina contrastam com essa informação [169], onde o início do mecanismo proposto ocorre pelo grupo –NH₂.

Apesar de não apresentar alta condutividade, poli(3-aminofenol) foi utilizado na construção de biossensores. Nakabayashi *et al.* [170] utilizou este polímero para construção de um biossensor de glicose amperométrico. Dentre vários polímeros analisados, o poli(3-aminofenol) foi o que apresentou melhores respostas. O sensor foi construído sobre pasta de carbono modificada com ferroceno. A enzima glicose oxidase foi diluída em tampão contendo 3-aminofenol e foi imobilizada na superfície do eletrodo por oclusão durante a eletropolimerização do monômero. Porém o eletrodo construído não apresentou muitas melhoras na seletividade, visto que a resposta dos interferentes ácido úrico e ácido ascórbico foi relativamente alta. Para contornar esse problema, dois anos após essa publicação, os autores publicaram um trabalho sobre a construção de um biossensor amperométrico para detecção de peróxido de hidrogênio baseado na imobilização da enzima *horseradish peroxidase* [171]. O sensor foi construído de três maneiras diferentes sobre pasta de carbono e a melhor foi aquela que imobilizou ferroceno e a enzima juntamente com a pasta de carbono. Esse sensor foi utilizado para detecção de glicose com base no fato da reação enzimática produzir peróxido de hidrogênio, detectável pelo sensor construído. Assim, glicose foi adicionada no biossensor logo após a imersão de glicose oxidase sobre o mesmo. A produção de peróxido de hidrogênio por essa reação foi detectada diretamente pelo biossensor amperométrico baseado na enzima *horseradish peroxidase*. O resultado mais importante foi a ausência da interferência de ácido úrico e ácido ascórbico na resposta do biossensor. Fung *et al.* também em 2000 [172] construíram um imunossensor piezoelétrico para detecção da bactéria *Salmonella enteritidis*. O polímero foi formado sobre a superfície de um cristal de quartzo recoberto com ouro. O grupo funcional –OH supostamente presente na superfície do eletrodo foi ativado com divinilssulfona para facilitar na imobilização do anticorpo específico para a detecção. Após as etapas de lavagem, a bactéria foi imobilizada sobre a superfície, esperando a interação com o

anticorpo. Diferenças nos valores de frequência foram analisadas. A diminuição de frequência (aumento de massa) indicou a funcionalidade do sensor.

1.6. Estudo da interação de DNA de *Calf Thymus* e Brometo de Etídio

As interações entre DNA e BE vão além da detecção de hibridização sobre um transdutor. Estudos utilizando um padrão, DNA de *Calf Thymus* (timo de bezerro) juntamente com as propriedades do BE, tornam possível avaliar o efeito de outras drogas intercalativas em potencial. Ressonância Plasmônica de Superfície foi utilizada para avaliar e comparar as constantes de ligação entre BE junto com outras drogas e DNA de *Calf Thymus* [173]. Biossensores de DNA em arranjos baseados em derivados sol-gel podem efetivamente detectar naftaleno e fenantreno em águas e amostras biológicas [174], além de estudos de competição entre DNA e BE com dibenzofurano [175] e sanguinarina [176].

Apesar de menos difundida em comparação com métodos eletroquímicos, as propriedades ópticas do BE têm sido usadas na construção de biossensores. Krull *et al.* [177] desenvolveram fibras ópticas feitas de sílica fundida modificada para promover a imobilização covalente de simples fitas de DNA e a hibridização foi detectada através da intercalação de BE usando fluorescência de reflexão interna total (FRIT), o mesmo sinal obtido usando análise por injeção em fluxo acoplado com um biossensor de onda evanescente [178]. Também, fibras ópticas de quartzo funcionalizadas foram usadas para imobilização de oligonucleotídeos e a intensidade de fluorescência foi obtida a partir da intercalação de BE sobre a dupla fita de DNA [179]. Recentemente, transferência de energia ressonante por fluorescência (TERF) foi usada para detectar hibridização através de oligonucleotídeos marcados com pontos quânticos e fluoróforos. BE foi usado para aliviar adsorções não específicas, mostrando um aumento de 10 vezes de um sinal complementar em relação a um não-complementar [180].

Vardevanyan *et al.* [181] estudaram a interação de DNA de *Calf Thymus* com BE, eletroquimicamente, através de voltametria de pulso diferencial para se encontrar as constantes de ligação e o número de sítios para interações fracas e fortes entre eles. Embora os autores negligenciem os efeitos de exclusão da vizinhança, no qual a ligação de uma molécula da droga em um sítio influencia a ligação da molécula subsequente, tanto por bloqueio físico quanto alteração estérica no DNA [182], eles conseguiram

realizar uma titulação de BE com DNA para obter respostas eletroquímicas com a adição de DNA. Desse modo, observaram um decréscimo no sinal de oxidação devido ao decréscimo do BE livre para se oxidar na superfície do eletrodo.

Os experimentos realizados através de fluorescência e de voltametria são úteis para construção de biossensores. Porém, mesmo com essas duas poderosas técnicas, não há um estudo comparativo ou o melhor uso da intercalação à medida que as proporções entre DNA e BE podem ser maximizadas para melhorar a sensibilidade. Conhecendo as melhores condições para uma intercalação máxima de BE e DNA de *Calf Thymus*, é possível se detectar qualquer mudança na resposta óptica e eletroquímica realizada por um agente no qual se deseja conhecer capacidades intercalantes.

Novos intercalantes são uma necessidade na medicina, pois possuem ação quimioterápica antineoplásica, sendo usados como fármacos no tratamento de câncer por quimioterapia. A intercalação geralmente altera a estrutura do B-DNA, com o aumento no espaçamento dos pares de base CG [183]. Como os agentes quimioterápicos não são específicos, atuam tanto em células malignas quanto normais, o que causa os efeitos colaterais do tratamento. Os benefícios devem ser maiores do que a toxicidade do tratamento, pois o corpo se recupera dos efeitos colaterais, mas o nível de fármacos não deve ser terapêuticamente desfavorável [184].

Estudos envolvendo o desenvolvimento de drogas intercalantes descrevem uma série de experimentos que incluem a absorção, fluorescência, dicroísmo circular e dicroísmo linear, envolvendo etapas de aquecimento do DNA em junção com o agente intercalante em questão, titulações, além de outros procedimentos dispendiosos [185]. Sabendo das propriedades ópticas e elétricas do BE em relação ao DNA, ao se construir um modelo através de métodos de otimização, especificamente, ao se construir um planejamento fatorial, pode-se obter uma condição máxima favorável, onde qualquer alteração na resposta analítica seria atribuída à interação do agente intercalante a ser analisado, em competição com o BE.

Para se realizar esses estudos foi utilizada voltametria de pulso diferencial como técnica eletroquímica e medidas ópticas, devido às suas propriedades intrínsecas com a luz. Espectroscopia de absorção e espectroscopia de fluorescência foram utilizadas. Para isso, uma breve introdução sobre as duas deve ser realizada.

1.6.1. Espectroscopia de absorção e de fluorescência

Luminescência é a emissão de luz de uma substância e ocorre a partir de estados excitados eletronicamente. Luminescência é dividida em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. Em estados singletes, o elétron no orbital excitado está pareado (com os spins opostos) com o segundo elétron em um orbital no estado fundamental. Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente por emissão de um fóton (fluorescência). A taxa de emissão de fluorescência é tipicamente 10^8 s^{-1} , e o tempo de vida na fluorescência é cerca de 10 nanossegundos. O tempo de vida de um fluoróforo é o tempo médio entre seu estado excitado e o seu retorno ao estado fundamental. Devido a curta escala de tempo de fluorescência, medidas de emissão em tempo resolvidas requerem equipamentos ópticos e eletrônicos sofisticados. Apesar das dificuldades experimentais, fluorescência em tempo resolvido é amplamente praticada devido à grande quantidade de informação disponível nos dados, quando comparado com medidas estacionárias ou em estado fundamental.

Fluorescência tipicamente ocorre em moléculas aromáticas. Alguns dos fluoróforos típicos incluem a fluoresceína, quinina e acridina. Dados dos espectros de fluorescência são geralmente apresentados como espectros de emissão. Um espectro de emissão é um gráfico de intensidade de fluorescência contra comprimento de onda, medido a um único comprimento de onda de excitação. Já o espectro de excitação é a dependência da intensidade de emissão medida a um único comprimento de onda de emissão sobre o comprimento de onda de excitação. Os espectros variam amplamente e são dependentes da estrutura química do fluoróforo e do solvente no qual está dissolvido [186].

O processo que ocorre entre a absorção e emissão de luz normalmente é ilustrado por um diagrama de Jablonski, como pode ser visto na Figura 22:

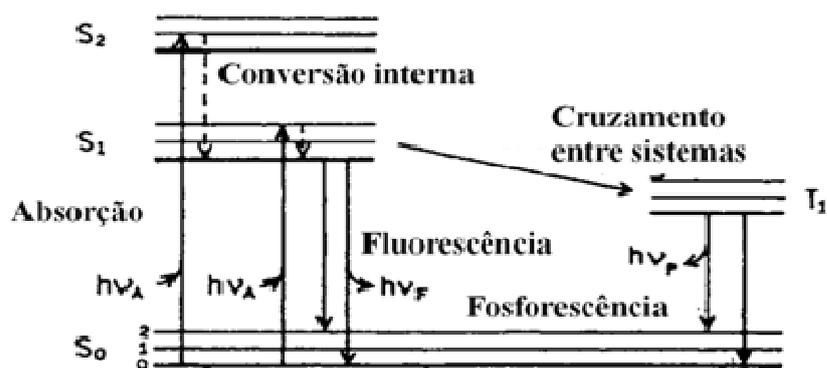


Figura 22: Diagrama de Jablonsky [186].

Em qualquer situação de análise, o composto deve absorver uma quantidade de luz para promover as transferências de energia. A espectroscopia de absorção é uma das mais utilizadas, medindo a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda. É baseada na lei de absorção, também conhecida como lei de Lambert-Beer, que permite dizer quantitativamente como a grandeza de atenuação depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção. À medida que a luz atravessa um meio contendo o analito que absorve, um decréscimo na intensidade ocorre na proporção que o analito é excitado. Para uma solução do analito de determinada concentração, quanto mais longo é o comprimento do caminho do meio através do qual a luz passa, caminho óptico, mais centros absorventes estarão no caminho e maior será a atenuação. Para um dado caminho, quanto maior a concentração de absorventes, mais forte será a atenuação. As medidas são feitas através de transmitância, a fração da radiação incidente transmitida pela solução, sendo normalmente expressa em valores de porcentagem. A absorbância está relacionada com a forma logarítmica da transmitância. De acordo com a lei de Beer, a absorbância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente c e ao caminho óptico b do meio absorvente, segundo a equação abaixo:

$$A = abc,$$

onde A é a absorbância, b o caminho óptico (cm), c a concentração ($\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$). A constante a é chamada de coeficiente de absorvidade molar (ϵ), característica de cada espécie [187].

Durante os últimos anos, avanços nos estudos sobre DNA envolveram diretamente medidas ópticas incluindo absorção e fluorescência. Tais métodos são utilizados hoje para seqüenciamento de DNA, detecção de hibridização e quantização de

produtos de PCR, além de estudos para melhor compreensão dos eventos envolvendo DNA e seus derivados [186]. Os estudos da interação de DNA com BE produzem uma grande quantidade de resultados cuja análise individual pode ser tediosa, além da confusão na interpretação de dados, podendo ocorrer erros nas análises. Métodos de otimização podem ser aplicados a esses sistemas, onde um modelo com uma quantidade menor de experimentos pode ser construído e os resultados apresentados de forma confiável e prática.

1.7. Métodos de otimização em Química

Os métodos de otimização surgiram com a necessidade de descrever em termos matemáticos ou regras a complexidade dos sistemas que ocorrem na prática. Muitos sistemas são representados por modelos que mudam com o tempo ou por parâmetros que variam ao acaso. Portanto, por diversas razões os conceitos teóricos podem ser imperfeitos, ainda que possam ser utilizados para prever as condições ótimas de operação para um sistema. No entanto, a teoria pode somente prever se um sistema está próximo de ótimo desejado, mas nem sempre este ótimo é alcançado.

Otimização pode ser definida como sendo um “processo coletivo em busca de uma série de condições de tal forma que o melhor resultado de uma dada situação seja alcançado”. A otimização pode ser dividida em estágios que se caracterizam por: decisão da função objetivo (resposta); determinação dos fatores (variáveis) que representam influências significativas sobre a resposta que se deseja otimizar; otimização propriamente dita, isto é, procurar a combinação dos valores dos fatores selecionados que resultem na melhor resposta. Dentre as atividades habituais que os químicos se defrontam, estão o desenvolvimento de métodos analíticos e melhoramento ou adaptação dos métodos já estabelecidos, acerto de vários parâmetros instrumentais até que a resposta ótima seja escolhida pelo ajuste perfeito dos instrumentos analíticos e ajuste dos dados experimentais onde as variáveis são ajustadas até que os valores calculados, segundo o modelo, estejam o mais próximo possível dos experimentais.

Atualmente, a química dispõe de estratégias para a otimização que podem ser empregadas separadamente, na sua forma básica ou modificada, ou em conjunto, onde uma complementa a outra, entre as quais podemos citar: método univariado, método

simplex, método planejamento fatorial, análise de superfície de resposta e estudo de misturas.

O método planejamento fatorial é classificado como do tipo simultâneo e é utilizado para selecionar as variáveis que realmente apresentam influências significativas na resposta. Também nos permite saber se uma variável apresenta um efeito positivo ou negativo na resposta quando o valor da variável passa de um nível para o outro, e se as variáveis são independentes ou apresentam interações. Além disso, o planejamento fatorial pode ser utilizado não só para localizar o ótimo como também pode obter a superfície de respostas para um sistema estudado [188].

2. Objetivos

A detecção de doenças tais como câncer de próstata e hepatite C, nos estágios iniciais, é de extrema importância, visto que as plataformas diagnósticas existentes não apresentam especificidade e sensibilidade elevadas, podendo haver reações cruzadas com outros tipos de doenças e respostas positivas em indivíduos curados [189], além de serem realizadas em laboratório, com a necessidade de profissionais especializados e instrumentação de alto custo. Dentro deste contexto, há a necessidade de um método rápido, seletivo, específico, sensível e de fácil manuseio, características encontradas nos biossensores.

A possibilidade de se utilizar as propriedades do brometo de etídio com DNA torna um processo de otimização para ambos uma ferramenta extremamente útil na descoberta de novos fármacos com caráter intercalante, pois a utilização de um procedimento padrão facilitaria as condições experimentais dos estudos clínicos.

O objetivo deste projeto é o desenvolvimento de genossensores e imunossensores eletroquímicos para a detecção do câncer de próstata e do VHC construídos sobre matrizes suporte, formadas por eletrodos condutores modificados com filmes eletropolimerizados derivados de aminofenóis, bem como a construção de planejamentos fatoriais utilizando respostas espectroscópicas e eletroquímicas entre brometo de etídio e DNA de *Calf Thymus* para estudo das melhores proporções de interação entre ambos.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e foram usados como recebidos. A sequência usada com 277 pares de bases do produto de PCR de câncer de próstata segue abaixo:

```
CCGAGGGAGACCAGGAAGATCTGCATGGTGGGAAGGACCTGATGATACAG  
AGGTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTGACTTTACCATCTGAGGCCACACATCT  
GCTGAAATGGAGATAATTAACATCACTAGAAACAGCAAGATGACAATATAA  
TGTCTAAGTAGTGACATGTTTTTGCACATTTCCAGCCCCTTTAAATATCCAC  
ACACACAGGAAGCACAAAAGGAAGCACAGAGATCCCTGGGAGAAATGCCC  
GGCCGCCATCTTGGGTCATCGAT
```

A sequência usada com 257 pares de bases de produto de PCR do vírus da hepatite C segue abaixo:

```
AGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTC  
CTTTCTTGGATCAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCCGCGA  
GACTGCTAGCCGAGTAGTGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTG  
ATAGGGTGCTTGCGAGTGCCCCGGGAGGTCTCGTAGACCGTGCATCATGAG  
CACATCATCCAAACCCCAAAGACAAACCAAAAAGAAACACCAACCGCCGCC  
A
```

Os produtos de PCR foram obtidos em colaboração com o professor Luiz Ricardo Goulart Filho do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. A análise das sequências nucleotídicas foi realizada utilizando programa Blast [190].

3.2. Aparato

Os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em uma célula eletroquímica convencional de três compartimentos. Uma placa de platina de 2 cm² de área geométrica foi utilizada como eletrodo auxiliar. Um fio de prata/cloreto de prata em solução de cloreto de potássio, Ag/AgCl, KCl (3,0 mol.dm⁻³), foi utilizado como

eletrodo de referência. Eletrodos de carbono grafite em forma de disco com 6,18 mm de diâmetro, da Alfa Aesar, foram utilizados como eletrodos de trabalho. O sistema foi conectado a um potenciostato da CH Instruments, modelo 420A. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica foi realizada em potenciostato Autolab PGSTAT302N, com módulo FRA2 da Eco Chemie BV. Os experimentos espectroscópicos foram realizados em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 1,0 cm. Espectroscopia de absorção foi realizada em um espectrofotômetro UV-visível da Shimadzu modelo 1650PC. Espectroscopia de Fluorescência foi realizada em um espectrofotômetro HITACHI modelo F-4500. Os gráficos foram construídos utilizando o software Origin versão 7.5. O planejamento fatorial para otimização foi construído utilizando o software STATISTICA versão 7.

3.3. Procedimento

3.3.1. Estudo da formação e das propriedades do Poli(3-aminofenol)

Os eletrodos de grafite foram montados sobre base metálica em um invólucro de politetrafluoretileno (Teflon^R) com cola de prata condutora. As margens foram isoladas com cola epóxi (Araldite^R). Após esse tempo, os eletrodos foram lixados com lixas d'água e ultra-sonicados. O condicionamento foi realizado manualmente em feltro umedecido com uma suspensão de óxido de alumínio (alumina), 0,3 μ m e, novamente, ultra-sonicado. Análise eletroquímica das condições de reprodutibilidade dos eletrodos, ausência de contaminantes nas células e em soluções foram realizadas através de voltametria cíclica, em solução contendo ferrocianeto de potássio $K_4Fe(CN)_6$ (5,0 mmol.dm⁻³), ferricianeto de potássio $K_3Fe[CN]_6$ (5,0 mmol.dm⁻³) e cloreto de potássio KCl (0,1 mol.dm⁻³), faixa de potencial de -0,1 a +0,5 V, 100 mV.s⁻¹ e em solução contendo ácido perclórico HClO₄ 0,5 mol.dm⁻³, faixa de potencial de -0,2 a +1,1 V, 50 mV.s⁻¹.

A polimerização foi realizada em solução de HClO₄ (0,5 mol.dm⁻³) contendo 3-aminofenol (2,5 mmol.dm⁻³), mesma faixa de potencial e velocidade do sistema anterior, de acordo com artigo publicado pelo grupo durante o desenvolvimento do presente trabalho [154]. Foram realizadas 100 varreduras sucessivas de potencial. O

eletrodo modificado foi lavado com água deionizada, seco com nitrogênio ultra puro e utilizado para os experimentos seguintes.

O estudo de estabilidade do polímero poli(3-aminofenol) (P3AF) foi realizado através de VC em solução de HClO_4 nas mesmas condições especificadas anteriormente. Foi avaliada a estabilidade térmica do eletrodo modificado a temperatura de 100 °C de 5 em 5 minutos e a estabilidade do polímero com o tempo de armazenagem. Para construção dos genossensores, foi realizada uma voltametria de pulso diferencial (VPD) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4, varrendo o potencial de +0,3 a +0,9 V, para se obter uma linha de base para detecção, usando brometo de etídio (BE) como indicador de hibridação.

3.3.2. Desenvolvimento dos genossensores para câncer de próstata e hepatite C

As dosagens dos produtos de PCR foram realizadas utilizando espectrofotometria UV-visível a comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A relação entre as respostas de absorbâncias nesses dois comprimentos de onda igual a 1,88 ($A_{260}/A_{280} = 1,88$) indica DNA livre de contaminação de proteínas. A concentração de DNA foi também estimada em gel de agarose 0,8% de acordo com Sambrook *et al.* [191].

Para a construção dos genossensores, há a necessidade de etapas de aquecimento (desnaturação dos produtos de PCR e pré-aquecimento dos eletrodos), gotejamentos (para as imobilizações das sondas, alvos e intercalador), lavagens (para remoção de moléculas não imobilizadas em excesso), secagens e detecção. Nesses experimentos, uma célula eletroquímica de um compartimento foi utilizada. Nela, cerca de 500 μL de solução tampão para as detecções foram o suficiente para a imersão dos eletrodos e para realização das análises eletroquímicas. Para melhor compreensão de tais etapas foi construído um esquema apresentado na Figura 23:

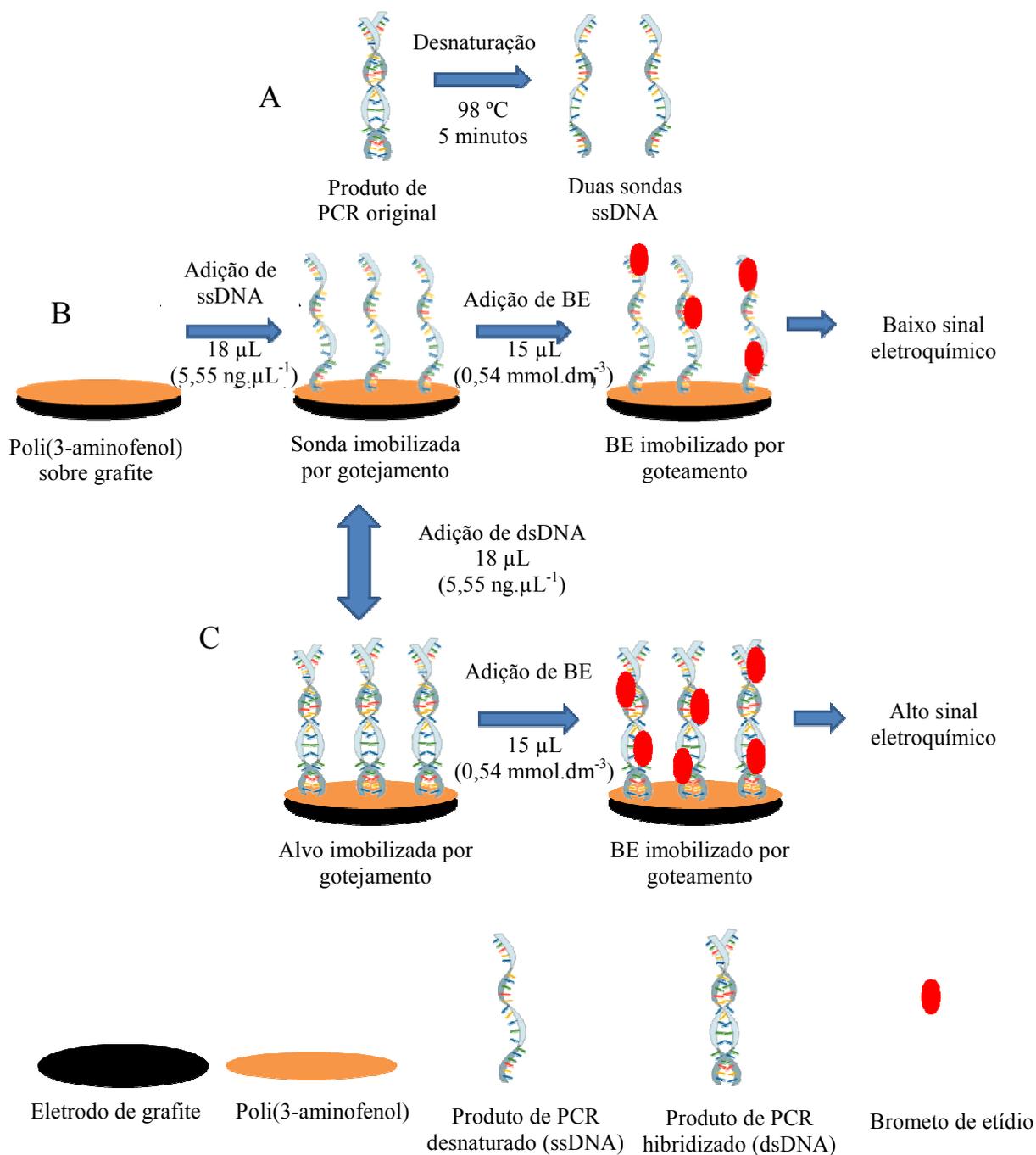


Figura 23: (A) desnaturação térmica do produto de PCR; (B) construção do genossensor e detecção indireta através de oxidação do BE apenas no sistema contendo sonda; (C) detecção indireta feita através de oxidação do BE no sistema contendo alvo complementar.

Os produtos de PCR foram desnaturados termicamente em banho-maria, por 5 minutos. Isso permite obter a partir de uma fita dupla de DNA (produto de PCR), duas

fitas simples (ssDNA), pela quebra das ligações entre as bases (Figura 23A). Essas, assim chamadas fitas simples do DNA (ssDNA) serão as sondas a serem imobilizadas.

A Figura 23B mostra a etapa de construção do sensor e detecção feita apenas com a sonda imobilizada. Os eletrodos de grafite modificados com P3AF foram pré-aquecidos por 3 minutos a 98 °C. Após a desnaturação, 18 µL (5,55 ng.µL⁻¹, 100 ng) dos produtos de PCR foram adicionados por gotejamento aos eletrodos pré-aquecidos e deixado interagir por 3 minutos. Uma lavagem em tampão fosfato foi realizada para remoção de analitos que não interagiram com os eletrodos. Após essa etapa foram imobilizados 15 µL de BE (0,54 mmol.dm⁻³) sobre as superfícies. Após 5 minutos de interação, os sistemas foram lavados com tampão fosfato. A detecção foi realizada utilizando VPD do mesmo modo que feito a linha de base. Através do software do equipamento, foi realizado um pré-processamento dos dados por transformação da detecção com a linha de base.

O mesmo procedimento descrito acima foi realizado, com a imobilização da sonda (ssDNA) sobre a superfície do eletrodo. Uma segunda imobilização, agora do alvo complementar foi realizada, esperando que a fita dupla, o produto de PCR original seja regenerada (dupla fita do DNA, dsDNA), o que fornecerá o resultado positivo para a análise (Figura 23C). O sistema contendo a sonda foi levado a uma incubadora à 42 °C e a imobilização do alvo teve duração de 15 minutos. Isso para permitir que a fita dupla do DNA fosse regenerada com sucesso. A lavagem foi realizada com tampão fosfato seguida da imobilização de BE por 5 minutos e detecção.

O genossensor construído para câncer de próstata utilizou como sonda negativa o produto de PCR para o vírus da hepatite C devido a ambos possuir números de pares de bases semelhantes. O contrário também foi feito. O produto de PCR de câncer de próstata foi utilizado como sonda negativa para a construção do genossensor para hepatite C. As detecções de hibridização foram realizadas com os genossensores descritos acima utilizando uma solução contendo 18 µL do alvo complementar (5,55 ng.µL⁻¹, 100 ng). Assim sendo, os processos de desnaturação térmica, gotejamento, lavagem, imobilização de BE e detecção foram os mesmos que mencionados anteriormente.

Foram realizados experimentos variando o tempo de interação dos alvos com as sondas, concentração de BE, alvos não-complementares, limite de detecção e estabilidade dos genossensores.

3.3.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os espectros de impedância eletroquímica foram obtidos em experimentos realizados em célula de três compartimentos utilizando solução de ferrocianeto de potássio $K_4Fe(CN)_6$ $5,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$, ferricianeto de potássio $K_3Fe[CN]_6$ $5,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$ contendo cloreto de potássio KCl $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$. Eletrodos foram preparados de acordo com as seções acima, com exceção da etapa de imobilização de BE. Região de frequência foi de 100 kHz a 10 mHz, amplitude de 10 mV e potencial aplicado de +0,24 V. A solução foi deaerada por 45 minutos e as análises foram feitas à medida que não houve mais variação de potencial.

3.3.4. DNA de *Calf Thymus* e brometo de etídio

A quantificação de DNA de *Calf Thymus* foi a mesma realizada para os produtos de PCR. O coeficiente de extinção molar para DNA de *Calf Thymus* é de $\epsilon_{260} = 6600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [192] e para o brometo de etídio é de $\epsilon_{480} = 5700 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ [193]. Os espectros de fluorescência de excitação foram obtidos sobre uma faixa de comprimento de onda de 400 a 485 nm para uma emissão de 595 nm. Os espectros de absorção foram realizados variando os comprimentos de onda de 800 a 190 nm. Eletrodos de carbono grafite limpos foram usados nos experimentos eletroquímicos, através de medidas de VPD de +0,3 à +0,7 V. Tampão TE [2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol ou comumente chamado de Tris-HCl 10 mmol.dm^{-3} , EDTA $1,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$, pH 8,0] foi utilizado [176], pH de atividade ótima para DNA [128]. EDTA é um agente quelante com grande afinidade por íons magnésio, impedindo a atividade deste que serve como um co-fator para a DNase, responsável pela degradação do DNA [194]. Soluções de NaCl foram preparadas no mesmo tampão.

Ao contrário dos experimentos realizados na construção dos genossensores, o estudo da interação entre DNA de *Calf Thymus* e BE foram realizados em solução e não imobilizados sobre eletrodos. Além disso, foi utilizados eletrodo de grafite e não eletrodos de grafite modificados com poli(3-aminofenol).

4. Resultados e discussão

4.1. Estudo da formação e das propriedades do poli(3-aminofenol)

As condições experimentais necessárias para se obter os resultados confiáveis dependem da reprodutibilidade dos sistemas. Para isso, os eletrodos de carbono grafite devem apresentar respostas semelhantes para serem utilizados nos experimentos. Dentre essas respostas estão as do eletrodo sem modificação, após a modificação com o polímero e antes da construção dos biossensores. Para isso, foram realizados voltamogramas cíclicos em grafite em soluções específicas, como pode ser visto na Figura 24:

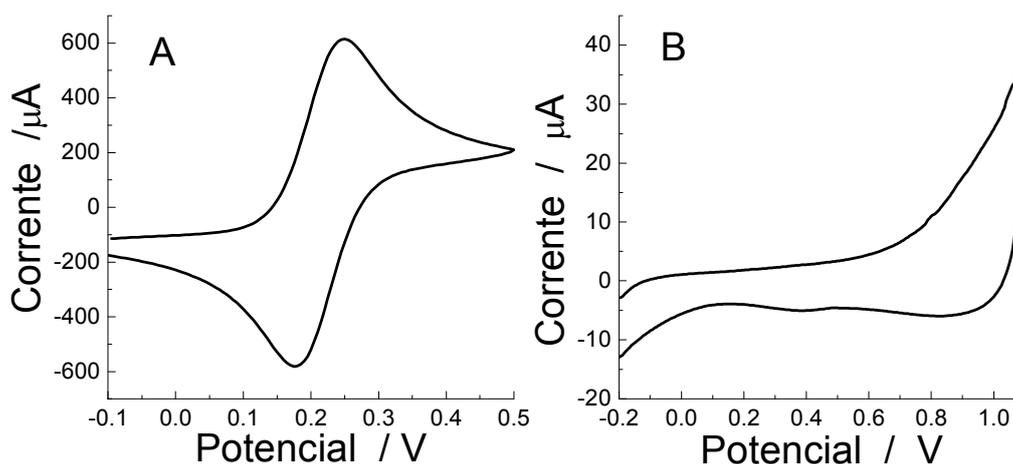


Figura 24: Voltamogramas cíclicos em eletrodos de grafite: (A) $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ ($5,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$) em KCl ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), 100 mV.s^{-1} e (B) $HClO_4$ ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$), 50 mV.s^{-1} .

As medidas feitas em solução contendo o par redox ferro/ferricianeto foram utilizadas como um indicativo da qualidade de resposta eletroquímica do eletrodo. As áreas eletroquimicamente ativas dos eletrodos de grafite são os parâmetros analisados já que a concentração das espécies em solução, seus coeficientes de difusão e a velocidade de varredura não se alteram ao se medir um eletrodo contra o outro. A diferença de potencial entre os picos anódico e catódico menor do que 100 mV e razão das correntes

de pico anódica e catódica próxima do valor unitário, permitem dizer que os eletrodos apresentam reprodutibilidade da superfície para realização dos experimentos eletroquímicos.

A medida realizada em HClO_4 permite observar a presença ou ausência de interferentes na solução e na superfície do eletrodo, na faixa de estudo utilizada para a polimerização. Os interferentes passíveis de serem eletroquimicamente oxidáveis ou redutíveis surgiriam no voltamograma com respostas faradaicas respectivas. Na ausência dos mesmos, como evidenciado na Figura 24B, tanto eletrodo, quanto soluções estão livres de interferentes eletroativos na faixa de potencial de trabalho. A resposta anódica que começou a surgir acima do potencial $+0,8 \text{ V}$ é uma descarga normal do solvente. Em todos os experimentos, borbulhamento de gás nitrogênio (N_2) foi realizado nas células eletroquímicas para remoção de oxigênio. Assim, é evidenciada a formação de um material eletroativo (Figura 25).

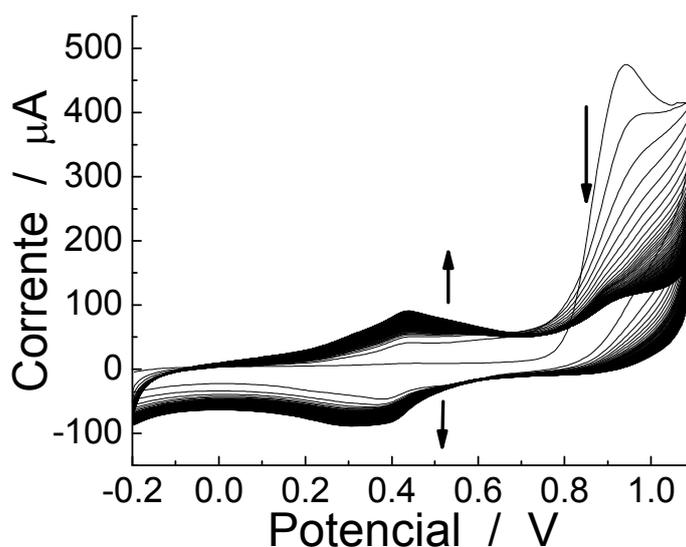


Figura 25: Voltamogramas cíclicos em eletrodo de grafite em solução de 3-aminofenol ($2,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$) contendo HClO_4 ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$), 100 ciclos, 50 mV.s^{-1} .

O processo se inicia com a oxidação do monômero como uma onda irreversível em aproximadamente $+0,9 \text{ V}$, correspondente à formação do cátion-radical na estrutura. Durante as sucessivas varreduras de potencial, um decréscimo gradual nos valores de corrente ocorre. A partir do segundo ciclo, um par de picos redox surge entre $+0,1 \text{ e}$

+0,6 V. Essa corrente aumenta com o número de ciclos refletindo a cobertura da superfície do eletrodo pelo filme polimérico.

Após a formação do polímero, as respostas eletroquímicas devem ser comparadas para se atestar a presença de material com resposta semelhante entre os eletrodos. Nesse caso, apenas medidas em solução de HClO_4 foram realizadas, e não com o par redox ferro/ferricianeto. Isso se deve ao fato de que o polímero incorpora, em alguma extensão, esses compostos e, mesmo com lavagem extensiva, há a presença de sinal de corrente atribuída aos mesmos. Para fins de estudo do polímero, experimentos utilizando esse par redox foram fundamentais, porém, para aplicação nos estudos de genossensores, essa etapa foi excluída. Porém, a medida em HClO_4 após a formação do material é necessária para a oxidação de monômero residual presente na malha polimérica, além de analisar a presença de uma resposta redox relativa ao polímero, como pode ser visto na Figura 26:

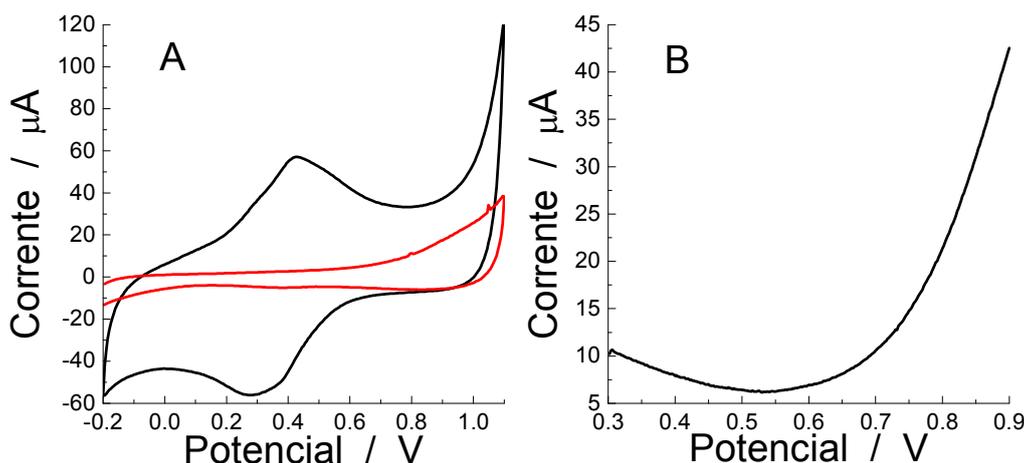


Figura 26: Voltamograma cíclico em eletrodo de grafite modificado com poli(3-aminofenol): (A) antes (-) e após (-) polimerização em solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$) e (B) voltamograma de pulso diferencial de eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4, 20 mV.s^{-1} .

As medidas feitas após a eletropolimerização em meio de HClO_4 permitem observar a presença de um comportamento redox do material formado. A reprodutibilidade dos eletrodos deve ser averiguada nas linhas de base em tampão fosfato, como visto na Figura 25B. A ausência de resposta na região de oxidação do

brometo de etídio (em torno de +0,64 V *versus* Ag/AgCl) permite dizer que, nessa faixa de potencial, não há interferentes eletroativos na solução e nem resposta do material depositado no eletrodo que poderia interferir na resposta do sensor.

Assim sendo, os experimentos mencionados acima foram definidos como padrões para os sistemas e a semelhança entre as respostas foi avaliada antes da construção dos genossensores.

A estabilidade térmica do polímero sobre o eletrodo foi estudada. Os eletrodos modificados foram levados a uma estufa a 98 °C e mantidos por 3 minutos. Essa temperatura foi escolhida devido a ser a mesma usada na desnaturação de DNA, a qual permite a imobilização da fita simples (ssDNA). Assim, visando construir o genossensor, o material deve suportar esta temperatura pelo máximo de tempo sem perder sua atividade. O tempo de contato com a sonda é de 3 minutos, antes que a superfície seque por isso essa escolha. Após esse tempo, o sistema foi levado a uma célula eletroquímica contendo HClO₄ e um voltamograma cíclico foi registrado na região redox do polímero. O processo foi repetido 40 vezes. Um controle negativo foi utilizado, deixando um eletrodo modificado à temperatura ambiente. Estudo da estabilidade eletroquímica frente à mesma solução foi realizado para se avaliar as mudanças perante ciclos consecutivos de potencial. Os valores de carga calculados pela integral da região anódica são muito semelhantes à da catódica e, por isso, somente a primeira será visualizada. A porcentagem de carga contra o tempo de medida e contra o número de ciclos pode ser vista na Figura 27:

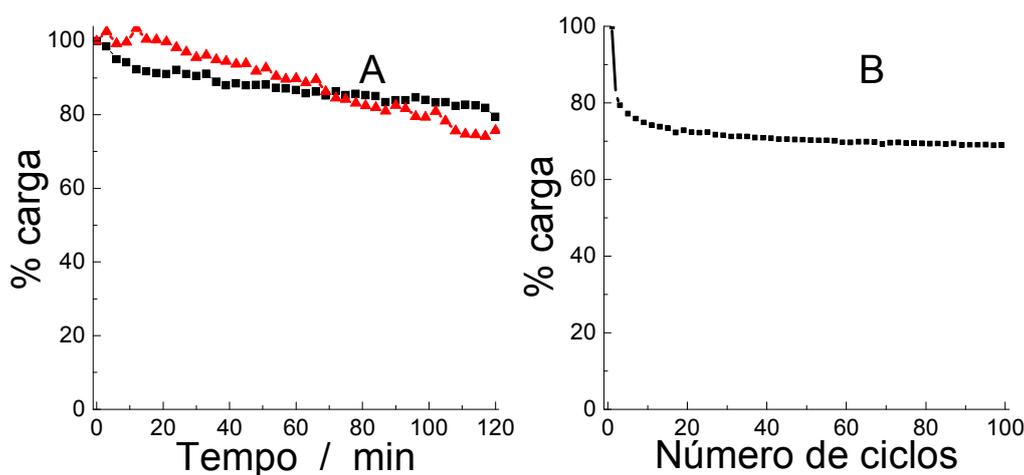


Figura 27: Porcentagem de carga contra tempo de medida para eletrodo modificado com poli(3-aminofenol); (A) (—■—) controle negativo realizado à temperatura ambiente (25 °C) e (—▲—) após tratamento térmico e (B) porcentagem de carga obtida a partir de 100 voltamogramas cíclicos consecutivos realizados em HClO_4 ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$), faixa de potencial entre 0,0 e +0,7 V, $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

O polímero retém 79 % e 75 % de sua atividade inicial à temperatura ambiente e após tratamento térmico, respectivamente, após duas horas de experimento. Estes resultados mostram que o polímero não sofre grandes alterações na sua atividade eletroquímica, com a temperatura analisada, principalmente nos minutos iniciais, onde não há evidência de perda significativa desta atividade, podendo ser utilizado para imobilização de DNA. A queda dos valores à temperatura ambiente pode ser devido aos efeitos de lavagem, secagem e transferências contínuas para a célula contendo ácido, o que pode provocar uma perda na estabilidade do material. A estabilidade eletroquímica feita com 100 ciclos de potencial (Figura 27B) mostra que há uma queda nos valores de carga nos primeiros ciclos e a tendência a se estabilizar com ciclos subsequentes até alcançar um valor de 69 %. Estes resultados indicam propriedades interessantes do polímero. Sua condutividade se dá através de duplas ligações conjugadas em sua estrutura. Porém, apenas isso não é o suficiente para promover condução eletrônica. Há a necessidade da dopagem do polímero para que isso ocorra. Polímeros formados por eletropolimerização são auto-dopados com os contra-íons presentes na solução. No caso do P3AF os íons incorporados são H^+ e ClO_4^- provenientes do HClO_4 . Durante os

processos redox do polímero, ocorre troca de íons, inserção e expulsão dos mesmos do polímero. Como o processo é repetido consecutivamente (um ciclo após o outro), as taxas de expulsão de íons mostram-se maiores do que as de inserção, o que provoca o abaixamento dos valores de porcentagem de carga. Durante a oxidação do material formado nessa solução, há a formação de cargas positivas no polímero, o que pode ser acompanhado da expulsão dos cátions (H^+) para a solução. Na redução, há o retorno dos mesmos para o polímero, porém, não na mesma quantidade que foi expulsa, além da expulsão de ânions (ClO_4^-). Por isso ocorre a queda em porcentagem de carga do primeiro para o segundo ciclo. No primeiro ciclo, o polímero formado está completamente dopado. Há uma grande expulsão de íons durante a primeira oxidação, que não consegue ser reposta completamente nos próximos ciclos. Assim, há uma queda na resposta. Com os ciclos subseqüentes, a taxa de expulsão continua maior do que a taxa de inserção e a resposta de carga decresce até tender a uma estabilização ao final de 100 ciclos. Mesmo assim, cerca de apenas quatro ciclos são necessários para obtenção de resposta estável, principalmente na região de oxidação mais anódica, indicando a eliminação de monômero residual na superfície, ou seja, com mais de 78 % da sua atividade inicial.

Foi realizado um estudo avaliando a estabilidade do polímero com tempo de armazenagem. Os eletrodos modificados foram armazenados à temperatura de $-12\text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 3 meses. O perfil de carga por tempo foi avaliado (Figura 28):

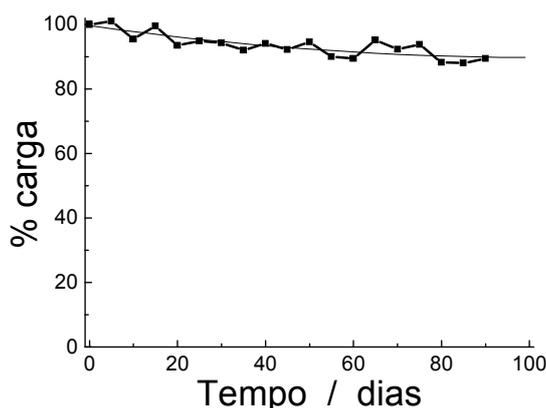


Figura 28: Porcentagem de carga versus tempo de armazenagem para eletrodo modificado com poli(3-aminofenol), obtida a partir dos voltamogramas cíclicos realizados em $HClO_4$ ($0,5\text{ mol.dm}^{-3}$), faixa de potencial entre 0,0 e $+0,7\text{ V}$, 50 mV.s^{-1} .

O perfil não é bem definido devido às diferentes variáveis em cada experimento. Como foram realizados em espaços de 5 em 5 dias, soluções de HClO₄ podem ter apresentado pequenas diferenças quanto à concentração entre os períodos, qualidade da água deionizada, eletrodos de referência e auxiliares. Essas variáveis, mesmo com pequenas contribuições podem ter sido responsáveis pelas diferenças observadas. Além disso, cada experimento constitui em etapas de equilíbrio com a temperatura ambiente, imersão em meio ácido, varreduras de potenciais, lavagem e secagem com N₂, armazenamento à temperatura baixa novamente, o que pode levar a uma perda significativa da atividade do material. Mesmo assim, com todas as variáveis apresentadas, as diferenças entre uma medida e outra são na ordem de 5,0 μA, o que não interfere nos resultados como um todo. A tendência mostra a queda na resposta de carga com o passar do tempo, porém, não decrescendo de 88 % ao final de 3 meses de experimento, o que mostra um material com propriedades similares às iniciais. Dessa maneira, ao realizarmos experimentos de estabilidade dos sensores construídos sobre essa matriz polimérica, as possíveis perdas de resposta não seriam relacionadas com perda de atividade polimérica.

4.2. Desenvolvimento dos genossensores para câncer de próstata e hepatite C

A opção de escolha para o polímero derivado de 3-aminofenol dependeu de outro fator além da formação de um polímero com funcionalizações na sua estrutura com possibilidade de interação com biomoléculas. O 3-aminofenol foi escolhido dentre os outros dois isômeros, pois apresentou as melhores respostas de detecção. Na Figura 29, observa-se os gráficos de detecção e controle para eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com polímeros derivados de 2-aminofenol e 4-aminofenol:

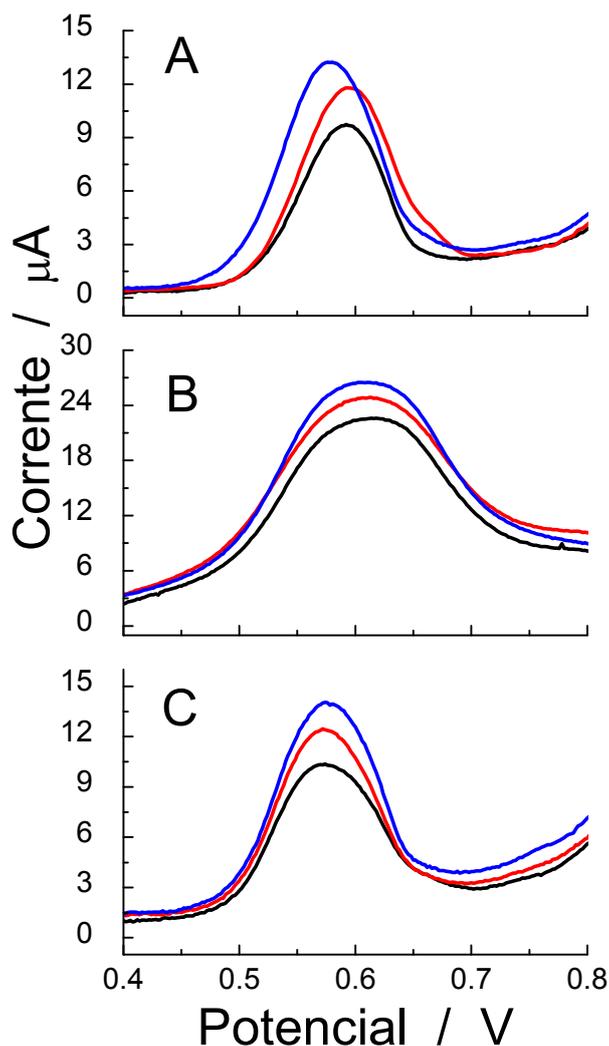


Figura 29: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodos de grafite (A), eletrodos de grafite modificados com poli(2-aminofenol) (B) e eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) (C) (–), contendo apenas as sondas (–) e contendo as sondas e os alvos complementares (–) hibridizado à $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms .

Há apenas uma pequena diferença entre as respostas da sonda e alvo complementar em todos os sistemas. Além disso, pode-se observar que a resposta dos eletrodos simplesmente com BE imobilizado, na ausência de DNA, apresenta resposta significativa. Isso pode indicar que pouco DNA está sendo imobilizado, visto que uma

diferença de $\sim 2 \mu\text{A}$ entre BE, sonda e alvo não é suficiente para se atestar modificações importantes.

Já os eletrodos modificados com P3AF, modificados com as sondas e alvos complementares apresentaram respostas diferentes entre si, como pode ser visto na Figura 30:

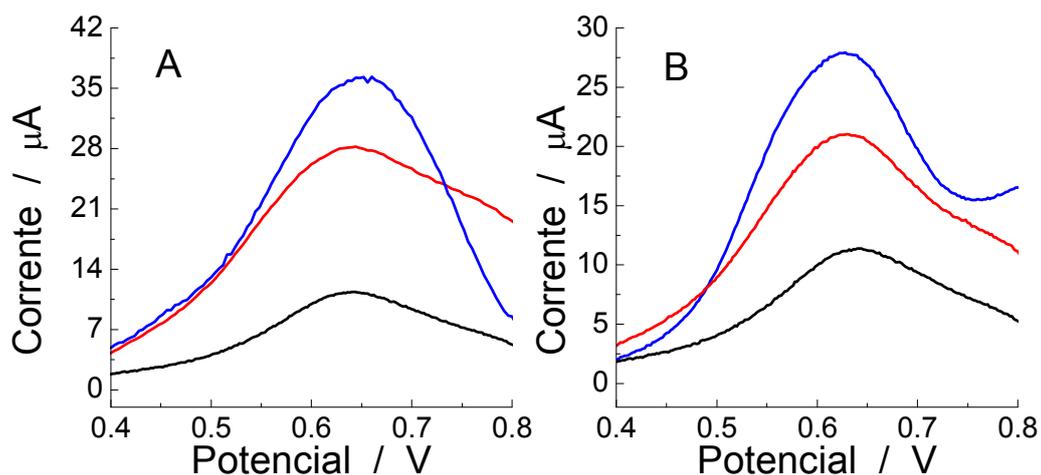


Figura 30: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodos modificados com poli(3-aminofenol) (–), contendo apenas as sondas (–) e contendo as sondas e os alvos complementares hibridizados à $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos (–) para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR do vírus da hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , tempo do pulso = 60 ms .

É possível detectar significativamente os eventos de hibridização através da detecção indireta de BE. Primeiramente, o sinal obtido quando se imobiliza diretamente BE sobre o polímero é muito mais baixo do que na presença das sondas. Isso indica a presença dos materiais biológicos adsorvidos na superfície. As diferenças entre os sinais de corrente são devido às diferentes formas com que as biomoléculas interagem com BE. Na presença apenas da sonda, ssDNA, o sinal é mais baixo do que com o alvo, dsDNA. Isso se deve ao efeito intercalante do BE sobre DNA nativo, ou seja,

hibridizado, onde ele pode se acomodar mais facilmente entre os pares de bases da estrutura. Desse modo, a detecção é possível.

A diferença entre esse sistema e do eletrodo de grafite é o fato de que o grafite não possui sítios de ligação para as sondas e essas são eliminadas nas etapas de lavagem. Já entre os polímeros utilizados como matrizes, os diferentes tipos de materiais explicam esses resultados. O polímero derivado do 4-aminofenol é, dentre os três, o que modifica menos o eletrodo de grafite [158], com resposta em ferro/ferricianeto e HClO_4 muito semelhante à do grafite limpo. Por isso, era de se esperar que, nas detecções, suas respostas se assemelhassem às de grafite (Figura 29A e 29C). O polímero derivado do 2-aminofenol já foi estudado e sua estrutura caracterizada por muitos autores [195,196] como sendo um derivado da 3-aminofenoxazina, como pode ser visto na Figura 31:

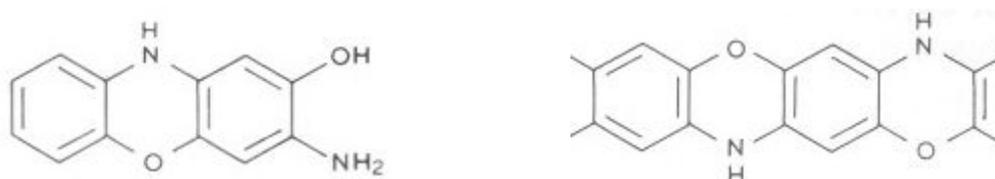


Figura 31: Estrutura da 3-aminofenoxazina (esquerda) e poli(2-aminofenol) (direita) [197].

O polímero derivado de 2-aminofenol apresenta alta condutividade perante os demais devido à linearidade de sua estrutura, com os anéis coplanares permitindo a transferência eletrônica por toda a malha. Porém, para a construção dos biossensores, um passo fundamental é a imobilização da sonda sobre a matriz, que deverá possuir grupos funcionalizados em sua estrutura. No caso desse polímero, os grupos presentes são éteres e amins aromáticas com pouca possibilidade de interação com funcionalidades dos compostos biológicos. As sondas podem, por esses motivos, não estar sendo imobilizadas nessa matriz e sendo eliminadas nas etapas de lavagem.

Já o polímero derivado de 3-aminofenol apresenta um mecanismo diferente. Apesar de não se ter uma proposta bem definida de sua estrutura, Salavagione *et al.* [169], através da utilização de cálculos de densidade eletrônica obtidos usando métodos de campo semi-empíricos (AM1), identificaram que após a formação do dímero, várias posições apresentaram densidades similares, favorecendo múltiplas adições de cátions-

radicais ao dímero. Essa análise é favorável a uma proposta feita onde o polímero pode apresentar a seguinte estrutura:

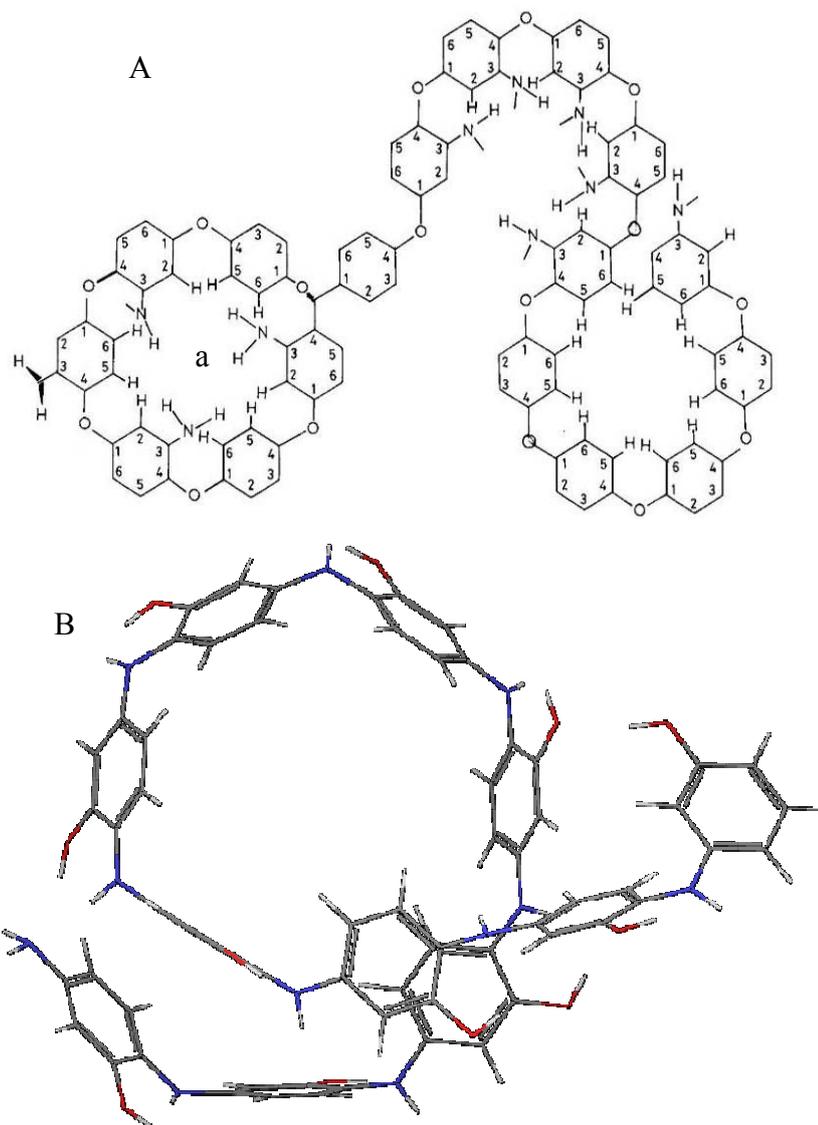


Figura 32: (A) Possível estrutura do poli(3-aminofenol) [165] e (B) cálculos teóricos realizados para o dodecâmero de 3-aminofenol (comunicação pessoal de Prof. Odonório Abrahão Junior)

Na Figura 32A, “a” é identificado como um *pinhole* (literalmente, buraco de agulha) onde o polímero pode apresentar uma conformação semelhante a um éter coroa, contendo os grupos funcionais amino dispersos pela estrutura e as ligações entre os anéis sendo realizadas pelos átomos de oxigênio. Estudos teóricos recentes ainda não publicados (Prof. Odonório Abrahão Junior e colaboradores) revelam estruturas com

conformação semelhante à apresentada na Figura 32A (Figura 32B), o que reforça a análise desta ser a possível estrutura do polímero formado, além de explicar as tendências observadas na construção dos genossensores. Os grupos funcionais dispersos na estrutura facilitam as interações com os grupos fosfato presentes nos produtos de PCR, aumentando a interação entre a matriz e o DNA, fazendo com que a imobilização ocorra mais eficientemente. Além disso, a presença dos *pinholes* auxilia na aproximação do DNA fazendo com que este fique mais “preso” na malha devido ao espaço para se acomodar e as interações com os hidrogênios internamente.

A diferença, na Figura 30, entre os sinais sonda/alvo não é tão evidente, mas significativa, devido ao tamanho dos produtos de PCR escolhidos (mais de 200 pares de bases). Como são muito grandes, as sondas imobilizadas podem, em determinados pontos sobre a superfície sofrer processos de *hairpin loop* [198] ou *stem-loop*, que ocorrem quando há a possibilidade de se formarem ligações com bases nitrogenadas provenientes delas mesmas, criando uma estrutura em forma de um “pirulito”. Esses possíveis pareamentos podem fazer com que mais BE fique em contato com a sonda do que se elas estivessem totalmente desimpedidas. Além disso, uma concentração muito baixa, 100 ng, para ambos os produtos de PCR foram utilizados, tanto para sonda quanto para alvo, que mesmo assim, foi possível realizar a detecção dos alvos. As diferenças entre a porcentagem de bases nitrogenadas entre a sonda do câncer de próstata e da sonda da hepatite C devem proporcionar as pequenas diferenças nos valores de corrente entre uma medida e outra (29,18 % guanina, 23,34 % adenina, 29,18 % citosina e 18,28 % timina para o vírus da hepatite C) e (24,27 % guanina, 34,06 % adenina, 21,74 % citosina e 20,21 % timina para câncer de próstata). Além disso, acredita-se que há sítios mais favoráveis para intercalação do brometo de etídio no DNA como AT/TA, seguido de CG/TA [119]. A presença de mais sítios de interação em um produto de PCR pode sobressair sobre o outro, promovendo maior intercalação.

Com base na detecção realizada sobre a matriz de poli(3-aminofenol), estudos de otimização foram realizados para se obter os melhores resultados, em relação aos valores de corrente. A concentração de BE utilizado foi um deles, como pode ser visto na Figura 33:

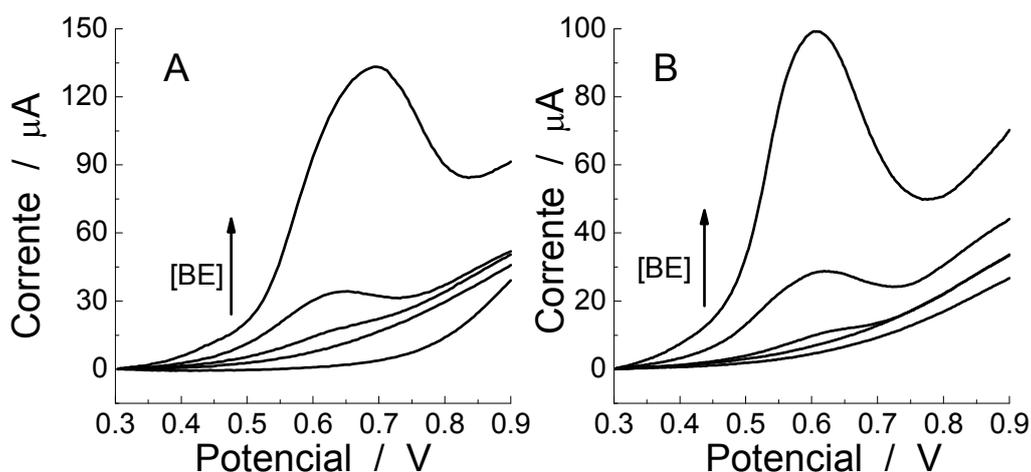


Figura 33: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodos modificados com poli(3-aminofenol) contendo sondas e alvos complementares hibridizados à $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR de hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$, $5,4 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$, $54 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$ e $5,4 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms .

Os melhores resultados deveriam ser, pelos gráficos na Figura 33, utilizando a maior concentração de BE. Porém, este amplo sinal não se refere apenas ao BE intercalado no DNA. A grande quantidade de intercalador usada é também absorvida pelo polímero, com parte sendo lavada em tampão, parte lixiviada durante a detecção. Os dois casos são visíveis a olho nu à medida que o recipiente de lavagem e a célula eletroquímica de detecção passam a apresentar uma coloração alaranjada, característica intrínseca do BE. No outro extremo, a menor concentração utilizada não apresenta sinal de oxidação e o perfil se assemelha com a linha de base. Nessas condições, não é possível de se detectar BE. Aumentando 10 e 100 vezes essa concentração, a resolução não é boa e os sinais de corrente são difíceis de analisar e de se verificar diferenças entre sonda e alvo. Os melhores resultados provêm da concentração de $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$ de BE. O sinal eletroquímico é observável, não há a presença de processos de lixiviação

e é possível de se obter diferenças nas respostas de sonda/alvo. Assim, essa concentração foi utilizada na realização dos próximos experimentos.

Outro aspecto importante é o tempo de contato para hibridização do alvo com a sonda. Tempos muito curtos não permitem a completa condição de hibridização e tempos muito extensos podem promover adsorções indesejadas na superfície juntamente com a hibridização. Em ambos os casos é esperado aumento no sinal de corrente. Um estudo de tempo de hibridização foi realizado, como poder ser visto na Figura 34:

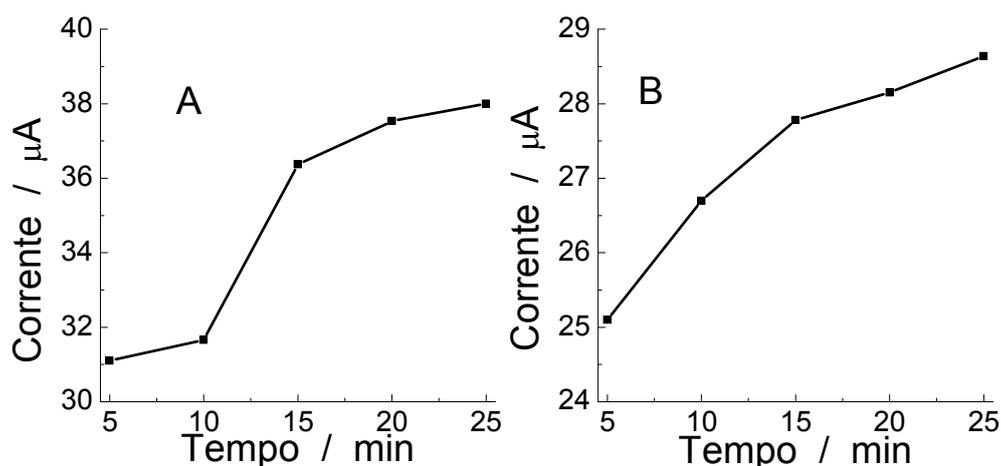


Figura 34: Perfil de corrente versus tempo para detecções utilizando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 sobre eletrodos modificados com poli(3-aminofenol) contendo sondas e alvos complementares hibridizado em 5, 10, 15, 20 e 25 minutos a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR de hepatite C, concentração da sonda e alvo = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms .

Pode ser observado um acréscimo nos valores de corrente de 5 a 25 minutos de detecção. Como mencionado acima, em um determinado ponto pode haver adsorção do alvo na superfície do polímero e o aumento se daria pela interação do BE com excesso de DNA imobilizado. A partir de 15 minutos de hibridização, a superfície do eletrodo tende a secar e as respostas de corrente de 20 e 25 minutos aumentam em pouca escala, tendendo a uma estabilização. Assim, 15 minutos parece ser o limiar da hibridização

com a adsorção e esse tempo foi escolhido para as hibridizações nos experimentos seguintes.

Para se avaliar a especificidade dos genossensores construídos, medidas utilizando produtos de PCR não-complementares foram feitas. Como as duas sondas possuem tamanhos semelhantes, a sonda do câncer de próstata foi utilizada como alvo não-complementar para o genossensor para o vírus da hepatite C e vice-versa. Esses estudos podem ser observados na Figura 35:

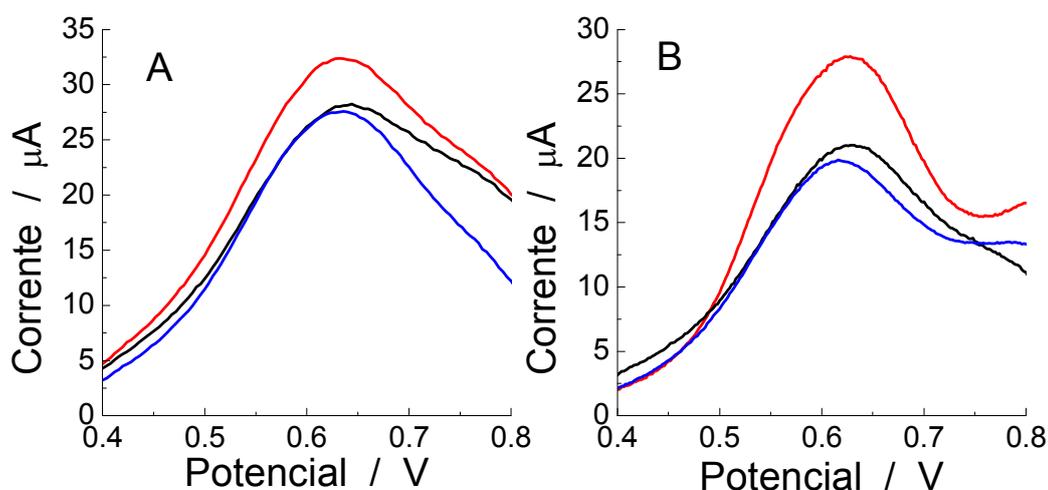


Figura 35: Voltamogramas de pulso diferencial usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$), pH 7,4 em eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) contendo apenas as sondas (—), contendo as sondas e os alvos complementares hibridizados a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos (—) e contendo as sondas e alvos não-complementares hibridizados a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos (—) para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR para o vírus da hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng , concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV , duração do pulso = 60 ms .

Utilizando alvos não-complementares de produtos de PCR semelhantes, é possível dizer que os sensores construídos apresentam especificidade com seus alvos complementares. As sondas não-complementares são excluídas nas etapas de lavagem e

os sensores se comportam como inicialmente. Uma próxima etapa é avaliar os limites de detecção dos respectivos genossensores, como pode ser visto na Figura 36:

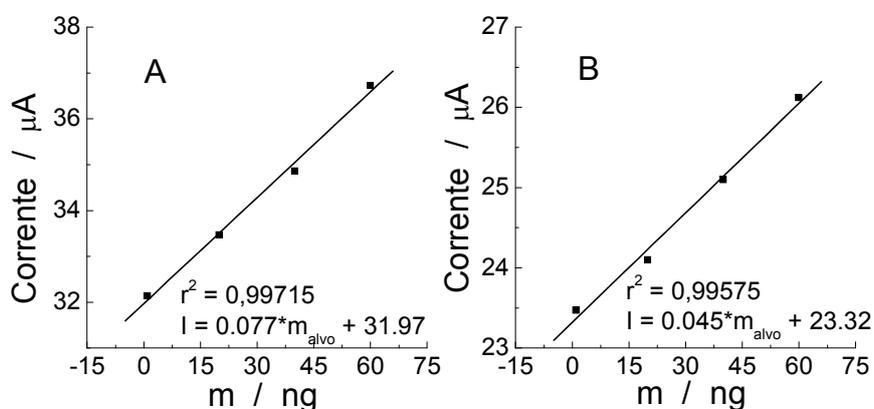


Figura 36: Curva de calibração para alvos complementares a diferentes concentrações para (A) câncer de próstata e (B) hepatite C.

O limite de detecção foi de 16 ng e 19 ng e o limite de quantificação foi de 54 ng e 64 ng, para câncer de próstata e hepatite C, respectivamente. A estabilidade dos genossensores foi avaliada em medidas periódicas (15 em 15 dias), como pode ser visto na Figura 37:

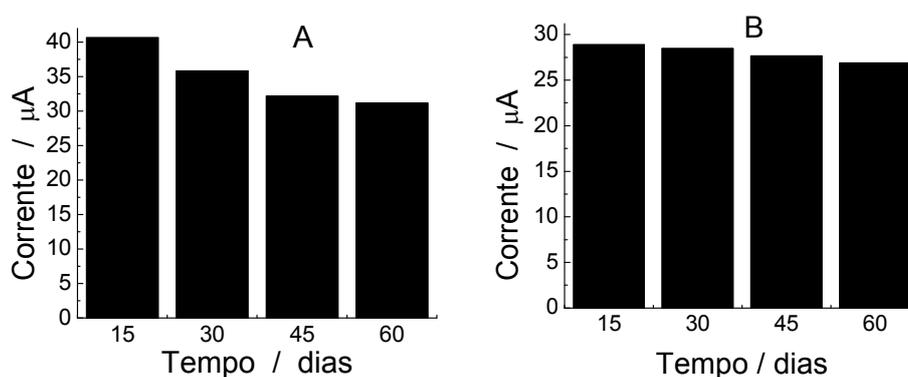


Figura 37: Tempo de vida do genossensor. Medida realizada usando brometo de etídio como intercalador em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$, pH 7,4 em eletrodo modificado com poli(3-aminofenol) contendo sondas e os alvos complementares hibridizados a $42 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos para (A) produto de PCR de câncer de próstata e (B) produto de PCR para vírus da hepatite C, concentração das sondas e alvos = 100 ng,

concentração de brometo de etídio = $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, $v = 20 \text{ mV.s}^{-1}$, amplitude = 25 mV, duração do pulso = 60 ms.

Os dois genossensores possuem resposta eletroquímica para os alvos complementares com até 60 dias de armazenamento.

4.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Através da intercalação do brometo de etídio nas sondas imobilizadas foi possível realizar a detecção eletroquímica de hibridização, indicando que ambas, sondas e alvos, foram imobilizados com sucesso. Para comprovar essas imobilizações, foi utilizada a técnica de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), que fornece informações importantes sobre as características de um sistema eletroquímico, como resistências e capacitâncias através de variações de frequência [199]. A EIE tem sido amplamente usada para medir a impedância de processos superficiais, incluindo detecção de hibridização de DNA [200,201] sendo bastante eficiente ao se avaliar a taxa de transferência eletrônica nos eletrodos, na presença de espécies redox em solução. Uma das possíveis representações dos dados é feita através do diagrama de Nyquist, em que a presença de semicírculos indica componentes resistivos nos sistemas. Esses componentes do sistema podem ser visualizados através da atribuição de um circuito equivalente, para simular as respostas obtidas pela técnica, e os dados obtidos são mostrados em uma tabela.

Os sistemas foram construídos sem a adição de BE, buscando simplificar os sistemas de análise, já que a técnica permite analisar diferenças entre as imobilizações diretamente, sem a necessidade de se adicionar um agente de identificação indireto. Os diagramas de Nyquist, oriundos desta detecção, o circuito equivalente e a tabela dos dados obtidos podem ser vistos na Figura 38 e Figura 39, respectivamente:

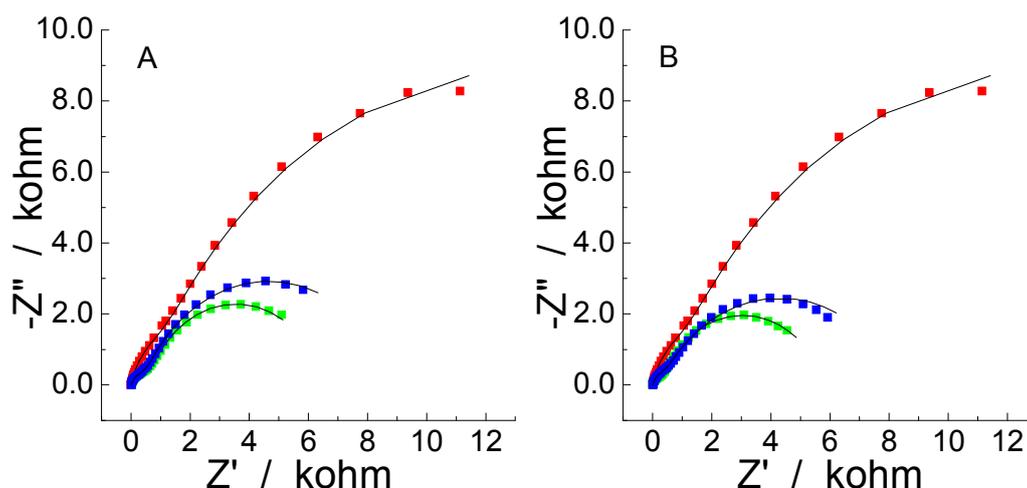


Figura 38: Diagramas de Nyquist realizados em (A) eletrodos de grafite modificados com poli(3-aminofenol) (—□—), sonda de câncer de próstata (—□—) e sonda/alvo de câncer de próstata (—□—) e (B) eletrodos de grafite modificados com poli(3-aminofenol) (—□—), sonda de hepatite C (—□—) e sonda/alvo de hepatite C (—□—) em $K_3Fe[CN]_6/K_4Fe[CN]_6$ ($5,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$) contendo KCl ($0,1 \text{ mol.dm}^{-3}$). Potencial aplicado de $+0,24 \text{ V}$, amplitude 10 mV , concentração das sondas = 100 ng . As linhas são referentes aos ajustes realizados às curvas experimentais.

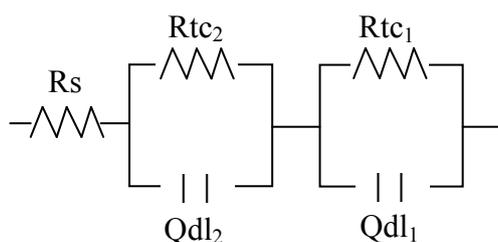


Figura 39: Circuito equivalente proposto para os ajustes realizados sobre os dados experimentais de impedância, onde R_s (resistência à solução), R_{tc1} (resistência à transferência de carga entre eletrodo e polímero), Q_{dl1} (capacitância entre eletrodo e polímero), R_{tc2} (resistência à transferência de carga entre o material biológico e o polímero) e Q_{dl2} (capacitância entre o material biológico e o polímero)

Tabela 3: Dados obtidos do ajuste: P3AF(poli-3-aminofenol), ss(sonda), ds(alvo), HepC (vírus da hepatite C) e CP (câncer de próstata).

	R_s (Ω)	Qdl_1 ($\Omega^{-1}s^n$)	n	Rtc_1 (Ω)	Qdl_2 ($\Omega^{-1}s^n$)	n	Rtc_2 (k Ω)	χ^2
P3AF	5,65	0,15	1,00	659,0	0,17	0,76	25,91	$4,43 \times 10^{-2}$
ssHepC	5,94	0,13	0,84	299,4	0,55	0,78	5,51	$2,12 \times 10^{-2}$
dsHepC	13,36	0,13	1,00	233,6	0,39	0,68	8,17	$4,20 \times 10^{-2}$
ssCP	15,40	0,19	0,75	675,0	0,66	0,84	5,79	$8,57 \times 10^{-2}$
dsCP	9,69	0,17	0,84	398,0	0,55	0,76	8,51	$3,87 \times 10^{-2}$

A Figura 38 apresenta os diagramas de Nyquist juntamente com o ajuste realizado pelo circuito equivalente apresentado na Figura 39. Há a presença de dois semicírculos nos sistemas. Um a altas frequências e outro, bem mais evidente, em baixas frequências. Não há a presença no circuito da componente W (Warburg), que indicaria um sistema controlado por difusão, pois uma reta com inclinação de 45° deveria estar presente nas regiões de baixa frequência [202]. Visto que a intenção foi observar as diferenças entre as medidas, os valores de chi-quadrado (χ^2) atestam qualidade razoável do ajuste experimental.

É possível de se observar que, para ambos os sistemas (câncer de próstata e hepatite C), o mesmo perfil com valores de resistência similares são apresentados, como esperado. O poli(3-aminofenol) apresenta os maiores valores de resistência, como já observado em outro trabalho [158], ou seja, maior dificuldade para a ação das espécies redox ferri/ferrocianeto sobre a superfície do eletrodo. Esperava-se que, com a adição de uma nova camada molecular (nesse caso, as biomoléculas), ocorresse o aumento dos valores de resistência pelo aumento da distância das espécies redox ao eletrodo. Porém, o contrário é observado (Rtc_2). Isso pode ser explicado através do esquema apresentado na Figura 40:

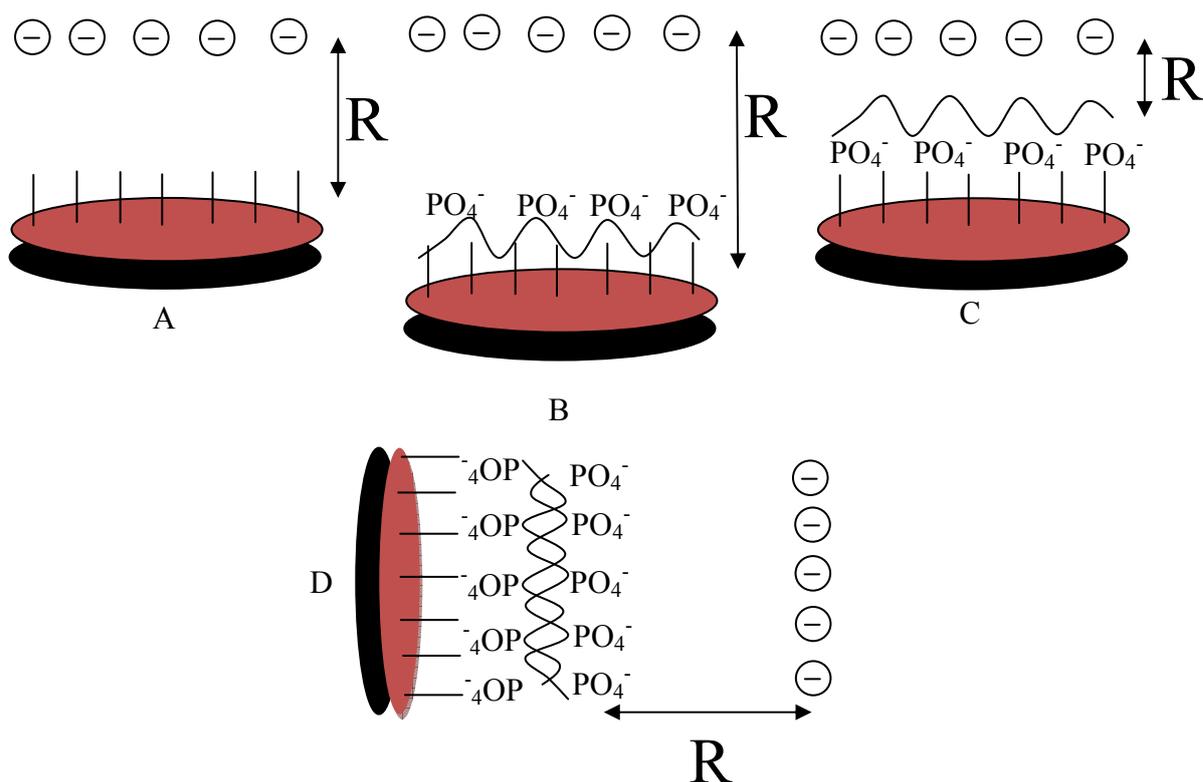


Figura 40: Esquema proposto para a hibridização da sonda com alvo através dos resultados obtidos por EIE: eletrodo de grafite (preto) modificado com poli(3-aminofenol) (vermelho) e possíveis funcionalizações (linhas retas), ferro/ferricianeto de potássio (sinais negativos), sondas e sondas com alvos para (A) apenas polímero em solução, (B) polímero mais sonda com grupos fosfato livres para a solução, (C) polímeros interagindo com grupos fosfato da sonda e (D) polímero mais sonda e alvo complementar em solução.

A resistência à transferência de carga significativa para os sistemas (R_{tc_2}), ilustrada nos diagramas de Nyquist como o semicírculo visível a baixas frequências, diminui do polímero para as sondas e aumenta novamente para as sondas/alvos. O polímero (Figura 40A) apresenta dificuldade para a aproximação das espécies redox à superfície do eletrodo devido à sua estrutura (ver discussão sobre a Figura 32). A presença da sonda poderia ocorrer de duas formas. Poderia estar com a região hidrofílica interagindo com o polímero (Figura 40C) ou em contato com a solução (Figura 40B). Se a segunda possibilidade fosse verdadeira, teríamos um aumento nos valores de resistência devido à repulsão entre os grupos fosfato e as espécies redox ferro/ferricianeto, todas carregadas negativamente. Porém, há um decréscimo

considerável nos valores de R_{tc2} , o que sugere que a imobilização da sonda esteja ocorrendo através dos grupos amino do polímero e os grupos fosfato, o que permite que a região hidrofóbica altamente carregada do DNA possa interagir mais com moléculas de ferro/ferricianeto, diminuindo, assim, a resistência à transferência de carga. Com o alvo imobilizado, a probabilidade é de ocorrer de acordo com a Figura 40D, dessa vez com a região hidrofílica do DNA em contato com a solução, o que permite novamente um aumento da resistência pela repulsão com as espécies negativas em solução. O aumento da capacitância de Q_{dl1} para Q_{dl2} atesta a presença de grupos redox na superfície modificada do eletrodo, relacionada à presença das sondas de DNA, confirmado também pela ausência de aumento significativo de capacitância de Q_{dl1} para Q_{dl2} construído apenas o polímero. Através da EIE não apenas foi possível detectar sonda e alvo como também mostrou a possibilidade de interação com o polímero via grupos fosfato das amostras de DNA.

4.4. Planejamento Fatorial para otimização de DNA de Calf Thymus e brometo de etídio

A interação entre DNA e BE por intercalação pode ir além da construção de genossensores para detecção de doenças em estágios iniciais. Se conhecido os parâmetros de melhor interação entre eles, podemos construir um sistema que pode ser usado para a identificação de novas drogas, muito usadas no tratamento de câncer por quimioterapia. A utilização de produtos de PCR é inviável pela mínima quantidade e baixa concentração. DNA nativo obtido do timo de bezerro (*Calf Thymus*) pode ser utilizado pelo baixo custo por uma alta quantidade de material com uma alta pureza.

A fim de construir um modelo que identifique a melhor condição de intercalação entre BE e DNA de *Calf Thymus* para a aplicação no estudo de novos agentes antineoplásicos quimioterápicos, experimentos envolvendo eletroquímica e espectroscopias foram realizados, baseados nas características ópticas e elétricas do BE.

Para se realizar os experimentos de planejamento fatorial, primeiramente foram analisadas as respostas de BE livre e em contato com DNA por espectroscopia de UV-visível (Figura 41A) e depois por espectroscopia de fluorescência (Figura 41B). Os potenciais anódicos limite para voltametria de pulso diferencial foram de +0,70 V devido à oxidação de EDTA a potenciais maiores do que esse (Figura 41C).

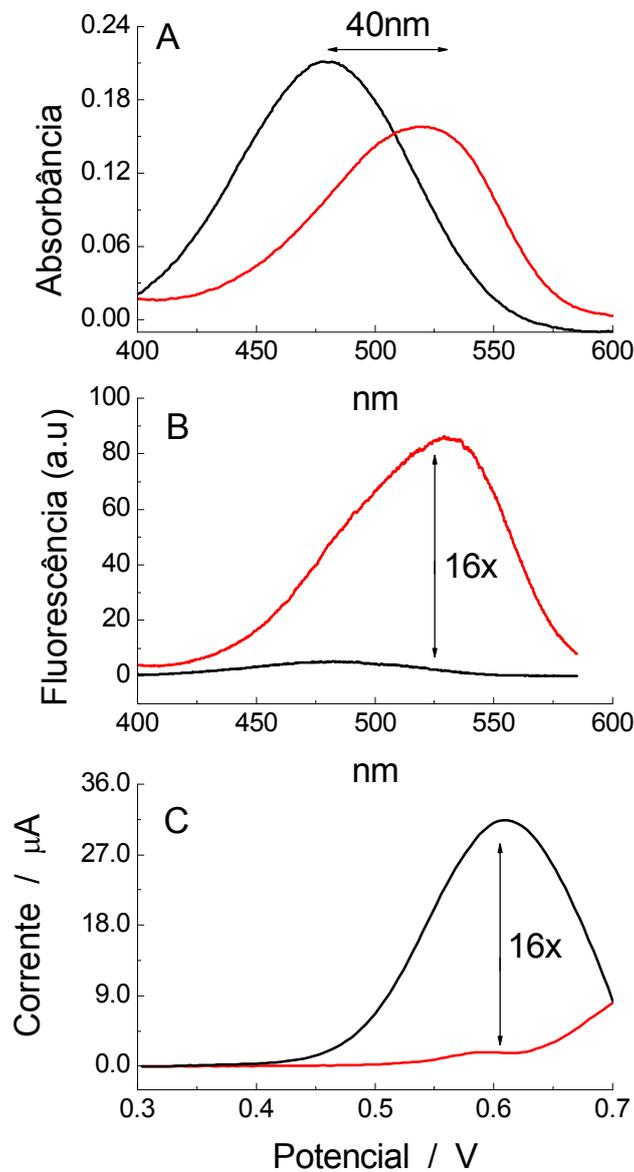


Figura 41: Medidas realizadas em tampão TE pH 8,0 com brometo de etídio ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) (–) e brometo de etídio ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) mais DNA de *Calf Thymus* ($240 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) (–) através de (A) Espectroscopia de UV-visível, (B) Espectroscopia de Fluorescência, emissão à 595 nm e (C) Voltametria de Pulso Diferencial, $v = 20 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, amplitude = 25 mV, duração do pulso = 60 ms.

BE apresenta um pico de absorbância a 480 nm, enquanto na presença de DNA há um deslocamento batocrômico para 519 nm e uma hipocromicidade de cerca de 25% [203]. O espectro de fluorescência apresenta uma diferença de cerca de 16 vezes de aumento de BE livre para BE/DNA. A oxidação eletroquímica do BE ocorre a maiores valores de corrente, coincidentemente, o mesmo aumento de 16 vezes observado no espectro de fluorescência, nas mesmas condições.

Quando BE se intercala, este muda de um ambiente hidrofílico para um hidrofóbico, à medida que a solução aquosa fica em contato com a região externa dos grupos fosfato do DNA e o BE se intercala entre os pares de bases, no ambiente hidrofóbico. A mudança no ambiente promove o deslocamento para a região do vermelho no espectro de UV-visível e, como a água é um inibidor de fluorescência, a intercalação promove um aumento na resposta fluorescente. Quando BE intercala, forma um aduto com DNA, o qual faz com que a absorção de luz fique mais difícil de ocorrer. Também há uma limitação na ressonância do anel aromático devido à interação com os pares de base, assim promovendo o efeito de hipocromicidade. O decréscimo de corrente nos experimentos eletroquímicos ocorre devido à dificuldade para o BE de alcançar a superfície do eletrodo de grafite quando intercalado e a inacessibilidade dos grupos oxidáveis, que estão interagindo com os pares de bases.

Com esta análise e visando construir um perfil de concentração, as concentrações de BE foram alteradas e foi adicionado NaCl em várias concentrações. A presença de sal nas soluções altera as interações do BE com DNA como pode ser visto nas Figuras 42 e 43:

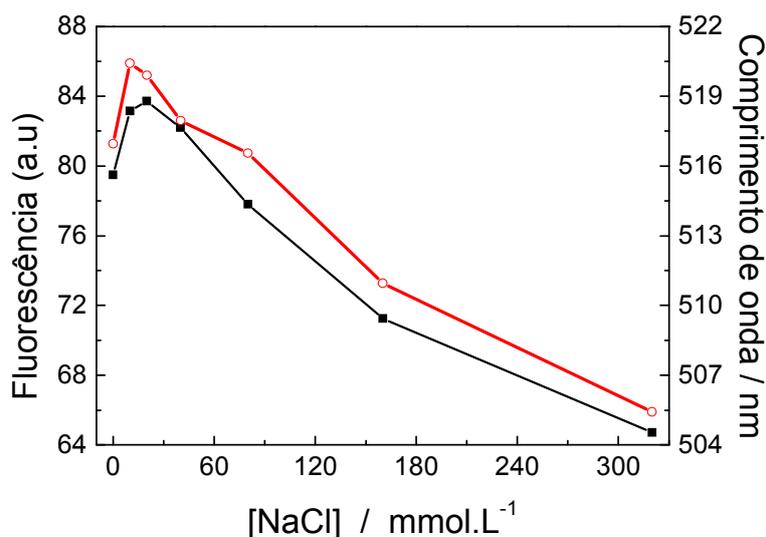


Figura 42: Perfis de sinais espectroscópicos de fluorescência (-■-) e UV-visível (-○-) mantendo a concentração de DNA de *Calf Thymus* ($240 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$) e de brometo de etídio a ($40 \mu\text{mol}.\text{dm}^{-3}$), mas variando a concentração de NaCl de 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e $640 \text{mmol}.\text{dm}^{-3}$.

Em uma concentração fixa de DNA e BE, é possível observar que há um aumento na intensidade de fluorescência, juntamente com um deslocamento no comprimento de onda no espectro de UV-visível até uma concentração de sal de 10-20 $\text{mmol}.\text{dm}^{-3}$. Após esse ponto, ocorre um decréscimo na intensidade de fluorescência e um deslocamento hipsocrômico. As variações nas respostas de fluorescência e de absorção com o acréscimo de sal podem ser justificadas, baseado que, em altas concentrações de sal os pares de bases de DNA se tornam mais compactos. Para que uma molécula de BE se intercale no plano das pares de bases há a necessidade de um desdobramento da dupla fita. Assim, a inserção de um anel de BE dentro do fragmento de DNA desdobra a dupla fita em 26° , reduzindo o ângulo de torção (por par de bases) de 36° para 10° [121]. À medida que se torna mais difícil desdobrar uma molécula compacta, BE perde grande parte do efeito intercalativo e, assim, as respostas diminuem, tendendo a voltar às respostas iniciais com BE livre. É importante ressaltar que a hipercromicidade, seguindo o efeito hipsocrômico com a adição de sal, não é muito expressiva, na medida em que há uma grande quantidade de BE ligado ao DNA. Para valores de sal entre 0 e $20 \text{mmol}.\text{dm}^{-3}$, há uma hipercromicidade de apenas 0,2%. Um efeito maior é verificado com altas adições de sal (os últimos dois valores de

concentração de NaCl nos gráficos). Os experimentos eletroquímicos realizados com alteração da concentração de sal pode ser visto na Figura 43:

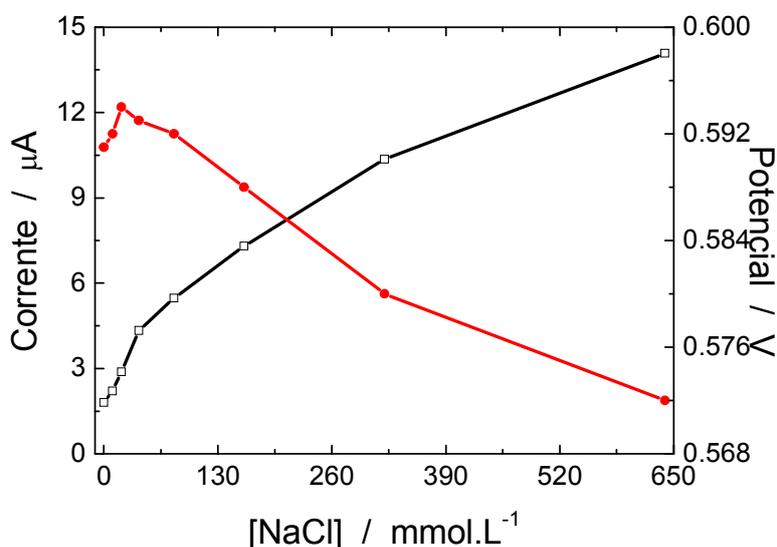


Figura 43: Perfis de sinais de corrente (—■—) e de potencial (—○—), mantendo a concentração de DNA de *Calf Thymus* ($240 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de brometo de etídio a ($40 \mu\text{mol.dm}^{-3}$), mas variando a concentração de NaCl de 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320 e 640 mmol.dm^{-3} .

Pela Figura 43, observa-se um aumento nos valores de potencial de oxidação até exatamente essa concentração de sal 20 mmol.dm^{-3} e um aumento de $1 \mu\text{A}$ nos valores de corrente, muito pequeno até esse mesmo valor de sal. Esse máximo é observado no trabalho de Ozsoz *et al.* [204], o qual descreve que forças eletrostáticas são predominantes a baixas forças iônicas na solução, enquanto que em altas forças iônicas interações intercalativas ocorrem.

Com a adição de sal, há um acréscimo nos valores de corrente. Após esse valor de sal, as correntes começam a aumentar com maior intensidade, aliado a um menor potencial de oxidação. O aumento de corrente indica que mais BE estaria acessível à oxidação e o menor potencial indica maior facilidade com que isso ocorre. Assim como o esperado pelos experimentos espectroscópicos, o limite nos valores de NaCl, indicando uma melhor intercalação, estão entre 10 e 20 mmol.dm^{-3} . Valores acima desses apontam perda na intensidade de intercalação, evidenciada pelo aumento de corrente, decréscimo de potencial, decréscimo de intensidade de fluorescência e

deslocamento hipsocrômico. Nesse ponto, uma concentração de 20 mmol.dm^{-3} foi escolhida para os experimentos seguintes. Mantendo a concentração de NaCl, foi alterado agora a concentração de BE, como pode ser visto nas Figuras 44 e 45:

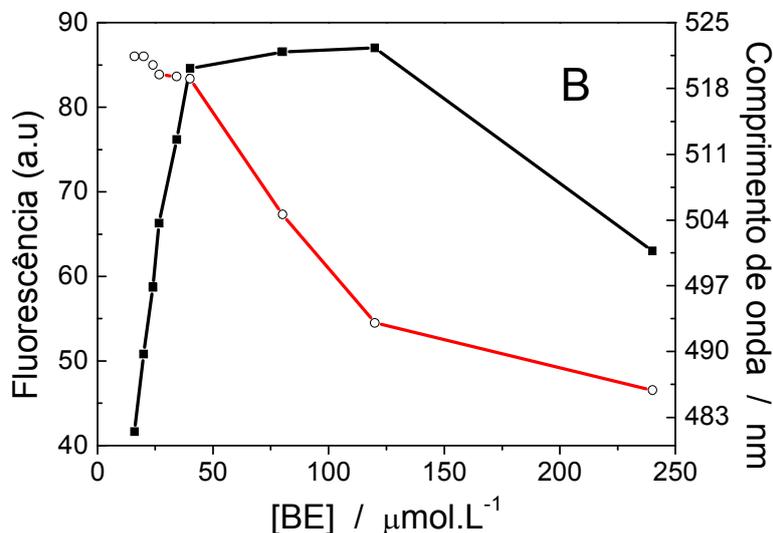


Figura 44: Perfis de sinais espectroscópicos de fluorescência (—■—) e espectroscopia de UV-visível (—○—), mantendo a concentração de DNA de *Calf Thymus* ($240 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de NaCl a (20 mmol.dm^{-3}), mas variando a concentração de brometo de etídio de 16, 20, 24, 26.67, 34.28, 40, 80, 120 e $240 \mu\text{mol.dm}^{-3}$.

Alterando as concentrações de BE foi observado na Figura 44 que ocorre um aumento linear na intensidade de fluorescência até o valor de $40 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ e um leve deslocamento para o azul na mesma região. A partir desse máximo, atingiu-se um platô na intensidade de fluorescência, não sendo observada alteração até a proporção BE/DNA de 1:1, na qual um decréscimo acentuado nos valores foi observada (63 u.a.). Este decréscimo pode ser devido ao excesso de BE não ligado levar a um mecanismo de inibição dinâmica, no qual excesso de BE inibe o estado estacionário da intensidade de fluorescência [205]. Também, Burns [206] descreveu que essa inibição seria por transferência não radioativa de energia para BE livre. Embora haja o platô na fluorescência, há um deslocamento perceptível para o azul no espectro UV-visível entre $40 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ e $80 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, indicando a perda da resposta de BE ligado ao DNA, tendendo a voltar à resposta inicial. Com os dados analisados pelas duas técnicas espectroscópicas, é possível afirmar que entre 40 e $80 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ BE ligado ao DNA

ocupa todos os sítios ativos. A partir desse ponto em diante, o excesso de BE fica restrito aos sítios externos do DNA, não o suficiente para inibir a fluorescência, mas sim para permitir que BE livre absorva luz, promovendo o deslocamento hipsocrômico. Os experimentos eletroquímicos levando em consideração a variação na concentração de BE pode ser visto na Figura 45:

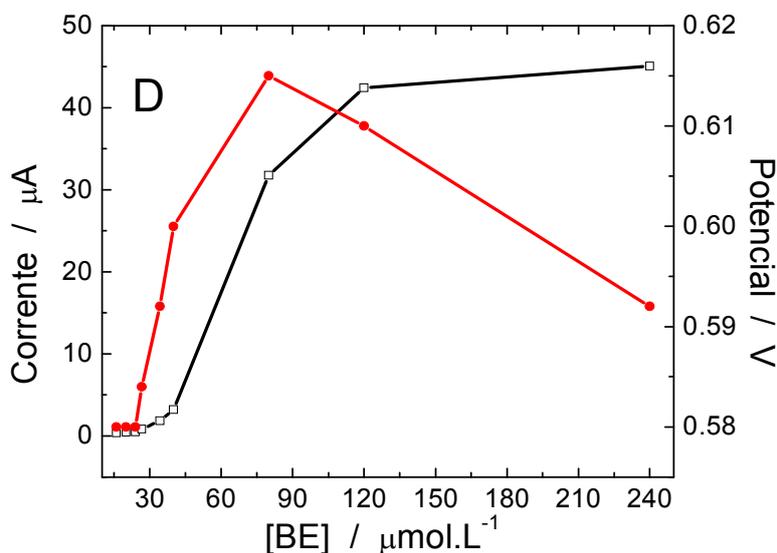


Figura 45: Perfis de sinais de corrente (—■—) e de potencial (—○—), mantendo a concentração de DNA de *Calf Thymus* ($240 \mu\text{mol.dm}^{-3}$) e de NaCl a (20mmol.dm^{-3}), mas variando a concentração de brometo de etídio de 16, 20, 24, 26.67, 34.28, 40, 80, 120 e $240 \mu\text{mol.dm}^{-3}$.

A mudança de concentração de BE provoca alterações nas respostas voltamétricas (Figura 45). Até a concentração de $40 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ há apenas um leve aumento na oxidação do BE (apenas $3 \mu\text{A}$). Porém, de 40 para $80 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, há um acréscimo significativo de $32 \mu\text{A}$, indicando presença de BE livre em solução. O potencial de oxidação ainda aumenta de 40 para $80 \mu\text{mol.dm}^{-3}$, tendendo a cair apenas no valor subsequente, indicando aumento de dificuldade de oxidação até pelo menos $80 \mu\text{mol.dm}^{-3}$. O aumento de 16 vezes na corrente é similar ao que Vardenyan *et al.* [181] observou em seus experimentos. A partir de $80 \mu\text{mol.dm}^{-3}$ a corrente ainda tende a aumentar, visto que mais BE livre está presente na solução e o potencial anódico tende a diminuir pelo mesmo motivo. Nesse ponto, através das técnicas voltamétricas e

espectroscópicas, valores entre 40 e 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ são os que apresentam os melhores resultados de intercalação de BE com DNA.

As análises feitas acima indicam que valores entre 10 e 20 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de NaCl e entre 40 e 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ de BE fornecem os melhores resultados para intercalação de DNA de *Calf Thymus* e BE. Ao invés de se trabalhar com valores aleatórios entre essas variáveis, a fim de se encontrar o melhor ponto, uma otimização através de planejamento fatorial a dois níveis foi realizada envolvendo BE, DNA e NaCl.

A tabela 4 compila os dados obtidos através de planejamento para três variáveis (na ordem de 2³). Os valores das variáveis e a resposta para o modelo de construção também podem ser vistos. Os efeitos das variáveis são mostrados na tabela 5:

Tabela 4: Planejamento Fatorial a dois níveis 2³ com ponto central para concentrações de DNA/EB/NaCl. Concentrações são dadas em $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, com exceção do NaCl, que é dado em $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. I.F para Intensidade de Fluorescência (a.u), nm para comprimento de onda, μA para corrente e V para potencial.

Variáveis reais			Variáveis escalonadas			I.F	nm	μA	V
[DNA]	[BE]	[NaCl]	X*	Y**	Z***				
120	40	10	-1	-1	-1	55,34	504,5	21,74	0,656
240	40	10	+1	-1	-1	80,25	519,5	2,21	0,592
120	80	10	-1	+1	-1	51,64	490,0	33,21	0,612
240	80	10	+1	+1	-1	80,60	505,5	29,28	0,612
120	40	20	-1	-1	+1	52,55	501,5	20,78	0,644
240	40	20	+1	-1	+1	84,58	520,5	2,89	0,594
120	80	20	-1	+1	+1	50,86	488,5	29,9	0,627
240	80	20	+1	+1	+1	86,00	504,0	29,73	0,622
180	60	15	0	0	0	70,06	506,5	30,76	0,628
180	31,72	20	0	$-\sqrt{2}$	+1	55,71	518,5	2,75	0,600
180	88,28	20	0	$+\sqrt{2}$	+1	74,15	497,5	35,93	0,628
95,15	60	20	$-\sqrt{2}$	0	+1	52,02	518,0	37,21	0,624
264,85	60	20	$+\sqrt{2}$	0	+1	91,61	506,1	10,82	0,603

$$* X = \frac{[\text{DNA}] - 180}{60} \quad (1)$$

$$** Y = \frac{[\text{EB}] - 60}{20} \quad (2)$$

$$*** Z = \frac{[\text{NaCl}] - 15}{5} \quad (3)$$

Tabela 5: Efeito das variáveis

	Efeito (para fluorescência) ¹	Efeito (para comprimento de onda) ²	Efeito (para corrente) ³	Efeito para potencial) ⁴
[DNA]	+30,26	+16,25	-10,38	-0,03
[BE]	-0,90	-14,50	+18,63	+0,003
[NaCl]	+1,54	+1,25	-0,78	+0,003
[DNA] + [BE]	+1,79	-0,75	+8,33	-0,027
[DNA] + [NaCl]	+3,33	+1,00	+1,35	+0,002
[BE] + [NaCl]	+0,77	-0,25	-3,65	+0,009
[DNA] + [BE] + [NaCl]	+3,32	+1,00	+0,53	-0,026

Desvio padrão (σ) para ¹ $\sigma = 0,46$ ² $\sigma = 1,05$ ³ $\sigma = 0,50$ ⁴ $\sigma = 0,006$

O escalonamento das variáveis DNA, BE e NaCl foi realizado através das equações (1), (2) e (3) para que as análises pudessem ser feitas na mesma proporção, visto que a concentração de NaCl apresenta valores na ordem de 10^3 maior do que para as outras variáveis. Desta forma, todos os mínimos e máximos estudados apresentam o mesmo valor na nova escala.

Observando os dados da Tabela 4 é possível identificar previamente o baixo efeito de NaCl nos sistemas, confirmado pelos baixos efeitos isolados em cada uma das técnicas utilizadas na Tabela 5. Os valores estão muito próximos do desvio padrão e seu

efeito entre 10 e 20 mmol.dm⁻³ não é suficientemente significativa para alterar as medidas em qualquer direção. Do mesmo modo as interações entre NaCl/BE e NaCl/DNA são muito pequenas. Isso significa que tanto um valor quanto o outro vão fornecer resultados muito semelhantes. As análises mostram que o principal efeito provém do DNA, indicando que ele é o responsável pelas maiores alterações em todos os sistemas. Os efeitos isolados do BE diferem de um experimento para outro e uma análise dos efeitos mais aprofundada deve ser feita. A identificação de efeitos significantes pode ser expressa em um gráfico normal, obtidos através do teste Z.

Supondo que o valor verdadeiro para cada efeito seja zero, os valores obtidos na tabela 5 devem refletir apenas os erros aleatórios do planejamento fatorial em análise, ou seja, valores que se distanciam de zero e que, para nós, interpretaremos como os efeitos significantes. Assim, podemos considerar uma amostra aleatória retirada de uma distribuição aproximadamente normal, com média populacional zero. Um gráfico normal dos valores dos efeitos pode ser traçado e pode-se usá-lo para testar a hipótese de que os efeitos não existem. Os dados utilizados para isso podem ser vistos na Tabela 6 e o gráfico normal na Figura 46:

Tabela 6: Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento fatorial e os valores de probabilidade cumulativa

Ordem	Efeito	Região de probabilidade cumulativa (%)	Ponto central	Valores de Z [207]
1	-14,5	0-3,57	1,785	-2,1
2	-10,38	3,57-7,14	5,355	-1,61
3	-3,65	7,14-10,71	8,925	-1,345
4	-0,9	10,71-14,28	12,495	-1,15
5	-0,78	14,28-17,85	16,065	-0,99
6	-0,75	17,85-21,42	19,635	-0,855
7	-0,25	21,42-24,99	23,205	-0,73
8	-0,03	24,99-28,56	26,775	-0,62
9	-0,027	28,56-32,13	30,345	-0,515
10	-0,026	32,13-35,70	33,915	-0,415
11	0,002	35,70-39,27	37,485	-0,32
12	0,003	39,27-42,84	41,055	-0,225
13	0,003	42,84-46,81	44,625	-0,135
14	0,009	46,81-49,98	48,195	-0,05
15	0,53	49,98-53,55	51,765	0,05
16	0,77	53,55-57,12	55,335	0,135
17	1	57,12-60,69	58,905	0,225
18	1	60,69-64,26	62,475	0,32
19	1,25	64,26-67,83	66,045	0,415
20	1,35	67,83-71,40	69,615	0,515
21	1,54	71,40-74,97	73,185	0,62
22	1,79	74,97-78,54	76,755	0,73
23	3,32	78,54-82,11	80,325	0,855
24	3,33	82,11-85,68	83,895	0,99
25	8,33	85,68-89,25	87,465	1,15
26	16,25	89,25-92,82	91,035	1,345
27	18,63	92,82-96,39	94,605	1,61
28	30,26	96,39-100	98,175	2,1

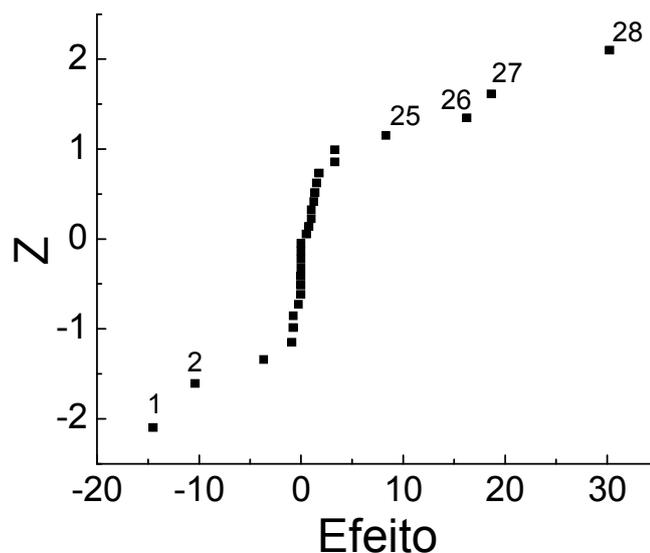


Figura 46: Gráfico normal para os efeitos, editado a partir dos dados da tabela 6.

Nesse teste, observa-se no gráfico que os pontos centrais se ajustam muito bem a uma reta que cruza a probabilidade acumulada de 50% praticamente sobre o ponto zero do eixo y. Portanto, podemos dizer que esses pontos seriam provenientes de uma população normal de média zero, ou seja, efeitos sem significado físico. Entretanto, os outros pontos numerados, que identificam a ordem dos experimentos na Tabela 6 não podem ser pensados como pertencentes à mesma população que produziu os pontos centrais da reta, pela sua distância da mesma. Estes são efeitos realmente significantes e quanto mais afastados da região central, mais significantes ainda. Desse modo, apenas os pontos enumerados (1,2,25,26,27 e 28) são significativos.

Dentre os efeitos, em nenhum deles estão presentes nos resultados obtidos para a variação de potencial. Realmente, seus resultados estão muito próximos do valor de desvio padrão e as diferenças entre um experimento e outro são muito pequenas, o que pode induzir a erros na análise. Do mesmo modo, os efeitos para NaCl não aparecem, o que confirma a análise feita anteriormente. Em todos outros experimentos, os efeitos mais significantes são os do DNA isolado utilizando todas as técnicas e BE nas análises de corrente e comprimento de onda. O único efeito de interação presente é o do DNA/BE por corrente. Isso nos permite dizer da importância das duas variáveis na construção de um modelo, principalmente nas análises por corrente, de onde o modelo, depois de construído poderá ser aplicado diretamente.

Baseado na pequena, porém visível melhora nos resultados quando se trabalha com 20 mmol.dm^{-3} (Figuras 42 e 44), os mapas dos planejamentos fatoriais foram construídos baseados nesse valor de sal, como pode ser visto na figura 47:

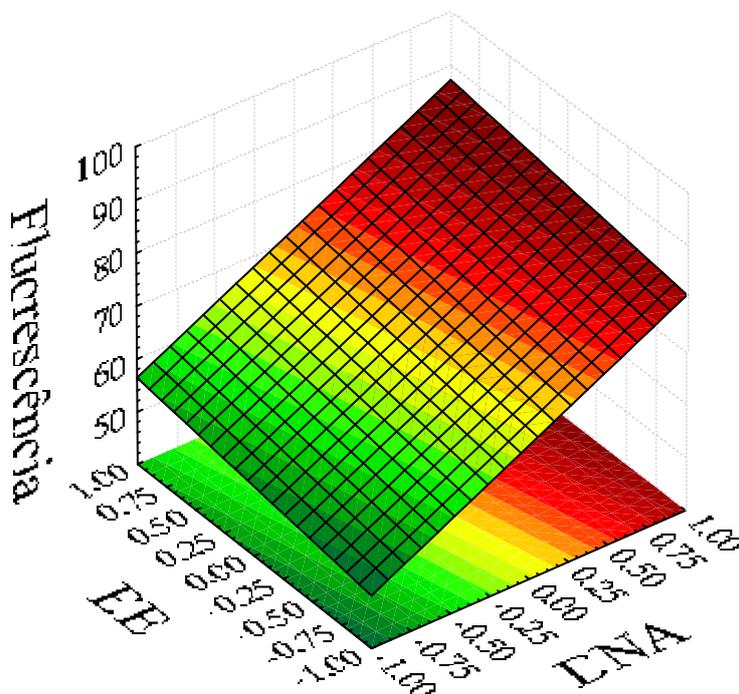


Figura 47: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de *DNA de Calf Thymus* e brometo de etídio.

Em relação aos dados obtidos por espectroscopia de fluorescência, o sinal do efeito é positivo para o DNA e negativo para o BE. Isso indica que há uma tendência de melhor resposta com o aumento e a diminuição de concentração de DNA e BE, respectivamente. Como pode ser observada, a região de resposta mais intensa aponta para as tendências da Tabela 5, maiores para maiores concentrações de DNA. Todos os valores utilizados entre o máximo e o mínimo de BE utilizando o máximo de DNA apresentam a mesma intensidade, o que é esperado, visto que os valores de fluorescência na Figura 44 são pouco diferentes (região do patamar). A equação obtida do mapa do planejamento fatorial é

$$\text{Intensidade de Fluorescência} = 68,6156 + 15,3949 * x + 3,226 * y,$$

Onde x e y representam a concentração de DNA e BE, respectivamente. Nesse ponto, utilizando as intensidades de fluorescência, os melhores valores são obtidos para o máximo de concentração de DNA e para todo o intervalo de BE. Como queremos valores específicos para BE e DNA, planejamentos fatoriais realizados pelas outras técnicas foram feitos. Na Figura 48, o mapa para os valores de comprimento de onda:

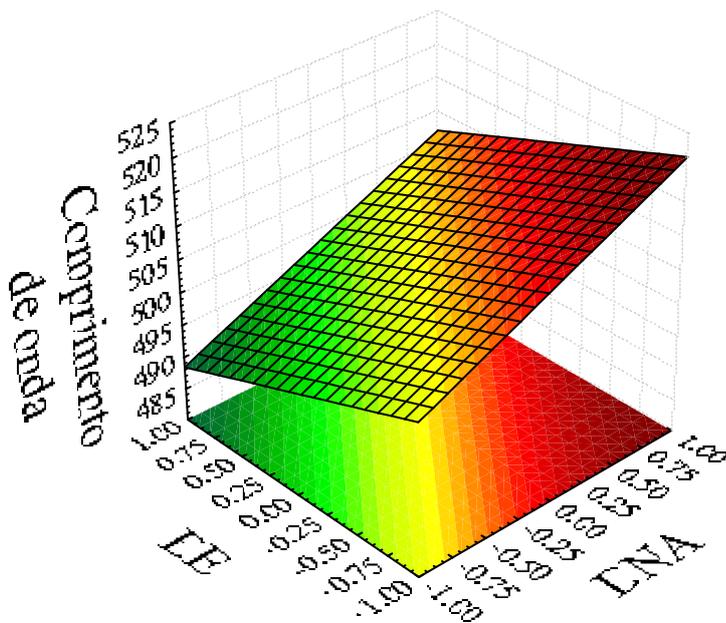


Figura 48: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de *Calf Thymus* e brometo de etídio.

Utilizando os valores de comprimento de onda, observa-se que o aumento da concentração de DNA acompanha a diminuição nos valores de BE da mesma maneira que para os espectros de fluorescência. A equação do mapa demonstra isso:

$$\text{Comprimento de onda} = 505,0178 + 9,1739 * x - 7,3998 * y,$$

em que o sinal positivo para a coordenada x e negativo para y confirmam essa tendência, juntamente com o gráfico da Figura 44. Como obtido no mapa para as intensidades de fluorescência, quanto maior a concentração de DNA, maiores os valores e maior o deslocamento batocrômico, indicando mais sítios de DNA ocupados por BE. Na mesma linha, quanto menor a quantidade de BE, maior o sinal de intercalação.

Nesse ponto, ao que indica, 20 mmol.dm⁻³ de NaCl e 40 μmol.dm⁻³ de BE são os pontos de melhor resultado através dos experimentos de planejamento fatorial.

Os resultados eletroquímicos confirmam essa tendência (Figura 49):

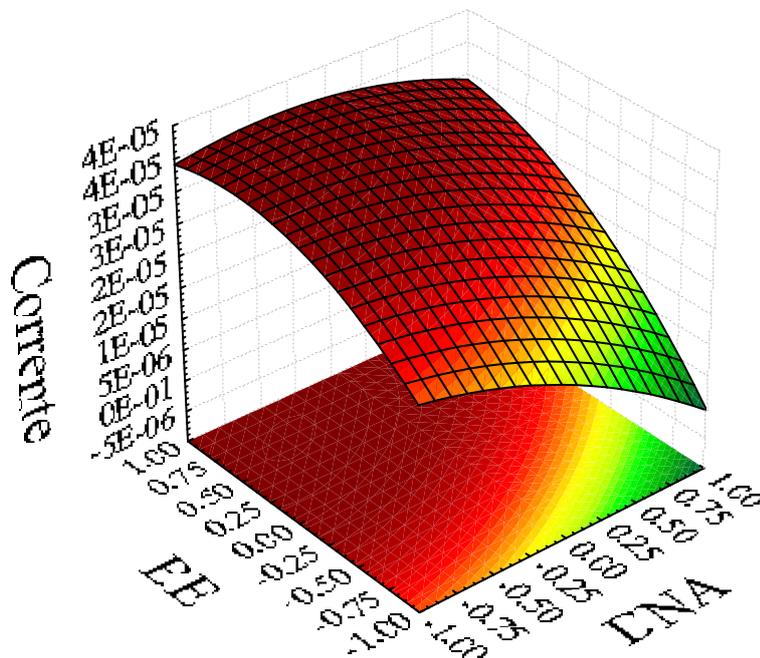


Figura 49: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de *Calf Thymus* e brometo de etídio.

Ao contrário do sistema avaliado nos gráficos anteriores, o sinal dos efeitos é negativo para DNA e positivo para BE. Isso é devido ao aumento de intercalação, diminuindo os sítios ativos de BE para oxidação, provocando um decaimento de corrente. Assim, quanto mais DNA e menos BE, menor a resposta de corrente. Logicamente, quanto maior a concentração de BE, maior a possibilidade dele se encontrar livre e, assim, aumentar a resposta de oxidação. O efeito em conjunto de DNA/BE é mais alto do que nos outros experimentos o que indica que a alteração dos dois parâmetros é benéfica para o sistema. A equação dada pelo mapa é

$$\text{Corrente} = 3,076 \times 10^{-5} - 6,9232 \times 10^{-6} * x + 1,036 \times 10^{-5} * y - 3,5852 \times 10^{-6} * x * x + 4,431 \times 10^{-6} * x * y - 5,9233 \times 10^{-6} * y * y,$$

Nesse caso foi necessário utilizar uma equação de segunda ordem com a utilização de mais quatro experimentos, conhecidos com planejamento tipo estrela. Através do gráfico é nítida a região de mínimo, ao máximo de concentração de DNA ($240 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) e mínimo de BE ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Os dados são consistentes com os experimentos de fluorescência e de UV-visível para planejamento aliados aos experimentos da Figura 44. Para finalizar, o mapa gerado devido à variação no potencial foi construído (Figura 50):

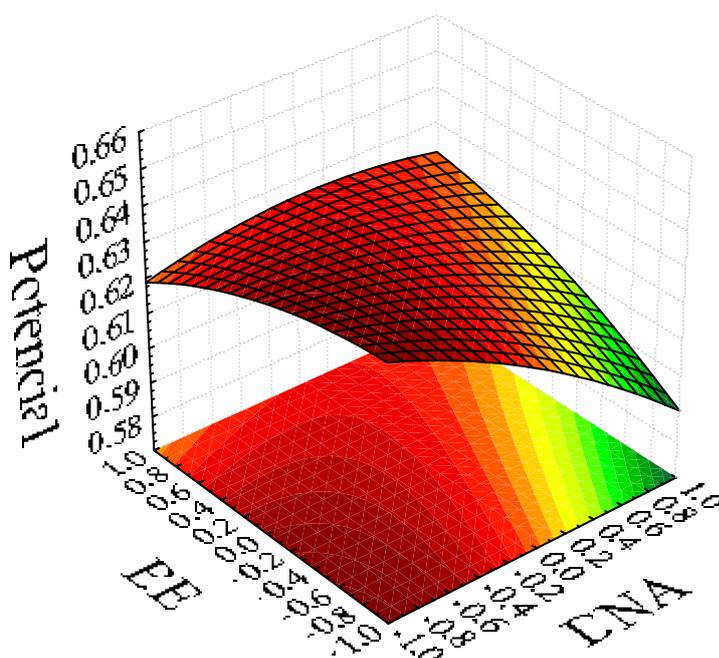


Figura 50: Planejamento Fatorial a dois níveis para otimização de DNA de *Calf Thymus* e brometo de etídio.

As variações no potencial apresentam um perfil diferente dos demais. Há uma região de concentração mais intensa entre os valores de DNA e BE, surgindo como uma “faixa” de alta intensidade. Potenciais mais elevados indicam uma maior intercalação devido à maior dificuldade ao se oxidar o BE. Altos e baixos valores de DNA e BE, respectivamente, apresentam maiores respostas porque o potencial é independente da concentração do DNA, se a proporção se mantém. Isso pode ser observado pelos efeitos das variáveis na Tabela 5, onde nenhum elemento apresenta efeito significativo. As

proporções sendo mantidas, independente das concentrações, variam os valores de corrente diretamente, porém, não os valores de potencial. Ou seja, pouca, quase nenhuma variação no potencial é observado quando se usa as maiores e as menores concentrações de DNA e BE (240/80 e 120/40 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$) Assim, o mesmo perfil é esperado para DNA à 240 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ e BE à 80 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ e para DNA 120 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ e BE 40 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$. A equação obtida do mapa é

$$\text{Potencial} = 0,628 - 0,0124 * x + 0,0022 * y - 0,0052 * x * x + 0,0136 * x * y - 0,005 * y * y.$$

A compilação dos dados apresentados acima mostram que a utilização da proporção 6:1 de DNA de *Calf Thymus* e BE, juntamente com 20 mmol.dm^{-3} de NaCl nas condições utilizadas em tampão TE, pH 8,0, apresentam as melhores respostas eletroquímicas e espectroscópicas. O planejamento para os valores de potencial mostram um perfil diferente, indicando a proporção de 3:1 como a proporção dos melhores resultados. Porém, além dos resultados obtidos pelos outros parâmetros terem sido bastante expressivos, os valores de potencial não apresentam significância no modelo e podem indicar artefatos nos sistemas.

Dessa maneira, a utilização dessa proporção de DNA e BE (6:1) encontrada, poderá ser utilizada como base nos estudos de síntese e caracterização de novas drogas intercalantes.

5. Conclusão

O poli(3-aminofenol) foi formado sobre eletrodos de carbono grafite com sucesso. Os estudos térmicos e de estabilidade eletroquímica comprovaram baixa perda de atividade. Associada com a possibilidade de funcionalizações na superfície do polímero, a matriz foi escolhida para a construção de genossensores para detecção do câncer de próstata e hepatite C.

Os genossensores para identificação do câncer de próstata e da hepatite C foram construídos com sucesso sobre matriz de poli(3-aminofenol). As detecções foram medidas através do sinal obtido da oxidação do intercalador de DNA brometo de etídio, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial.

Experimentos também foram realizados para confirmação das imobilizações, por espectroscopia de impedância eletroquímica. Os resultados diferenciam qualitativamente os sistemas contendo apenas o polímero, sonda e alvos complementares. Há uma diminuição nos valores de resistência ao se adicionar a sonda no polímero o que sugere que, além da detecção da sonda, a análise de uma possível interação entre os grupos fosfato do DNA e das funcionalizações do polímero (grupos amino ou hidroxila). Com a adição do alvo complementar há um aumento nos valores de resistência devido à repulsão com os grupos fosfato do DNA hibridizado formado, indicando a presença dos materiais biológicos, confirmando as imobilizações.

Os parâmetros de detecção foram otimizados e a concentração de brometo de etídio utilizada foi de $0,54 \text{ mmol.dm}^{-3}$, tempo de hibridização do alvo de 15 minutos e testes de interferentes utilizando alvos não-complementares foram realizados com sucesso.

O limite de detecção foi de 16 ng e 19 ng e o limite de quantificação foi de 54 ng e 64 ng, para câncer de próstata e vírus da hepatite C, respectivamente. Os genossensores se mostraram estáveis por 2 meses de armazenamento.

Experimentos de intercalação, utilizando espectroscopia de UV-visível, de fluorescência, e voltametria de pulso diferencial foram realizados utilizando brometo de etídio e DNA de *Calf Thymus* e os resultados foram coerentes com a literatura. Foi construído um modelo através de planejamento fatorial para se descobrir a melhor proporção de interação entre ambos, visando construir um sistema para detecção de

novos compostos intercalantes. Foi encontrado pelo sistema a proporção de 6DNA:1BE, utilizando a concentração de 20 mmol.dm^{-3} de NaCl.

Para validação dos modelos de otimização, testes com drogas intercalantes e não-intercalantes deverão ser realizadas. Para os genossensores, os sistemas devem ser miniaturizados e testados com amostras reais.

6. Agradecimentos

Ao CNPq, à CAPES, à FAPEMIG, à PROPP/UFU.

7. Referências Bibliográficas

- [1] S.M. Nettina. **Prática de Enfermagem**. Volume 2, 8ªed, Brunner, Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ. (2007), p. 672.
- [2] S. Mukhopadhyay, R.J. Kuhn, M.G. Rossmann. **A structural perspective of the flavivirus life cycle**. *Nature Reviews Microbiology* 3 (2005) 13-22;
- [3] S.R. Matos, R. da Costa. **Fibromialgia: aspectos etiopatogênicos e papel do vírus da Hepatite C**. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. 2 (2003) 240-250.
- [4] Q-L Choo, A.J. Weiner, L.R. Overby, D.W. Bradley, M. Houghton. **Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome**. *Science* 244 (1989) 359-362.
- [5] Ç. Eroglu, E. Pinarbasi. **Hepatitis C Virus: Genome Organization, Viral Proteins and Implications in Disease Pathogenesis**. *Turkish Journal of Biology*. 24 (2000) 253-269.
- [6] M. Anzola, J.J. Burgos. **Hepatitis C virus (HCV): model structure and genome organisation**. *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 5 (2003) 19.
- [7] T. Wakita, T. Pietschmann, T. Kato, T. Date, M. Miyamoto. **Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome**. *Nature Medicine*. 11 (2005) 791–796.
- [8] K. Blight, E. Gowans. **In situ hybridization and immunohistochemical staining of hepatitis C virus products**. *Viral Hepatitis Reviews*, 1 (1995) 143-155.
- [9] V.R. Perugini, C. Montpellier, D. Delgrange, C. Wychowski, F. Helle, A. Pillez, H. Drobecq, F.L. Naour, S. Charrin, S. Levy, E. Rubinstein, J. Dubuisson, L. Cocquerel. **The CD81 Partner EWI-2wint Inhibits Hepatitis C Virus Entry**. *Plos One*. 3 (2008) 1-12.

-
- [10] B. Bartosch, J. Dubuisson, F.L. Cosset. **Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes.** *Journal of Experimental Medicine.* 197 (2003) 633-642.
- [11] K. Shetty, G.Y. Wu. **Clinical Gastroenterology. Chronic Viral Hepatitis. Diagnosis and Therapeutics.** *Humana Press, Springer*, New York, NY, USA, 2009, p. 17,18.
- [12] P. Simmonds, D.B. Smith, F. Mcomish, P.L. Yap, J. Kolberg, M.S. Urdea, E.C. Holmes. **Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions.** *Journal of General Virology.* 5 (1994) 1053 – 1061.
- [13] J. Bukh, R.H. Miller, R.H. Purcell. **Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes.** *Seminars in Liver Disease.* 15 (1995) 41-63.
- [14] C. Fouriner, C. Sureau, J. Coste, J. Ducos, G. Pageaux, D. Larrey, J. Domergue, P. Maurel. **In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus.** *Jornal of General Virology.* 79 (1998) 2367-2374.
- [15] R.M.B. Martins, S.A. Teles, N.R. Freitas, A.R.C. Motta-Castro, F.J.D. Souto, A.H. Mussi. **Distribution of hepatitis C virus genotypes among blood donors from Mid-West region of Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.* 48 (2006) p. 1-3.
- [16] World Health Organization, <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/Hepc.pdf>, WHO, *Hepatitis C, 2003*, acessado em 23/11/2010.
- [17] C.W. Shepard, L. Finelli, M.J. Alter. **Global epidemiology of hepatitis C virus infection.** *Lancet Infection Diseases.* 5 (2005) 558-567.
- [18] J. Gabriel. **The Biology of Cancer.** 2nd edition, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, Inglaterra. (2007).

[19] F.L.O. Hering, M. Srougi. **Adenocarcinoma da próstata: correlação entre o valor sérico do PSA pré-operatório, doença extraprotástica e progressão do tumor.** São Paulo: Platina, 1995.

[20] M. Srougi, S.D. Simon. **Câncer de próstata: câncer urológico.** São Paulo: Platina, 281-359, 1996.

[21] 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.

[22] The American Joint Committee on Cancer : <http://www.cancerstaging.org/> acessado em 23/11/2010

[23] D.F. Gleason. **The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma.** In Tannenbaum M (ed.) *Urologic Pathology: The Prostate.* Lea and Febiger, Philadelphia, 1977; 171-198.

[24] www.inca.gov.br. Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2010, acessado em 23/11/2010.

[25] A.B.M. Brandão, S.C. Fuchs, M.A.A. Silva, L.F. Emer. **Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura.** *Pan American Journal of Public Health.* 9 (2001) 161-168.

[26] NIH Expert Panel. **NIH Consensus Statement on Management of Hepatitis C: 2002.** *NIH Consensus State Science Statements* 19 (2002) 1-46.

[27] M. Sherman, V. Bain, J.O. Villeneuve. **The management of chronic viral hepatitis: a Canadian consensus conference.** *Canadian Journal of Gastroenterology.* 18 (2004) 715-728.

-
- [28] M de Medina, E.R. Schiff. **Hepatitis C: diagnostic assays.** *Seminars in Liver Disease.* 15 (1995) 33–40.
- [29] G.L. Davis. **Hepatitis C.** In: E.R. Schiff, M.F. Sorrell, W.C. Maddrey, eds. *Schiff's Diseases of the Liver.* 8th ed. Philadelphia: Lippincott- Raven Publishers; 1999. p. 793–836.
- [30] D.R. Gretch, J.J. Wilson, R.L. Carithers Jr, C. Rosa, J.H. Han, L. Corey. **Detection of hepatitis C virus RNA: Comparison of one-stage polymerase chain reaction (PCR) with nested-set PCR.** *Journal of Clinical Microbiology.* 31 (1993) 289–291.
- [31] S. Kwok, R. Higushi. **Avoiding false positives with PCR** [published erratum appears in *Nature* 339 (1989) 490]. *Nature* 339 (1989) 237-238.
- [32] H.L. Zaaijer, H.T.M. Cuypers, H.W. Reesink, I.N. Winkel, G. Gerken, P.N. Lelie. **Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus.** *Lancet* 341 (1993) 722-724.
- [33] P. Cacoub, V. Ratziu, R.P. Myers, P. Ghillani, J.C. Piette, J. Moussalli, T. Poynard. **Impact of treatment on extra hepatic manifestations in patients with chronic hepatitis C.** *Journal of Hepatology.* 36 (2002) 812-818.
- [34] J. Saldanha, N. Lelie, A. Heath. **Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA.** *WHO Collaborative Study Group. Vox Sanguinis* 76 (1999) 149–158.
- [35] C.G. Schüttler, G. Caspari, C.A. Jursch, W.R. Willems, W.H. Gerlich, S. Schaefer. **Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA.** *Lancet* 355 (2000) 41–42.

[36] HEMO em revista, julho/agosto/setembro, 2008, <http://www.sbhh.com.br/biblioteca/hemo-revista/pag22a26.pdf>, acessado em 23/11/2010.

[37] **The American Urological Association Prostate Cancer Clinical Guidelines Panel, The Management of Localized Prostate Cancer, A patient's Guide.** **Members:** R.G. Middleton, MD, Co-Chair, I.M. Thompson, MD, Co-Chair, M.S. Austenfeld, MD, Facilitator, W.H. Cooner, MD, R.J. Correa, MD, R.P. Gibbons, MD, H.C. Miller, MD, J.E. Oesterling, MD, M.I. Resnick, MD, S.R. Smalley, MD, J.H. Wasson, MD. **Consultants:** C.G. Roehrborn, MD, H.S. Bell, PhD, B. Blumenstein, PhD, S. Optenberg, Dr. PH, P.M. Florer, C. Colby, Editor.

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

[39] H. Lilja. **Regulation of the enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular protease inhibitors in prostate cancer.** *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation.* 55 (1995) 47–56.

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

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

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

[43] S.J. Feigenberg, A.L. Hanlon, E.M. Horwitz, R.G. Uzzo, D. Eisenberg, A. Pollack. **A prostate specific antigen (PSA) bounce greater than 1.4 ng/mL Is clinically significant after external beam radiotherapy for prostate cancer.** *American Journal of Clinical Oncology*. 29 (2006) 458-462.

[44] G. Severi, V.M. Hayes, P. Neufing, E.J. Padilla, W.D. Tilley, S.A. Eggleton, H.A. Morris, D.R. English, M.C. Southey, J.L. Hopper, R.L. Sutherland, P. Boyle, G.G. Giles. **Variants in the prostate-specific antigen (PSA) gene and prostate cancer risk, survival, and circulating PSA.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*. 15 (2006) 1142-1147.

[45] L.R. Goulart, J. Meola, J.D.D. Oliveira, A.F. Neves, J.R. Oliveira, S.A. Borba, L.D. Prado. **Genética molecular aplicada ao diagnóstico do câncer de próstata.** *Urologia Contemporânea*: 1-4, 2003.

[46] L.R. Goulart, J.D.D. Oliveira, A.F. Neves, J.R. Oliveira, A.C.M. Saraiva. **Prostate cancer diagnostics, tumor staging, disease recurrence and clinical management by analyses of multiple molecular markers.** *European Urology Supplements*. 2, 156-156, 2003.

[47] J. Meola. **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.

[48] S. Kintzios, E. Pistola, J. Konstas, F. Bem, Th. Matakias, N. Alexandropoulos, I. Biselis, R. Levin. **The application of the bioelectric recognition assay for the detection of human and plant viruses: definition of operational parameters.** *Biosens. Bioelectron*. 16 (2001) 467-480.

[49] Mousty, C. **Sensors and biosensors based on clay-modified electrodes--new trends.** *Applied Clay Science*. 27 (2004) 159-177.

-
- [50] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson. **Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification.** *Pure and Applied Chemistry*. 71 (1999) 2333–2348.
- [51] L. C. Clark, C. Lyons. **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery.** *Annals of the New York Academy of Science*. 102 (1962) 29-45.
- [52] J.D. Newman, A.P.F. Turner. **Home blood glucose biosensors: a comercial perspective.** *Biosensors and Bioelectronics*. 20 (2005) 2435-2453.
- [53] J. Wang. **Electrochemical glucose biosensors.** *Chemical Reviews*. 108 (2008) 814-825.
- [54] B. Zhang, J. Yao, H. Yan, W. Fu. **Specific binding DNA-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the study of NF- κ B.** *Sensors and Actuators B: Chemical*. 149 (2010) 259-263.
- [55] K. Laxminarayana. **A review of atomic force microscopy imaging systems: application to molecular metrology and biological sciences.** *Mechatronics*. 14 (2004) 907-945.
- [56] N.R. Frómeta. **Cantilever Biosensors.** *Biotechnologia Aplicada*. 23 (2006) 320-323.
- [57] K. Lee, L.K. Povlich, J. Kim. **Recent advances in fluorescent and colorimetric conjugated polymer-based Biosensors.** *Analyst*. 135 (2010) 2179-2189.
- [58] Protein Research Products, www.kpl.com, acessado em 23/11/2010.
- [59] Thermo Scientific Pierce Protein, www.piercenet.com, acessado em 23/11/2010.
- [60] BioVision life science source, www.biovision.com, acessado em 23/11/2010.

[61] Bioassay Systems, Solutions for Research and Drug Discovery, www.bioassaysys.com, acessado em 23/11/2010.

[62] Anaspec Eurogenetic Group, www.anaspec.com, acessado em 23/11/2010.

[63] R.M. Nakamura, Y. Kasahara, G.A. Rechnitz. **Immunochemical Assays and Biosensor Technology for the 1990s**. Washington, DC, USA. Capítulo 11 (1992) p.216.

[64] A. Chovin, P. Garrigue, N. Sojic. **Electrochemiluminescent detection of hydrogen peroxide with an imaging sensor array**. *Electrochimica Acta*. 49 (2004) 3751-3757.

[65] M.E. Bosch, A.J.R. Sánchez, F.S. Rojas, C.B. Ojeda. **Recent Development in Optical Fiber Biosensors**. *Sensors*. 7 (2007) 797-859.

[66] M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi. **Fiber-optic biosensors – an overview**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 372 (2002) 664–682.

[67] L.M. Lechuga, A. Calle, F. Prieto. **Optical sensors based on evanescent field sensing. Part 1. Surface Plasmon Resonance Sensors**. *Química Analítica*. 19 (2000) 54–60.

[68] H.M. Haake, A. Schütz, G. Gauglitz. **Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors**. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 366 (2000) 576–585.

[69] J.S. Steinhart, S.R. Hart. **Calibration curves for thermistors**. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*. 15 (1968) 497-503.

[70] K. Ramanathan, B. Danielsson. **Principles and applications of thermal biosensors**. *Biosensors and Bioelectronics* 16 (2001) 417–423.

-
- [71] Y. Zhang, S. Tadigadapa. **Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels.** *Biosensors and Bioelectronics.* 19 (2004) 1733–1743.
- [72] Y-H. Zheng, T-C. Hua, D-W. Sun, J-J. Xiao, F. Xu, F-F. Wang. **Detection of dichlorvos residue by flow injection calorimetric biosensor based on immobilized chicken liver esterase.** *Journal of Food Engineering.* 74 (2006) 24–29.
- [73] S. Vermeir, B. M. Nicola, P. Verboven, P. Van Gerwen, B. Baeten, L. Hoflack, V. Vulsteke, J. Lammertyn. **Microplate Differential Calorimetric Biosensor for Ascorbic Acid Analysis in Food and Pharmaceuticals.** *Analytical Chemistry.* 79 (2010) 6119-6127.
- [74] M.L. Antonelli, D. Lelo, R.F. Tornelli. **A microcalorimetric enzymatic method for trehalose determination in food.** *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry.* 97 (2009) 835–838.
- [75] L.M. Ahmad, B. Towe, A. Wolf, F. Mertens, J. Lerchner. **Binding event measurement using a chip calorimeter coupled to magnetic beads.** *Sensors and Actuators B.* 145 (2010) 239–245.
- [76] M. Pumera, S. Sánchez, I. Ichinose, J. Tang. **Electrochemical Nanobiosensors.** *Sensors and Actuators B:Chemical.* 123 (2007) 1195-1205.
- [77] R. Issa, N.A. Hamdan, M.F.M. Noh. **Differential Pulse Voltammetric determination of DNA hybridization using Methylene Blue on screen printed carbon electrode for the detection of Mycobacterium tuberculosis.** *Biotechnology.* 9 (2010) 304-311.
- [78] J. Wang. **Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 19 (1999) 47-53.

-
- [79] S. Tsujimura, A. Nishina, Y. Kamitaka, K. Kano. **Coulometric D-fructose biosensor based on direct electron transfer using D-fructose dehydrogenase.** *Analytical Chemistry*. 81 (2009) 9383–9387.
- [80] B.P. Ting, J. Zhang, Z. Gao, J.Y. Ying. **A DNA biosensor based on the detection of doxorubicin-conjugated Ag nanoparticle labels using solid-state voltammetry.** *Biosensors and Bioelectronics*. 25 (2009) 282–287.
- [81] A.J. Bard, L.R. Faulkner. **Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications.** John Wiley and Sons, 1980, USA.
- [82] P. Malinowski, I. Grzegorzóka, A. Michalska, K. Maksymiuk. **Dual potentiometric and UV/Vis spectrophotometric disposable sensors with dispersion cast polyaniline.** *Journal of Solid State Electrochemistry*. 14 (2010) 2027-2037.
- [83] T-M. Pan, M-D. Huang, W-Y. Lin, M-H. Wu. **A urea biosensor based on pH-sensitive Sm₂TiO₅ electrolyte-insulator-semiconductor.** *Analytica Chimica Acta*. 669 (2010) 68-74.
- [84] A. Bonanni, M.del Valle. **Use of nanomaterials for impedimetric DNA sensors: A review.** *Analytica Chimica Acta*. 678 (2010) 7-17.
- [85] E.A.H. Hall, N.G. Skinner. **The relevance of an equivalent circuit for polyaniline using immittance spectroscopy.** *Synthetic Metals*. 63 (1994) 133-145.
- [86] R.D. Armstrong, A. Hamnett, P. Christensen, D.C. Read, B.W. Johnson. **Impedance characteristics of conducting polythiophene films.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 364 (1994) 103-109.
- [87] Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme, acessado em 23/11/2010.

[88] A.L. Lehninger in. Principles of Biochemistry, 4th edition, David L. Nelson, Michael M. Cox, 2004.

[89] J.B. Sumner. **The chemical nature of enzymes.** *Nobel Lecture, December 12, 1946.*

[90] YSI LifeSciences - Data for Life, www.ysilifesciences.com, acessado em 23/11/2010.

[91] X. Han, Y. Zhu, X. Yang, C. Li. **Amperometric glucose biosensor based on platinum nanoparticle encapsulated with a clay.** *Microchimica Acta.* 2010, IN PRESS, DOI 10.1007/s00604-010-0424-z.

[92] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, A. Hernández-Martín, M.J. Arcos-Martínez. **Horseradish peroxidase covalent grafting onto screen-printed carbon electrodes for levetiracetam chronoamperometric determination.** *Analytical Biochemistry.* 395 (2009) 86–90.

[93] A.S. Hernández-Cázares, M-C. Aristoy, F. Toldrá. **Hypoxanthine-based enzymatic sensor for determination of pork meat freshness.** *Food Chemistry.* 123 (2010) 949–954.

[94] C.B.S. Roepcke, S.B. Muench, H. Schulze, T. Bachmann, R.D. Schmid, B. Hauer. **Analysis of Phosphorothionate Pesticides Using a Chloroperoxidase Pretreatment and Acetylcholinesterase Biosensor Detection.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 58 (2010) 8748–8756.

[95] S. Bidmanova, R. Chaloupkova, J. Damborsky, Z. Prokop. **Development of an enzymatic fiber-optic biosensor for detection of halogenated hydrocarbons.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* 398 (2010) 1891-1898.

[96] T.V.S. Santos. **Bioeletrodo para detecção da amilase salivar humana.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Uberlândia, 2010.

[97] F. Fernández, K. Hegnerová, M. Piliarik, F. Sanchez-Baeza, J. Homola, M-P. Marco. **A label free and portable multi channel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples.** *Biosensor and Bioelectronics*. 2010, IN PRESS, doi:10.1016/j.bios.2010.06.012.

[98] R.E. Ionescu, C. Gondran, L. Bouffier, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier. **Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of atrazine.** *Electrochimica Acta*. 55 (2010) 6228–6232.

[99] H. Zhao, C. Xue, T. Nan, G. Tan, Z. Li, Q.X. Li, Q. Zhang, B. Wang. **Detection of copper ions using microcantilever immunosensors and enzyme-linked immunosorbent assay.** *Analytica Chimica Acta*. 676 (2010) 81–86

[100] S. Boujday, S. Nasri, M. Salmain, C-M. Pradier. **Surface IR immunosensors for label-free detection of benzo[a]pyrene.** *Biosensors and Bioelectronics*, 2010. doi:10.1016/j.bios.2010.08.031

[101] M. Dequaire, C. Degrand, B. Limoges. **An electrochemical Metalloimmunoassay based on Colloidal Gold Label.** *Analytical Chemistry*. 72 (2000) 5521-5528.

[102] N. Kresge, R.D. Simoni, R.L. Hill. **Chargaff's rules: the work of Erwin Chargaff.** *The Journal of Biological Chemistry*. 280 (2005) 172-174.

[103] J.D. Watson, F.H.C. Crick. **Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.** *Nature*. 171 (1953) 737-738.

[104] A. Uygun. **DNA hybridization electrochemical biosensor using a functionalized polythiophene.** *Talanta*. 79 (2009) 194-198.

-
- [105] L-L. Li, H. Cai, T.M-H. Lee, J. Barford, I-M. Hsing. **Electrochemical Detection of PCR Amplicons Using Electroconductive Polymer Modified Electrode and Multiple Nanoparticle Labels.** *Electroanalysis*. 16 (2004) 81-87.
- [106] T.G. Drummond, M.G. Hills, J.K. Barton. **Electrochemical DNA sensors.** *Nature. Biotechnology*. 21 (2003) 1192-1199.
- [107] B. Meric, K. Kerman, D. Ozkan, P. Kara, M. Ozsoz. **Indicator-Free Electrochemical DNA Biosensor Based on Adenine and Guanine Signals.** *Electroanalysis*. 14 (2002) 1245-1250.
- [108] W. Yang, M. Ozsoz, D.B. Hibbert, J.J. Gooding. **Evidence for the Direct Interaction Between Methylene Blue and Guanine Bases Using DNA-Modified Carbon Paste Electrodes.** *Electroanalysis*. 14 (2002) 1299-1302.
- [109] V. Brabec. **Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes.** *Bioelectronics Bioenergetics*. 8 (1981) 437-449.
- [110] E. Palecek. **From Polarography of DNA to Microanalysis with Nucleic Acid-Modified Electrodes.** *Electroanalysis*. 8 (1996) 7-14.
- [111] J. Wang, A-N. Kawde. **Amplified label-free electrical detection of DNA hybridization.** *Analyst*. 127 (2002) 383-386.
- [112] K. Kerman, M. Kobayashi, E. Tamiya, **Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology.** *Measurements Science Technology*. 15 (2004) R1-R11.
- [113] J.R. Epstein, I. Biran, D.R. Walt. **Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays.** *Analitica Chimica Acta*. 469 (2002) 3-36.
- [114] C. Xu, P. He, Y. Fang. **Electrochemical labeled DNA probe for the detection of sequence-specific DNA.** *Analitica Chimica Acta*. 411 (2000) 31-36.

[115] L. Alfonta, A.K. Singh, I. Willner. **Liposomes Labeled with Biotin and Horseradish Peroxidase: A Probe for the Enhanced Amplification of Antigen-Antibody or Oligonucleotide-DNA Sensing Processes by the Precipitation of an Insoluble Product on Electrodes.** *Analytical Chemistry*. 73 (2001) 91-102.

[116] S. Liu, J. Ye, P. He, Y. Fang. **Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode.** *Analytica Chimica Acta*. 335 (1996) 239-243.

[117] X. Sun, P. He, S. Liu, J. Ye, Y. Fang. **Immobilization of single-stranded deoxyribonucleic acid on gold electrode with self assembled aminoethanethiol monolayer for DNA electrochemical sensor applications.** *Talanta*. 47 (1998) 487-495.

[118] F.B. Silva, S.N. Vieira, L.R.G. Filho, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-DNA Hybridization on Poly(4-Methoxyphenethylamine).** *International Journal of Molecular Science*. 9 (2008) 1173 1188.

[119] M.J. Waring. **Structural Requirements for the Binding of Ethidium to Nucleic Acids.** *Journal of Molecular Biology*. 13 (1965) 269-282.

[120] T.I. Watkins, G. Woolfe. **Effect of Changing the Quaternizing Groups on the Trypanocidal Activity of Dimidium Bromide.** *Nature*. 169 (1952) 506.

[121] J.M. Benevides, J. Kawakami, G.J. Thomas Jr. **Mechanisms of drug-DNA recognition distinguished by Raman spectroscopy.** *Journal of Raman Spectroscopy*. 39 (2008) 1627-1634.

[122] H. Nishiwaki, M. Miura, K. Imai, R. Ohno, K. Kawashima, K. Ezaki, R. Ueda, H. Yoshikawa, K. Nagata, H. Takeyama, K. Yamada, **Experimental Studies on the Antitumor Effect of Ethidium Bromide and Related Substances.** *Cancer Research*. 34 (1974) 2699-2703.

-
- [123] R.V. Guntaka, B.W.J Mahy, J.M. Bishop, H.E. Varmus. **Ethidium bromide inhibits appearance of closed circular viral DNA and integration of virus-specific DNA in duck cells infected by avian sarcoma virus.** *Nature*. 253 (1975) 507–511.
- [124] E. Zylbee, C. Vesco, S. Penman. **Selective inhibition of the synthesis of mitochondria-associated RNA by ethidium bromide.** *Journal of Molecular Biology*. 44 (1969) 195-204.
- [125] C. Aaij, P. Borst, **The Gel electrophoresis DNA.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Nucleic Acids and Protein. Synthesis*. 269 (1972) 192-200.
- [126] P.A. Sharp, B. Sugden, J Sambrook. **Detection of Two Restriction Endonuclease Activities in *Haemophilus parainjuensae* Using Analytical Agarose - Ethidium Bromide Electrophoresis.** *Biochemistry*. 12 (1973) 3055 – 3063.
- [127] M.R. Bugs, M.L. Cornélio, **Analysis of the Ethidium Bromide Bound to DNA by Photoacoustic and FTIR Spectroscopy.** *Photochemistry and Photobiology*. 74 (2001) 512-520.
- [128] J.B. Le Pecq, C. Paoletti. **A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids.** *Journal of Molecular Biology*. 87 (1967) 106.
- [129] M.S. Ibrahim. **Voltammetric studies of the interaction of nogalamycin antitumor drug with DNA.** *Analytica Chimica Acta*. 443 (2001) 63– 72.
- [130] J.A. Piedale, I.R. Fernandes, A.M. Oliveira-Brett. **Electrochemical sensing of DNA–adriamycin interactions.** *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 81– 83.
- [131] H. Qi, X. Li, P. Chen, C. Zhang. **Electrochemical detection of DNA hybridization based on polypyrrole/ss DNA/multi-wall carbon nanotubes paste electrode.** *Talanta*. 72 (2007) 1030–1035.

-
- [132] M. Guo, J. Chen, D. Liu, L. Nie, S. Yao. **Electrochemical characteristics of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes.** *Bioelectrochemistry*. 62 (2004) 29–35.
- [133] I.C. Gherghi, S.T. Girousi, A.N. Voulgaropoulos, R. Tzimou-Tsitouridou. **Study of interactions between DNA-ethidium bromide (EB) and DNA-acridine orange (AO), in solution, using hanging mercury drop electrode (HMDE).** *Talanta* 61 (2003) 103-112.
- [134] I.C. Gherghi, S.T. Girousi, A. Voulgaropoulos, R. Tzimou-Tsitouridou. **Interaction of the mutagen ethidium bromide with DNA, using a carbon paste electrode and a hanging mercury drop electrode.** *Analytica Chimica Acta* 505 (2004) 135–144.
- [135] K. Ramanathan, M.K. Ram, M.M. Verghese, B.D. Malhotra. **Dielectric spectroscopic studies on polypyrrole glucose oxidase films.** *Journal of applied Polymer Science*. 60 (1996) 2309–2316.
- [136] A. Gambhir, M. Gerard, A. Mulchandani, B.D. Malhotra. **Characterization of DNA Immobilized on Electrochemically Prepared Conducting Polypyrrole-Polyvinyl Sulfonate Films.** *Appl. Biochem. Biotechnol.* 96 (2001) 303–309, 2001.
- [137] A. Chaubey, M. Gerard, R. Singhal, V.S. Singh, B.D. Malhotra. **Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinyl sulphonate composite films for application to lactate biosensors.** *Electrochimica Acta*. 46 (2000) 723–729.
- [138] K. Ramanathan, S.S. Pandey, R. Kumar, A. Gulati, A.S.N. Murthy, B.D. Malhotra. **Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor.** *Journal of Applied Polymer Science*. 78 (2000) 662–667.

[139] D.I. Bower. **An Introduction to Polymer Physics**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 2002.

[140] H.G. Elias. **An introduction to polymer science**, 1^a ed., Verlog Chemie: Weinheim, 1997.

[141] L.H. Sperling. **Introduction to Physical Polymer Science**. 4th edition, Wiley Interscience, New Jersey, USA, 2006.

[142] H. Shirakawa, E.J. Louis, A.G. MacDiarmid, C.K. Chiang, A.J. Heeger. **Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x**. *Journal of Chemical Society Chemical Communications*. 16 (1977) 578-580.

[143] Nobel Prize in Chemistry, http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/chemadv.pdf, acessado em 23/11/2010.

[144] U. Lange, N.V. Roznyatovskaya, V.M. Mirsky. **Conducting polymers in chemical sensors and arrays**. *Analytica chimica acta*. 614 (2008) 1–26.

[145] P. Atkins, L. Jones. **Princípios de Química, Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3^a edição, Porto Alegre, Bookman, 2006.

[146] M.A.Q. Alfaro, S. Ferro, C.A. Martínez-Huitle, Y.M. Vong. **Boron Doped Diamond Electrode for the Wastewater Treatment**. *Journal of The Brazilian Chemical Society*. 17 (2006) 227-236.

[147] S. Sadki, P. Schottland, N. Brodie, G. Sabouraud. **The mechanisms of pyrrol electropolymerization**. *Chemical Society Reviews*. 29 (2000) 283–293.

[148] E.M. Génies, A. Boyle, M. Lapowski, C. Tsintavis. **Polyaniline: a hystorical survey**. *Synthetic Metals*. 36 (1990) 139-182.

-
- [149] D.M. Mohilner, R.N. Adams, W.J. Argersinger. **Investigation of the Kinetics and Mechanism of the Anodic Oxidation of Aniline in Aqueous Sulfuric Acid Solution at a Platinum Electrode.** *Journal of the American Chemical Society.* 84 (1962) 3618-3622.
- [150] M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra. **Application of conducting polymers to biosensors.** *Biosensors and Bioelectronics.* 17 (2002) 345-359.
- [151] M. Yuqing, C. Jianrong, W. Xiaohua. **Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors.** *Trends in Biotechnol.* 22 (2004) 227-231.
- [152] K.M. Millan, A. Saraullo, R.S. Mikkelsen. **Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode.** *Analytical Chemistry.* 66 (1994) 2943–2948.
- [153] S.N. Vieira, L.F. Ferreira, D.L. Franco, A.S. Afonso, R.A. Gonçalves, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol).** *Macromolecular Symposia* 245-246 (2006) 236-242.
- [154] D.L. Franco, A.S. Afonso, S.N. Vieira, L.F. Ferreira, R.A. Gonçalves, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties.** *Materials Chemistry and Physics.* 107 (2008) 404-409.
- [155] C.M. de Castro, S.N. Vieira, R.A. Gonçalves, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine.** *Journal of Materials Science.* 43 (2008) 475-482.

-
- [156] L.F. Ferreira, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide.** *Polymer International*. 57 (2008) 644-650.
- [157] L.F. Ferreira, S.N. Vieira, L.R.G. Filho, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix.** *Journal of Materials Science*. 42 (2007) 3238-3243.
- [158] D.L. Franco, A.S. Afonso, L.F. Ferreira, R.A. Gonçalves, J.F.C. Boodts, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Electrodes modified with polyaminophenols: immobilization of purines and pyrimidines.** *Polymer Engineering and Science*. 48 (2008) 2043-2050.
- [159] T.A.R. Silva, L.F. Ferreira, J.F.C. Boodts, S.P. Eiras, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material for immobilization of biomolecules.** *Polymer Engineering and Science*. 48 (2008) 1963-1970.
- [160] T.A.R. Silva, L.F. Ferreira, L.M. de Souza, L.R.G. Filho, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid).** *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems* 29 (2009) 539-545.
- [161] R.M.L. Oliveira, S.N. Vieira, H.C. Alves, E.G. França, D.L. Franco, L.F. Ferreira, A.G. Brito-Madurro, J.M. Madurro. **Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization.** *Journal of Materials Science*. 45 (2010) 475-482.
- [162] K.B. Prater. **Electrode filming in ring substituted anilines.** *Journal of the Electrochemical Society*. 120 (1973) 365-366.
- [163] S. Taj, M.F. Ahmed, S. Sankarapavinasam. **Electro—oxidative polymerization of *m*-aminophenol.** *Synthetic Metals*. 52 (1992) 147-158.

-
- [164] S. Sankarapavinasam. **Kinetics and mechanism of electropolymerization of *m*-aminophenol.** *Journal of Polymer Science: Part A. Polymer Chemistry.* 30 (1993) 1105-1109.
- [165] S. Sankarapavisanam. **Permeability and electrocatalytic properties of film prepared by electropolymerization of *m*-aminophenol.** *Synthetic Metals.* 58 (1993) 173-185.
- [166] E. Hur, G. Bereket, B. Duran, D. Ozdemir, Y. Sahin. **Electropolymerization of *m*-aminophenol on mild steel and its corrosion protection effect.** *Progress in Organic Coatings.* 60 (2007) 153–160.
- [167] B.M. Kennedy, V.J. Cunnane. **The degradation of electrochemically polymerised poly (3-aminophenol) films in sodium hydroxide solutions for the production of microelectrode ensembles.** *Electrochimica Acta.* 53 (2008) 3620–3625.
- [168] B. Kennedy, A. Glidle, V.J. Cunnane. **A study of the oxidation and polymerisation of meta substituted phenol and aniline derivatives.** *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 608 (2007) 22–30.
- [169] H.J. Salavagione, J. Arias, P. Garcés, E. Morallón, C. Barbero, J.L. Vásquez. **Spectroelectrochemical study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid medium.** *Journal of electroanalytical Chemistry.* 565 (2000) 375-383.
- [170] Y. Nakabayashi, M. Wakuda, H. Imai. **Amperometric glucose sensors fabricated by electrochemical polymerization of phenols on carbon paste electrodes containing ferrocene as an electron transfer mediator.** *Analytical Science.* 14 (1998) 1069-1076.
- [171] Y. Nakabayashi, H. Yoshikawa. **Amperometric biosensors for sensing for hydrogen peroxide based on electron transfer between horseradish peroxidase and ferrocene as mediator.** *Analytical Science.* 16 (2000) 609-613.

-
- [172] F. Ying-Sing, S. Shi-Hui, Z. De-Rong. **Piezoelectric crystal for sensing bacteria by immobilizing antibodies on divinylsulphone activated poly-*m*-aminophenol film.** *Talanta*. 51 (2000) 151-158.
- [173] S. Tombelli, M. Minunni, and M. Mascini. **A Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Determination of the Affinity of Drugs for Nucleic Acids.** *Analytical Letters*. 35 (2002) 599–613.
- [174] R. Doong, H-M. Shih, S-H. Lee. **Sol–gel-derived array DNA biosensor for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and biological samples.** *Sensors and Actuators B*. 111–112 (2005) 323–330.
- [175] Y. Matsumoto, N. Terui, S. Tanaka. **Accumulated detection of ethidium bromide using a UV-irradiated DNA film modified electrode and its application for electrochemical detection of an environmental pollutant.** *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 610 (2007) 193–198.
- [176] M. Hossain, G.S. Kumar. **DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguinarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation.** *Journal of Chemical Thermodynamics*. 41 (2009) 764–774.
- [177] L. Henke, P.A.E. Piunno, A.C. McClure, U.J. Krull. **Covalent immobilization of single-stranded DNA onto optical fibers using various linkers.** *Analytica Chimica Acta*. 344 (1997) 201-213.
- [178] P.C. Pandeyt, H.H. Weetall. **Detection of Aromatic Compounds Based on DNA Intercalation Using an Evanescent Wave Biosensor.** *Analytical Chemistry*. 67 (1995) 787-792.
- [179] P.A.E. Piunno, U.J. Krull, R.H.E. Hudson, M.J. Damha, H. Cohen. **Fiber optic DNA Sensor for Fluorometric Nucleic Acid Determination.** *Analytical Chemistry*. 67 (1995) 2635-2643.

-
- [180] W.R. Algar, U.J. Krull. **Towards multi-colour strategies for the detection of oligonucleotide hybridization using quantum dots as energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET).** *Analytica Chimica Acta*. 581 (2007) 193–201.
- [181] S.H. Minasyan, L.A. Tavadyan, A.P. Antonyan, H.G. Davtyan, M.A. Parsadanyan, P.O. Vardevanyan. **Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA.** *Bioelectrochemistry*. 68 (2006) 48 – 55.
- [182] J.B. Chaires, N. Dattagupta, D.M. Crothers. **Studies on Interaction of Anthracycline Antibiotics and Deoxyribonucleic Acid: Equilibrium Binding Studies on Interaction of Daunomycin with Deoxyribonucleic Acid.** *Biochemistry*. 21 (1982) 3933-3940.
- [183] M. Poot, K-H. Hiller, S. Heimpel, H. Hoehn. **Distinct Patterns of Cell Cycle Disturbance Elicited by Compounds Interfering with DNA Topoisomerase I and II Activity.** *Experimental Cell Research*. 218 (1995) 326-330.
- [184] V.L. de Almeida, A. Leitão, L.D.C.B. Reina, C.A. Montanari, C.L. Donniei. **Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo Celular e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o DNA: Uma Introdução.** *Quimica Nova*. 28 (2005) 118-129.
- [185] C. Bailly, X. Qu, J. B. Chaires, P. Colson, C. Houssier, M. Ohkubo, S. Nishimura, T. Yoshinari. **Substitution at the F-Ring N-Imide of the Indolocarbazole Antitumor Drug NB-506 Increases the Cytotoxicity, DNA Binding, and Topoisomerase I Inhibition Activities.** *Journal of Medicinal Chemistry*. 42 (1999) 2927-2935.
- [186] J.R. Lakowicz. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** 2nd edição, Kluwer Academy/Plenum Publishers, New York, USA, 1999.
- [187] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch. **Fundamentos de Química Analítica.** 8^a edição, Thomson, São Paulo, 2007.

[188] B.B. Neto, I.S. Scarmínio, R.E. Bruns. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 2ª edição, Editora da UNICAMP, Campinas, 2003.

[189] F.F. José, I.M. da Silva, M.I. Araújo, R.P. Almeida, O. Bacellar, E.M. Carvalho. **Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 34(6), 537-542, 2001.

[190] www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, acessado em 23/11/2010.

[191] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. **Molecular cloning: a laboratory manual** (2nd ed.). Vol 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

[192] G.C. Saunders, H.C. Parkes, **Analytical Molecular Biology. Quality and Validation.** Thirty-second edition., LGC (Treddington) Ltd, Cambridge, 1999, pp.50.

[193] R.J. Douthart, J.P. Burnett, F.W. Beasley, B.H. Frank. **Binding of Ethidium Bromide to Double-Stranded Ribonucleic Acid.** *Biochemistry.* 12 (1973) 214-220.

[194] J. Fuchs, M. Podda, **Encyclopedia of Medical Genomics and Proteomics. Second edition.**, Marcel Dekker, New York, 2005, pp.360.

[195] D. Gonçalves, R. C. Faria, M. Yonashiro, L. O. S. Bulhões. **Electrochemical oxidation of *o*-aminophenol in aqueous acidic medium: formation of a film and soluble products.** *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 487 (2000) 90-99.

[196] R.I. Tucceri, C. Barbero, J.J. Silber, L. Sereno, D. Posadas. **Spectroelectrochemical study of poly-*o*-aminophenol.** *Electrochimica Acta.* 42 (1997) 919-927.

-
- [197] C. Barbero, J.J. Silber, L. Sereno. **Formation of a novel electroactive film by electropolymerization of *ortho*-aminophenol.** *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 263 (1989) 333-352.
- [198] N.C. Stellwagen, C.Y. Chang. **Effect of Loop-Closing Residues on DNA Hairpin Stability.** *Biophysical Journal.* 98 (2010) 656a.
- [199] M.A. Vorotyntsev, L.I. Daikhin, M.D. Levi. **Modelling the impedance properties of electrodes coated with electroactive polymer films.** *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 364 (1994) 37-49.
- [200] C. Jiang, T. Yang, K. Jiao, H. Gao. **A DNA electrochemical sensor with poly-L-lysine/single-walled carbon nanotubes films and its application for the highly sensitive EIS detection of PAT gene fragment and PCR amplification of NOS gene.** *Electrochimica Acta.* 53 (2008) 2917-2924.
- [201] J-Y. Park, S-M. Park. **DNA Hybridization Sensors Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Detection Tool.** *Sensors.* 9 (2009) 9513-9532.
- [202] G. Láng, J. Bácskai, G. Inzelt. **Impedance analysis of polymer film electrodes.** *Electrochimica Acta.* 38 (1993) 773-780.
- [203] W. Fuller, M.J. Waring, **A Molecular Model for the Interaction of Ethidium Bromide with Deoxyribonucleic Acid.** *Berichte der Bunsengesellschaft.* 68 (1964) 805-808.
- [204] P. Kara, K. Kerman, D. Ozkan, B. Meric, A. Erdem, Z. Ozkan, M. Ozsoz. **Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA.** *Electrochemical Communication.* 4 (2002) 705–709.
- [205] D.P. Heller, C.L. Greenstock. **Fluorescence Lifetime analysis of DNA Intercalated Ethidium Bromide and Quenching by Free Dye.** *Biophysical Chemistry.* 50 (1994) 305-312.

[206] V.W.F. Burns. **Fluorescence decay time characteristics of the complex between ethidium bromide and nucleic acids.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 133 (1969) 420-424.

[207] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter. **Statistics for experiments. An introduction to design, data analysis and model building.** Wiley, New York, 1978.