

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Programa de Pós-graduação em Química

Instituto de Química

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DIAGNÓSTICO DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

FÁBIO DE PÁDUA FERREIRA

UBERLÂNDIA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Programa de Pós-graduação em Química
Instituto de Química
Laboratório de Filmes Poliméricos e Laboratório de Biossensores

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR ELETROQUÍMICO PARA
DIAGNÓSTICO DE MENINGITE PNEUMOCÓCICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Ana Graci Brito Madurro
Coorientador: João Marcos Madurro

UBERLÂNDIA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F287d
2017 Ferreira, Fábio de Pádua, 1990-
Desenvolvimento de genossensor eletroquímico para diagnóstico de
meningite pneumocócica / Fábio de Pádua Ferreira. - 2017.
79 f. : il.

Orientadora: Ana Graci Brito-Madurro.
Coorientador: João Marcos Madurro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Meningite - Diagnóstico - Teses. 3.
Biossensores - Teses. I. Brito-Madurro, Ana Graci. II. Madurro, João
Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
Graduação em Química. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 249/PPQUI.

DATA: 31/01/2017

DISCENTE: Fábio de Pádua Ferreira

MATRÍCULA: 11422QMI015

TÍTULO DO TRABALHO: Desenvolvimento de genossensor eletroquímico para diagnóstico de meningite pneumocócica.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Ciência dos Materiais; Química do Estado Sólido

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Desenvolvimento de genossensor para detecção de *streptococcus pneumoniae*.

Às quatorze horas do dia trinta e um de janeiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório A, Bloco 50, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Luís Antônio da Silva e Valéria Almeida Alves, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Ana Carolina Siquieroli e Ana Graci Brito Madurro, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será _____

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de _____ dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 13 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Valéria Almeida Alves
UFTM

Profª Dra. Ana Carolina Siquieroli
UFU

Prof. Dr. Luís Antônio da Silva - UFTM

Orientador(a): Profª Dra. Ana Graci Brito Madurro – IQUFU

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e todas as pessoas que sempre acreditaram, torceram e rezaram por mim durante esse tempo. Suas orações foram imprescindíveis para que ocorresse tudo bem.

À minha família, meus pais Anselmo e Lenice, meu irmão Giovane e minha namorada Poliana, pelo amor, carinho, atenção e princípios que me tornaram quem sou.

Agradecimento especial a minha orientadora profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro e ao co-orientador prof. Dr. João Marcos Madurro, pela orientação, paciência, sabedoria e por me permitir trabalhar num projeto tão importante e relevante para nossa ciência.

Aos meus companheiros do laboratório, que tornaram o trabalho mais agradável, me lembrarei com saudade, dos sorrisos, dos ensinamentos e das discussões científicas, em especial, a Ana Cristina, que me introduziu ao mundo dos biossensores e teve toda paciência do mundo, sempre. Aos demais, Dani, José, Livia, Rafaela, Mônica, Jussara, Héden, Heliane, Rafael, Sandro, Vinícius, Marcos Paulo, Priscila, Bárbara, Erick e Laíse, meus sinceros agradecimentos.

Aos órgãos de fomento (CNPq, CAPES, FAPEMIG), à Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Química e ao programa de Pós-Graduação em Química, por garantirem as condições necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à todos, tenham uma boa leitura.

RESUMO

As meningites pneumocócicas são provocadas pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* e apresentam elevado índice de morbidade e mortalidade. O diagnóstico precoce do agente causador da meningite é justificado pelo impacto positivo no tratamento, evitando possíveis complicações, tais como perda da audição, retardo mental, anormalidade motora e distúrbios visuais, reduzindo também as taxas de morbi-mortalidade. A identificação de microrganismos por meio de biossensores vem sendo amplamente estudada e sua eficiência constantemente comprovada. Os biossensores permitem realizar testes simples, rápidos, precisos e acessíveis. Neste trabalho foi utilizado eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) para a imobilização de uma sequência sonda (Strep1) específica para o alvo complementar (Strep2), isoladas a partir de regiões conservadas do DNA de *S. pneumoniae*, visando o desenvolvimento de um genossensor específico para a meningite pneumocócica. A eletrodeposição de poli(4-aminofenol) sobre eletrodo de grafite foi confirmada por meio de técnicas voltamétricas e imagens de microscopia eletrônica de varredura. Após a modificação com poli(4-aminofenol) a superfície foi funcionalizada com a sonda específica para *S. pneumoniae* (Strep1), seguida do processo de hibridização com o alvo complementar (Strep2). Os resultados obtidos indicam que a presença do poli(4-aminofenol) causou um aumento na eficiência da imobilização da sonda de cerca de 12%, monitorando-se o pico de oxidação da guanina, quando comparada ao eletrodo de grafite descoberto. O tempo de hibridização entre Strep1(sonda):Strep2(alvo) foi otimizado e a detecção foi conduzida de forma direta e indireta, neste último caso, usando brometo de etídio como indicador. A plataforma foi capaz de reconhecer o DNA genômico da bactéria em soro humano. A performance do genossensor foi analisada frente a diferentes concentrações do DNA genômico, por meio da voltametria de pulso diferencial e a espectroscopia de impedância eletroquímica. Os limites de detecção obtidos em cada técnica foram de 54 ng mL⁻¹ e 28 ng mL⁻¹ respectivamente. O genossensor mostrou-se específico e seletivo. O sistema permaneceu estável até 60 dias de armazenamento. A análise topográfica da superfície do genossensor foi avaliada utilizando a microscopia de força atômica. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que a plataforma poli(4-aminofenol)/Strep1 é promissora para o diagnóstico molecular da meningite pneumocócica em soro humano enriquecido.

Palavras chave: diagnóstico, eletrodo modificado, genossensor, meningite pneumocócica.

ABSTRACT

Pneumococcal meningitis are caused by the bacterium *Streptococcus pneumoniae* and presents a high rate of morbidity and mortality. Early diagnosis of the causative agent of meningitis is justified by its positive impact on clinical management, avoiding complications such as hearing loss, intellectual disability, motor abnormality and visual disturbances, reducing morbidity and mortality rates. The identification of microorganisms using biosensors has been widely studied and its efficiency constantly proven. Biosensors allow simple, fast, accurate and accessible tests. In this work, graphite electrodes modified with poly(4-aminophenol) was used for the immobilization of a probe sequence (Strep1) complementary for a specific target (Strep2), isolated from conserved regions of *S. pneumoniae*, aiming the development of a genosensor specific for pneumococcal meningitis. The electrodeposition of poly(4-aminophenol) on graphite electrode was confirmed using voltammetric techniques and scanning electron microscopy images. After surface modification with poly(4-aminophenol), the surface was functionalized with the specific probe for *S. pneumoniae* (Strep1), followed by its hybridization with the complementary target (Strep2). Results indicate that the presence of the polymer caused an increase in probe immobilization efficiency in almost 12%, monitoring the guanine peak when compared to the bare graphite electrode. The hybridization time between Strep1(probe): Strep2(target) was optimized and the detection was performed directly and indirectly. In the second case, ethidium bromide was used as an indicator. The platform was able to recognize the genomic DNA of the bacterium in human serum. The performance of the genosensor was analyzed against different concentrations of the solution containing genomic material of the bacteria, through differential pulse voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The detection limits were 54 ng mL⁻¹ and 28 ng mL⁻¹ in each technique respectively. The platform presented characteristics such as specificity and selectivity. The system remain stable during 60 days stocked. Topographic analysis of the genosensor surface were evaluated by atomic force microscopy. The results presented in this work indicate that the poly(4-aminophenol)/Strep1 platform is promising for the molecular diagnosis of pneumococcal meningitis in enriched human serum.

Keywords: diagnosis, modified electrode, genosensor, pneumococcal meningitis,

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia da região representativa das meninges (A). Cérebro com meningite pneumocócica (B).....	14
Figura 2: Diagrama contendo as principais causas da meningite.....	15
Figura 3: A Epidemiologia da MB no Brasil em diferentes faixas etárias nos anos de 2010 a 2014.	18
Figura 4: Esquema ilustrativo de um biossensor.....	20
Figura 5: Esquema de um genossensor.	24
Figura 6: Modelo esquemático de moléculas de PNA e DNA.....	25
Figura 7: Unidade monomérica de um nucleotídeo do DNA (A) e estrutura química das bases nitrogenadas purínicas e pirimídicas presentes no DNA (B).	27
Figura 8: Modelo de preenchimento tridimensional para estrutura do DNA (A) e uma curta secção de DNA (B).....	28
Figura 9: Mecanismo de funcionamento de um genossensor eletroquímico de detecção indireta utilizando um mediador eletroativo (A) e agentes intercaladores (B).....	30
Figura 10: Estrutura química da molécula BE (A) e ação intercalante do BE entre as bases nitrogenadas (B).	31
Figura 11: Estrutura química dos polímeros condutores aplicados em biossensores.....	33
Figura 12: Um esquema da cadeia conjugada, contendo ligações simples e duplas alternadas (a) e mecanismo de dopagem (b).....	33
Figura 13: Estrutura química dos monômeros isômeros derivados do aminofenol.	34
Figura 14: Instrumentação em eletroanalítica: Célula eletroquímica de três compartimentos (A) e de compartimento único (B); Potenciostato CH Instruments (C).	37
Figura 15: Sinal de excitação em voltametria cíclica (A) e voltamogramas cíclicos de uma solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ e diferentes concentrações de H_2O_2 em eletrodos de ouro (B).	38
Figura 16: (a) Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo e (b) voltamograma obtido em VPD. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t_p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico.	39
Figura 17: Ilustração da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Diagrama de Nyquist (a) e circuito equivalente (b). Z'' : componente imaginário da impedância Z' : componente real da impedância. R_s : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W: impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância da dupla camada.	40
Figura 18: Preparação dos eletrodos de grafite.	45
Figura 19: Etapas de preparação do genossensor.....	47
Figura 20: Esquema de detecção direta.....	48

Figura 21: Esquema de detecção indireta.....	48
Figura 22: Voltamogramas cíclicos com o eletrodo de grafite: (a) Eletrólito: HClO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); (b) Eletrólito: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol L^{-1}) em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); $0,05 \text{ V s}^{-1}$	52
Figura 23: Voltamograma cíclico obtido pela polimerização eletroquímica do 4-AF ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), 50 ciclos. Eletrólito: HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $0,05 \text{ V s}^{-1}$	53
Figura 24: (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de grafite antes (A) e após (B) a sua modificação com poli(4-AF). Eletrólito: HClO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); $0,05 \text{ V s}^{-1}$; (b) Voltamograma de pulso diferencial da plataforma EG/poli (4-AF). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1}	54
Figura 25: Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo de grafite (A) e eletrodos modificados com poli(4-AF) (B) usando $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol L^{-1}) em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito; $0,05 \text{ V s}^{-1}$	55
Figura 26: Microscopias eletrônicas de varredura de eletrodos de grafite sem modificação (a e b) e modificados com poli(4-AF) (c e d).	56
Figura 27: (a) Voltamograma de pulso diferencial referente a imobilização da Strep1 (39 mer , $63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre o EG/poli(4-AF) (a) e sobre o eletrodo de grafite (b); Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1}	58
Figura 28: Mecanismos de oxidação da Guanina e Adenina.	59
Figura 29: Gráfico da influência do tempo de imobilização. Corrente de pico de oxidação da guanina em diferentes tempos de imobilização. Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mVs^{-1}	59
Figura 30: Voltamograma de pulso diferencial com o eletrodo de grafite modificado com poli(4-AF), 50 ciclos, contendo a sonda Strep1 (39 mer , $63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$): antes da hibridização (a) e após incubação com o alvo complementar Strep2 (39 mer , $180 \mu\text{mol L}^{-1}$) a $55 \text{ } ^\circ\text{C}$ (b). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mVs^{-1}	60
Figura 31: Representação esquemática da adsorção de DNA na superfície de eletrodos de grafite (a) ssDNA e (b) dsDNA.....	61
Figura 32: Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídio ($5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) preparados em pH 0,5, 50 ciclos, na ausência do alvo (a) e após hibridização com o alvo complementar (Strep2) (b). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1}	61
Figura 33: Resposta de corrente em função do tempo de imobilização monitorando o pico de oxidação do BE. Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mVs^{-1}	62
Figura 34: Voltamograma de pulso diferencial de eletrodo de grafite modificado com poli(4-AF), 50 ciclos, contendo a sonda Strep1 (39 mer , $63 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$): antes da hibridização (A) e após incubação com o DNA genômico da <i>S. pneumoniae</i> (200 ng mL^{-1}) a $55 \text{ } ^\circ\text{C}$ (B).	

Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} 63

Figura 35: Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídio ($5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) preparados em pH 0,5, 50 ciclos, na ausência do alvo (A) e após hibridização com o DNA genômico da *S. pneumoniae* (B). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} 64

Figura 36: (A) Voltamogramas de pulso diferencial do BE após hibridização com DNA genômico da *S. pneumoniae* em diferentes concentrações (0, 50, 100, 150, 200 ng mL^{-1}). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mVs^{-1} . (B) Resposta linear e parâmetros da regressão linear da curva Δip vs. $[\text{DNA}]/\text{ng mL}^{-1}$ 65

Figura 37: (A) Diagramas de Nyquist (Z'' vs. Z') em KCl $0,1 \text{ M}$ contendo $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} após hibridização com DNA genômico da *S. pneumoniae* em diferentes concentrações (0, 100, 125, 250, 350 e 500 ng mL^{-1}). Epa: + 0,23 V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 100 kHz a 10 mHz. Resposta linear e parâmetros da regressão linear da curva ΔR_{ct} vs. $[\text{DNA}]/\text{ng mL}^{-1}$ 66

Figura 38: Voltamograma de pulso diferencial do BE ($5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a superfície do EG/poli(4-AF)/Strep1 na ausência do alvo (a), na presença do soro enriquecido com DNA genômico de *E. coli*, controle negativo EcoliGEN (150 ng mL^{-1}) (b) e na presença do soro enriquecido com DNA genômico de *S. pneumoniae*, controle positivo SpneumoGEN (150 ng mL^{-1}) (c). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} . Os resultados foram obtidos em duplicata. 67

Figura 39: Microscopias de força atômica atômica do EG (A), EG/poli(4-AF) (B), EG/poli(4-AF)/Strep1 (C), EG/poli(4-AF)/Strep1/SpneumoGEN (D) e EG/poli(4-AF)/Strep1/EcoliGEN (E). 69

Figura 40: Estudo de estabilidade do genossensor em soro humano enriquecido. 71

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

Δi_p – variação de intensidade de corrente de pico

4-AF – 4-aminofenol

A – adenina

AFM – *atomic force microscopy* (microscopia de força atômica)

BBD – *boron-doped diamond electrodes* (eletrodo de diamante dopado com boro)

BE – brometo de etídio

BSA – *bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)

C – citosina

DNA – *desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

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

DP α – desvio-padrão do branco

E. coli – *Escherichia coli*

EcoliGEN – solução contendo DNA genômico da *E. coli*

EG – eletrodo de grafite

EG/poli(4-AF) – eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol)

EIE - espectroscopia de impedância eletroquímica

E p – Potencial de pico

E p_a – potencial de pico anódico

E p_c – potencial de pico catódico

EQM – eletrodo quimicamente modificado

FTIR-ATR - espectrometria de absorção no infravermelho com transformada fourier em cristal de reflectância atenuada

G – guanina

H. influenzae – *Haemophilus influenzae*

HIV - *human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

ITO - *tin-doped indium oxide* (óxido de índio dopado com estanho)

I p_a – corrente de pico anódica

I p_c – corrente de pico catódica

MB – meningite bacteriana

MA – meningite asséptica

MCQ – microbalaça de cristal de quartzo

N. meningitidis – *Neisseria meningitidis*

Neg1 – oligonucleotídeo controle negativo

SPR – *surface plasmon resonance* (ressonância plasmônica de superfície)

Strep1 – oligonucleotídeo sonda

Strep2 – oligonucleotídeo alvo

StrepGEN – solução contendo DNA genômico da *Streptococcus pneumoniae*

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

Poli(4-AF) – poli(4-aminofenol)

PNA - *peptidic nucleic acid* - ácido nucléico peptídico

PC – polímeros condutores

PCR – reação em cadeia da polimerase

S. pneumoniae – *Streptococcus pneumoniae*

ssDNA – *single strand DNA* (DNA fita simples)

SSC – *saline-sodium citrate* (citrato de sódio salino)

SNC – sistema nervoso central

T – timina

V – volt

VC – voltametria cíclica

VC – voltamogramas cíclicos

VPD – voltametria de pulso diferencial

Z' – componente real de impedância (resistiva)

Z'' – componente imaginária de impedância (capacitiva)

Z_w – impedância de Warburg

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Meningite.....	14
1.2 Biossensores.....	19
1.2.1 Classificação dos biossensores.....	21
1.3 Genossensores.....	23
1.3.1 DNA: Estrutura e Propriedades.....	26
1.3.2 Biossensores Eletroquímicos de DNA.....	29
1.4 Eletrodos Quimicamente Modificados e Polímeros Aplicados em Biossensores.....	32
1.5 Genossensores Aplicados ao Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Inflamatórias.....	35
1.6 Técnicas Eletroanalíticas e Instrumentação.....	36
1.6.1 Voltametria Cíclica.....	38
1.6.2 Voltametria de Pulso Diferencial.....	38
1.6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	39
2.1 Objetivo geral.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 Reagentes e soluções.....	42
3.1.1 Preparo de soluções.....	42
3.2 Materiais e equipamentos.....	44
3.3 Procedimento Experimental.....	44
3.3.1 Construção e pré-tratamento dos eletrodos de grafite.....	44
3.3.2 Seleção dos eletrodos de grafite.....	45
3.3.3 Eletropolimerização do poli-4-aminofenol.....	45
3.3.4 Caracterização eletroquímica da plataforma.....	46
3.3.5 Preparação do genossensor.....	46
3.3.6 Detecção eletroquímica do alvo complementar.....	47
3.3.7 Influência do tempo de hibridização do DNA.....	49
3.3.8 Detecção do DNA genômico.....	49
3.3.9 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	49
3.3.10 Validação dos parâmetros analíticos do biossensor.....	49
3.3.11 Estudo de especificidade e seletividade da plataforma.....	50
3.3.12 Análise da morfologia e topografia da superfície.....	50
3.3.13 Teste de Estabilidade.....	51

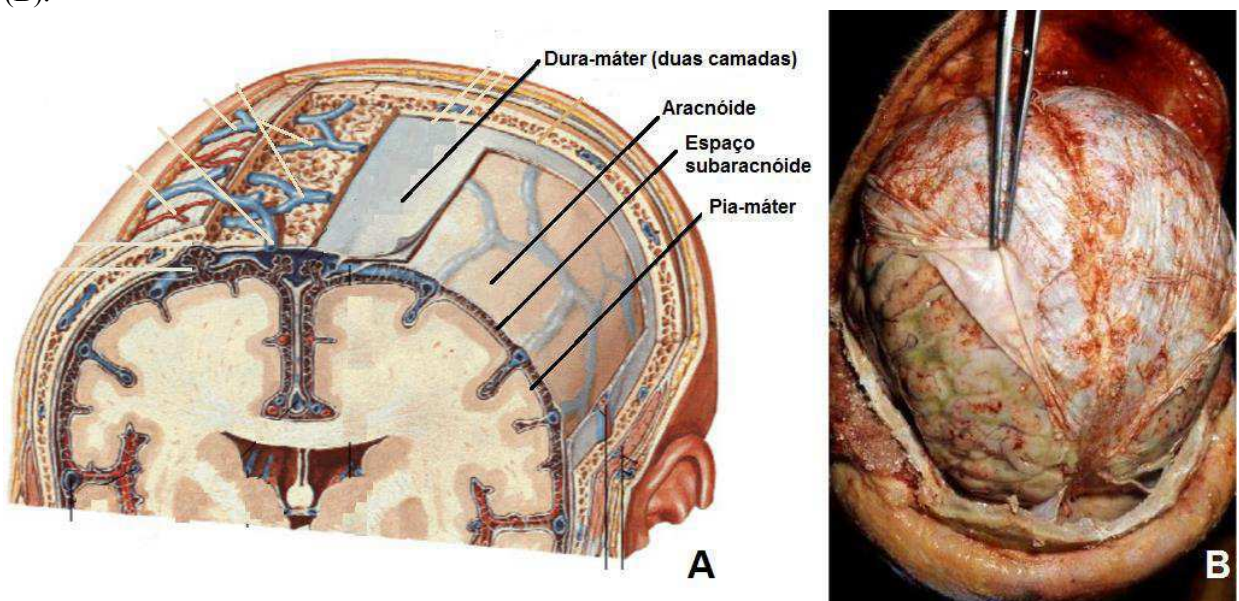
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4.1 Seleção dos eletrodos de grafite.....	52
4.2 Funcionalização do eletrodo de grafite com poli-(4AF).....	53
4.3 Caracterização eletroquímica e morfológica da plataforma EG/poli(4-AF).....	54
4.4 Estudos de imobilização de oligonucleotídeos	56
4.5 Detecção eletroquímica.....	60
4.5.1 Detecção direta do alvo complementar	60
4.5.2 Detecção indireta do alvo complementar	61
4.5.3 Influência do tempo de incubação.....	62
4.5.4 Detecção direta e indireta do DNA genômico	63
4.6 Validação dos parâmetros analíticos do genossensor	65
4.7 Estudo de especificidade e seletividade do genossensor	67
4.8 Análise morfológica.....	68
5. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Meningite

A meningite é caracterizada por um processo inflamatório do espaço subaracnóideo e das membranas leptomeníngeas (aracnóide e pia mater) que envolvem o encéfalo e a medula espinhal (**Figura 1**) (MACE, 2008; MAGO *et al.*, 2012). O processo de inflamação das meninges é conhecido desde o início do século XX. Os patógenos tiram vantagem das características específicas do sistema imune no sistema nervoso central (SNC), replicando-se e induzindo resposta inflamatória característica da doença. A meningite pode ser causada por bactérias, vírus e fungos (HOFFMAN; WEBER, 2009; MAGO *et al.*, 2012).

Figura 1: Anatomia da região representativa das meninges (A). Cérebro com meningite pneumocócica (B).

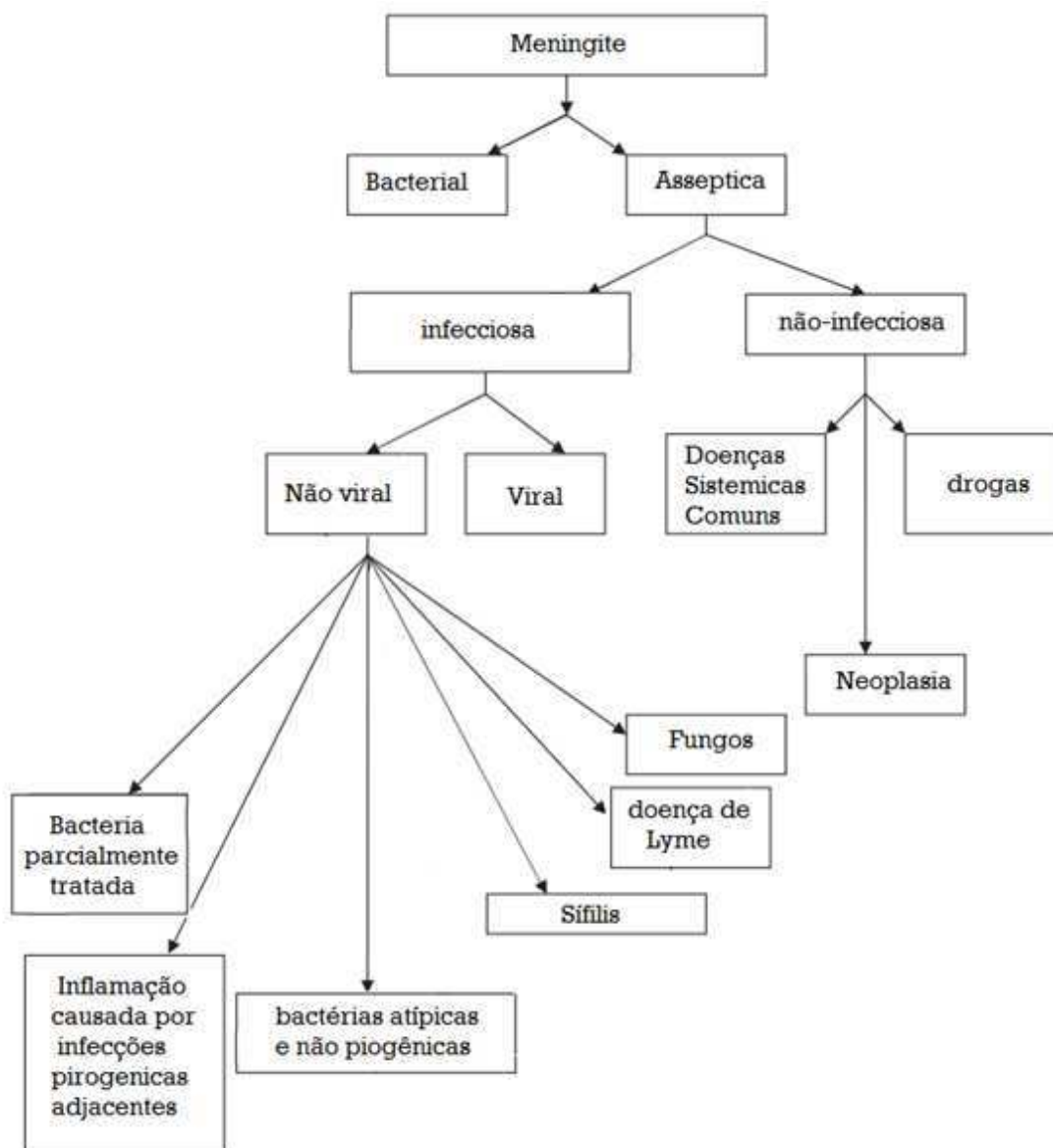


Fonte: Adaptados de Netter (2000) e Hasbun (2016), respectivamente.

São empregadas duas classificações para as meningites, as formas asséptica (MA) e bacteriana (MB). A forma asséptica se refere à inflamação meníngea sem evidência de infecção bacteriana, pode ser causada por vírus, fungos e desordens do tecido conectivo adjacente. A meningite viral é predominantemente causada por enterovírus, no entanto já foram reportados arbovírus, vírus da herpes simples e varicela como agentes causadores (CHADWICK, 2006). A meningite fúngica é causada principalmente por fungos *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides immitis*, ocorre geralmente em pacientes imunossuprimidos. A meningite viral e fúngica são em geral menos agressivas, apresentam

um curso clínico benigno e baixas taxas de mortalidade. Enquanto que a forma asséptica é mais branda, a forma bacteriana geralmente está associada à alta taxa de mortalidade e sequelas neurológicas permanentes, principalmente em países menos desenvolvidos, devido principalmente a morosidade no estabelecimento do diagnóstico e início do tratamento apropriado (SURINDER; BINEETA; MEGHA, 2007; MACE, 2008; CORDEIRO, 2013). *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* B são os agentes etiológicos responsáveis por grande maioria dos casos das meningites bacterianas (MB) (ABDINIA; REZAEI; OSKOUIE, 2014). A **Figura 2** apresenta um diagrama contendo as principais causas de meningite.

Figura 2: Diagrama contendo as principais causas da meningite.



Fonte: Obtido em Mace (2008).

A meningite causada por bactérias *S. pneumoniae* são denominadas “pneumocócicas” e tem grande importância devido à gravidade do quadro clínico e rápida evolução. Causa grande preocupação pela sua letalidade e morbilidade, sendo o agente etiológico mais frequentemente associado com morte e com sequelas severas (THIGPEN *et al.*, 2011). A *S. pneumoniae*, assim como a *N. meningitidis* e *H. influenzae*, são bactérias capsuladas. Diferente da *N. meningitidis*, as meningites causadas pela *S. pneumoniae* e *H. influenzae* não causam epidemias, pois os surtos ocorrem muito raramente. A diversidade dos tipos capsulares polissacarídicos da *S. pneumoniae* é grande, aproximadamente 93 serotipos imunologicamente distintos, sendo grande parte desse número, agentes causadores de doenças pneumocócicas invasivas, como pneumonias bacterêmicas, meningite, sepse e artrite (WHO, 2011).

A transmissão dos principais patógenos da MB ocorre por aerossóis ou por contato direto com secreções de pacientes ou portadores saudáveis. Os patógenos residem na mucosa da nasofaringe humana sem causar prejuízos ao hospedeiro. A cápsula polissacarídica reduz o aprisionamento dos patógenos pelo muco, permitindo seu acesso à superfície epitelial da nasofaringe, sendo considerada o principal fator de virulência dessas bactérias. Uma vez na corrente sanguínea, mecanismos de defesa tentam combater o patógeno. A cápsula polissacarídica age como barreira inespecífica, contornando as defesas do hospedeiro e limitando a interação com fagócitos. O dano ao tecido endotelial causado pela invasão bacteriana deve-se principalmente ao mecanismo de defesa imune do hospedeiro (CORDEIRO, 2013).

O mecanismo que permite a invasão dos patógenos ao SNC ainda não foi totalmente esclarecido. Evidências experimentais sugerem que a entrada de pneumocócicos ocorre pelas veias e vênulas pós-capilares cerebrais, uma vez que as junções interendoteliais destas estruturas são fracas e permitem a passagem de leucócitos e moléculas plasmáticas, além da proximidade destas veias com o espaço subaracnóide. Após entrada no espaço subaracnóide, as bactérias liberam produtos altamente imunogênicos, como fragmentos da parede celular e peptidoglicanos, levando ao aumento da resposta inflamatória do hospedeiro (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004; HOFFMAN; WEBER, 2009; CORDEIRO, 2013).

A replicação das bactérias aumenta o número de células inflamatórias. As perturbações induzidas por citocinas na membrana transportadora promovem um aumento da permeabilidade vascular que leva a perpetuação do processo infeccioso. Estes processos

representam as alterações características no líquido cefalorraquidiano, contagem de células, pH, lactato, proteínas e glicose em pacientes com esta doença (HASBUN *et al.*, 2016).

A severidade da MB depende do tipo de bactéria causadora. Em adultos, a MB provoca danos neuronais no córtex cerebral, hipocampo e ouvido interno e estão associadas a perda de audição, *déficit* motor, problemas cognitivos e com a fala, enquanto que a surdez neurossensorial, seguida de distúrbio convulsivo e *déficit* motor são mais comuns em crianças (ROOS, 2010).

As crianças mais novas estão predominantemente em risco de MB, principalmente por causa de seus sistemas imunológicos imaturos e casos de desnutrição, enquanto que a falta de práticas de imunização também as torna mais suscetíveis à morbidade e mortalidade (ANDERSON *et al.*, 2004). Grande parte das mortes pediátricas, devido à meningite, ocorre em países em desenvolvimento, e 50% dos sobreviventes de meningite na infância apresentam alguma sequela neurológica (MACE, 2008).

A identificação do agente etiológico da meningite é fundamental para a escolha da terapia mais apropriada e o diagnóstico deve apresentar especificidade e sensibilidade. Mesmo com um grande número de terapias disponíveis, o diagnóstico diferencial das meningites pode prevenir o uso desnecessário de antibióticos e internação prolongada dos pacientes com formas benignas da doença. Além disso, o uso de anti-inflamatórios em formas pouco frequentes de MB maligna pode agravar o quadro clínico dos pacientes, aumentar o custo do tratamento e dos efeitos indesejáveis do uso de antibióticos (RAYMOND, 2000; SURINDER; BINEETA; MEGHA, 2007).

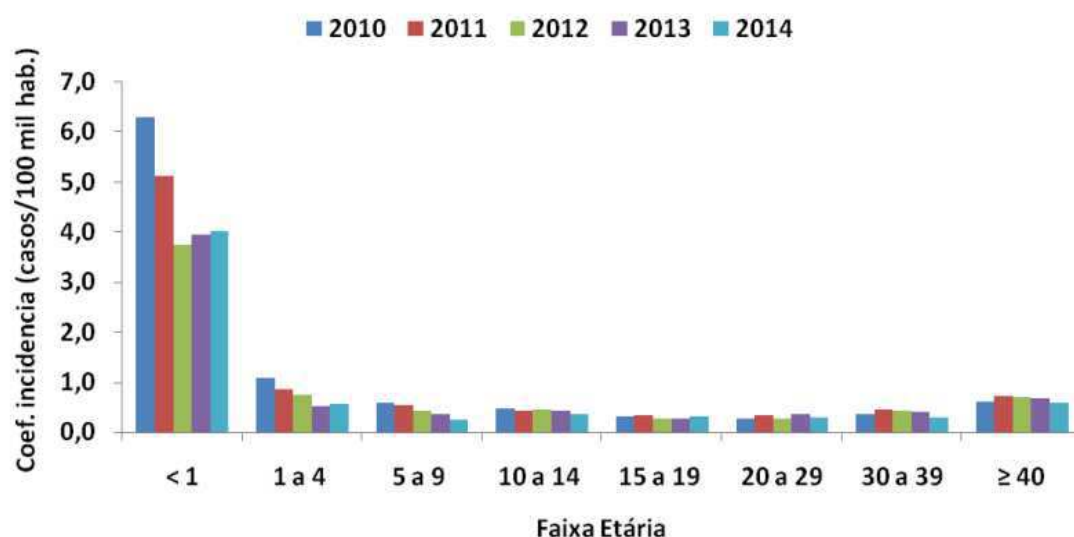
As formas de diagnóstico das MB são divididas em duas vertentes: o diagnóstico clínico e o diagnóstico laboratorial. O diagnóstico clínico é realizado na presença de sinais e sintomas característicos da doença. Os primeiros sintomas clínicos da MB são inespecíficos, incluem febre, mal-estar e dor de cabeça, evoluindo para rigidez na nuca, fotofobia, fonofobia e vômitos. Outros sintomas incluem sinal focal neurológico e aumento da pressão intracraniana (MACE, 2008; KIM, 2010). Dosagens no líquido, de glicose e proteínas, contagem diferencial de leucócitos, bacterioscopia e aglutinação em látex são os testes geralmente disponíveis para o diagnóstico presuntivo das meningites nos hospitais de referência. O diagnóstico confirmatório depende dos resultados da cultura celular ou reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção e identificação dos patógenos no líquido ou no sangue, sendo consideradas “padrão ouro” (BROUWER; TUNKEL; VAN DE BEEK, 2010).

No entanto, o resultado da cultura celular demora aproximadamente 24 horas, muito além da janela terapêutica, que pode prejudicar o tratamento prévio com antibióticos específicos (ABDINIA; REZAEI; OSKOUIE, 2014), enquanto que a PCR necessita de um laboratório especializado com mão de obra qualificada para a realização dos testes (CASTRO *et al.*, 2014).

Durante os últimos anos, a epidemiologia da MB mudou drasticamente, visto que, o *H. influenzae*, antes uma das maiores causas da meningite, praticamente desapareceu de países desenvolvidos, tornando-se um grande exemplo da eficiência das campanhas de vacinação. A utilização de vacinas polissacarídicas pneumocócicas conjugadas levaram a um declínio significativo de doenças pneumocócicas invasivas, incluindo a meningite. No entanto, um problema emergente é a resistência de pneumocócicos a antibióticos polissacarídicos (HOFFMAN; WEBER, 2009).

No Brasil, os principais causadores da doença pneumocócica foram incorporados na vacina pneumocócica 10-valente, que desde 2010 foi implementada no calendário nacional de imunização pelo Ministério da Saúde. Foi observada uma redução de aproximadamente 30% no número de casos de meningite pneumocócica para a faixa etária coberta pela vacina (**Figura 3**) (CORDEIRO, 2013).

Figura 3: A Epidemiologia da MB no Brasil em diferentes faixas etárias nos anos de 2010 a 2014.



Fonte: Obtido em Moraes (2015).

Nos países em desenvolvimento, tem-se observado avanços na produção de vacinas para MB. Apesar dos avanços na terapia antibacteriana e o desenvolvimento de vacinas, a meningite bacteriana continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade em

pacientes pediátricos. Países com poucos recursos e restrições econômicas, são incapazes de oferecer os benefícios da tecnologia de vacinas preventivas.

O **Quadro 1** apresenta o quadro da etiologia das MB no Brasil em 2015 e revela que os casos de meningite provocadas pela *S. pneumoniae* ainda são evidentes. O grande número de casos não especificados, demonstram a falta de tecnologia para realizar o diagnóstico apropriado da doença. O desenvolvimento de biossensores simples e pouco dispendiosos se apresenta como uma proposta interessante para essa problemática, uma vez que permitem a realização de testes rápidos, em locais com baixa acessibilidade e com poucos recursos financeiros.

Quadro 1: Etiologia das MB no Brasil no ano de 2015.

Etiologia	Casos	%
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.617	28
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	947	16
<i>Haemophilus influenzae</i>	118	2
Outras bactérias	1.371	23
Bactéria não especificada	1.795	31

Fonte: Obtido em Moraes (2015).

A tecnologia dos biossensores vem apresentando crescimento significativo no que diz respeito ao diagnóstico em tempo real. Os testes podem ser feitos por pessoal não especializado e utilizando pequenos volumes de amostras. Vantagens como tamanho reduzido, baixo custo de fabricação, elevadas sensibilidade e especificidade, e detecção em tempo real tornam essa tecnologia atrativa (Bora e Sett, 2013; Liu *et al.*, 2015). A alta mortalidade e morbidade das meningites bacterianas e a demora na identificação do patógeno por meio dos métodos de diagnóstico tradicionais são atrativos para o desenvolvimento de biossensores, visando o diagnóstico eficiente e diferencial desta doença.

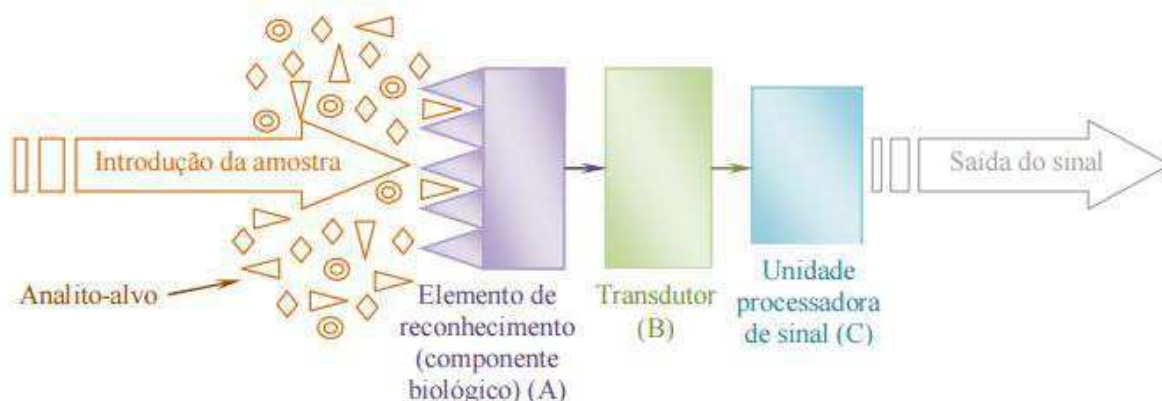
1.2 Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico no qual uma entidade de reconhecimento biológico é acoplada a um transdutor, com propósito de converter o evento de reconhecimento em um sinal mensurável. Os biossensores empregam o reconhecimento biomolecular para realizar análises seletivas. São ferramentas analíticas constantemente estudadas e aprimoradas. A elevada seletividade do elemento biológico permite desenvolver dispositivos com grande especificidade. As análises são realizadas em tempo real e em

misturas complexas, sem a necessidade de um pré-tratamento da amostra. Sua eficiência tem sido comprovada e o seu potencial de aplicação abrange várias áreas. As principais vantagens são: elevada sensibilidade, especificidade, portabilidade, rapidez, baixo custo de produção e uso *in loco* (D'ORAZIO, 2003; WANG, 2006). Enquanto que como suas principais limitações, podem ser citados: interferentes na amostra, pouca estabilidade em longo prazo e dificuldades na transferência de elétrons (MEHRVAR; ABDI, 2004).

Tem-se observado um grande esforço da comunidade científica para incorporação da tecnologia de biossensores em diferentes áreas. As principais aplicações incluem diagnósticos clínicos, análises de alimentos e fármacos, agricultura, bioterrorismo, monitoramento ambiental e industrial (CAGNIN *et al.*, 2009; MEHROTRA, 2016). As principais etapas envolvendo biossensores são introdução da amostra, reconhecimento do analito, transdução do sinal e leitura (**Figura 4**).

Figura 4: Esquema ilustrativo de um biossensor.



Fonte: Obtido em Rodrigues (2014).

O termo "biossensor" surgiu na literatura científica no final de 1970, no entanto seus conceitos básicos foram observados em 1962, no dispositivo proposto por Clark e Lyon conhecido como "eletrodo enzimático", o qual se baseia no acoplamento da enzima glicose oxidase a um sensor amperométrico de oxigênio. Nos anos seguintes, eletrodos enzimáticos para uma variedade de substâncias foram desenvolvidos pelo acoplamento de enzimas específicas em sensores eletroquímicos. Em 1977, Rechnitz e colaboradores desenvolveram um eletrodo específico para o aminoácido arginina utilizando microrganismos imobilizados sobre a superfície de um eletrodo de gás amônia, a plataforma foi descrita como "sensor bio-seletivo". Posteriormente, o nome foi abreviado para biossensor (D'ORAZIO, 2003).

O crescimento no campo de biossensores tem sido significativo nas últimas décadas. Quando um dos principais periódicos, *Biosensors and Bioelectronics*, foi lançado em 1985

pela editora Elsevier, havia cerca de cem trabalhos publicados. Recentemente, um elevado número de trabalhos sobre biossensores estão disponíveis na literatura e novas plataformas estão sendo constantemente desenvolvidas (TURNER, 2013).

Uma pesquisa de mercado realizada pela companhia MarketsandMarkets® em 2015 revela que o mercado mundial de biossensores foi avaliado em 11,39 bilhões de dólares em 2013, com expectativa de alcançar 22,68 bilhões em 2020. Os biossensores portáteis representaram 80% do mercado em 2013. Estimativas indicam que biossensores para diagnóstico *point-of-care* devem crescer consideravelmente até 2020, podendo representar até 57% do mercado mundial. O aumento da demanda de dispositivos de diagnóstico de *point-of-care*, a crescente incidência de diabetes e a necessidade de melhorar a atual infraestrutura de saúde são os principais impulsionadores do crescimento do mercado de biossensores.

1.2.1 Classificação dos biossensores

Os biossensores podem ser classificados como biossensores de afinidade e catalíticos. Biossensores de afinidade tem como princípio a interação específica entre o elemento de reconhecimento biológico e o analito de interesse, são geralmente utilizados anticorpos e oligonucleotídeos. Nos biossensores catalíticos, a detecção é realizada mediante o uso de enzimas ou biomoléculas catalíticas, que podem ser regeneradas após utilização. Em ambos a detecção pode ser direta ou indireta. No primeiro caso a interação biológica é medida diretamente sobre a superfície do transdutor e tipicamente são adotados receptores celulares, oligonucleotídeos e anticorpos. Os sistemas de detecção direta, mais comuns, empregam Ressonância de Plasma de Superfície (SPR), Onda Evanescente, Microbalança de Cristal de Quartzo (MCQ) e sistemas Optomecânicos. Biossensores de detecção indireta utilizam elementos secundários, como marcadores moleculares e produtos de reação. Os sistemas mais comuns utilizam enzimas, biomoléculas fluorescentes e mediadores eletroativos. Os sistemas de detecção indireta apresentam maior estabilidade, enquanto sistemas de detecção direta apresentam menor tempo de análise (RASOOLY, 2005; RUMAYOR *et al.*, 2005; RODRIGUES, 2014).

Durante a interação entre a biomolécula e o analito ocorrem mudanças em um ou mais parâmetros físico-químicos associados a esta interação. Esta mudança pode produzir íons, elétrons, gases, calor, massa ou luz, que podem posteriormente ser convertidos em sinais elétricos pelos transdutores e em seguida amplificados e processados. Os biossensores também podem ser classificados de acordo com o tipo de transdutor empregado. As principais

classes de transdutores são: eletroquímico, elétrico, óptico, piezoelétrico e térmico (**Quadro 2**) (SETHI, 1994; MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012). Os transdutores eletroquímicos são os mais encontrados na literatura (FRANCO, 2010).

Quadro 2: Principais sistemas de transdução aplicados em biossensores.

Sistema de transdução	Técnica
Piezelétrico	Eletrogravimetria
Eletroquímico	Amperometria, Potenciometria e Voltametria
Óptico	Luminescência e Fluorescência
Calorimétrico	Calorimetria

Fonte: Obtido em Rodrigues (2014).

Um fator muito importante para o desenvolvimento de um biossensor é a seleção da metodologia para a imobilização do biocomponente. O desempenho do biossensor está diretamente relacionado com a eficiência desta etapa. As condições químicas e físicas (pH, temperatura e contaminantes) devem ser controladas e otimizadas. O processo de imobilização de material biológico em escalas nanométricas sobre a superfície de eletrodos é objeto de estudo e relatos científicos nas últimas décadas, uma vez que é ampla a sua aplicabilidade e por ser uma tecnologia emergente. As formas de imobilização frequentemente utilizadas são adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada (*cross linking*) e oclusão (*entrapping*) (KISSINGER, 2005; RUMAYOR *et al.*, 2005; IOST *et al.*, 2011). O **Quadro 3** aborda características, vantagens e desvantagens destas metodologias.

Quadro 3: Métodos de imobilização tradicionais.

Técnica de Imobilização	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Adsorção Física	A imobilização ocorre mediante forças iônicas, ligação de hidrogênio e forças de Van Der Waals.	Simples. Baixo custo. Matriz regenerável. Sem modificações do ERB*.	Forças de ligação relativamente fracas. Diretamente afetado por condições externas.
Oclusão	Retenção física do ERB* nas cavidades interiores da matriz.	Baixo Custo. Necessita pouco ERB* Confinamento entre ERB* próximo ao transdutor.	Ligação fraca. Alta barreira de difusão. Pode ocorrer perda de ERB*. Matriz não-regenerável.

Ligação cruzada	Cadeias poliméricas ramificadas são interligadas ao ERB* irreversivelmente.	Custo moderado Mínima perda de ERB*. Grande estabilidade.	Alta barreira de difusão. Tratamento com substâncias tóxicas. Matriz não-regenerável.
Ligação Covalente	A biomolécula forma uma ligação covalente com grupos ativados na superfície da matriz (ex. $-NH_3$ e $-SH$).	Manipulação mínima. Estável em condições extremas. Uniformidade e homogeneidade.	Custo elevado. Matriz não-regenerável. Tratamento com substâncias tóxicas. Inadequado para ERB* muito sensíveis.

ERB*: Elemento de reconhecimento biológico.

Fonte: Adaptado de Rumayor *et al.*, (2005), Franco (2010) e Monošík; Stred'anský; Šturdík (2012).

A classificação mais comum dos biossensores diz respeito ao tipo de biomolécula empregada no reconhecimento biológico. Biossensores enzimáticos utilizam como componentes biológicos enzimas e peptídios; Genossensores são utilizados oligonucleotídeos, produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) e fragmentos de DNA. Imunossensores utilizam antígenos e anticorpos e os biossensores microbiológicos podem utilizar bactérias, fungos e organelas (KOROTKAYA, 2014).

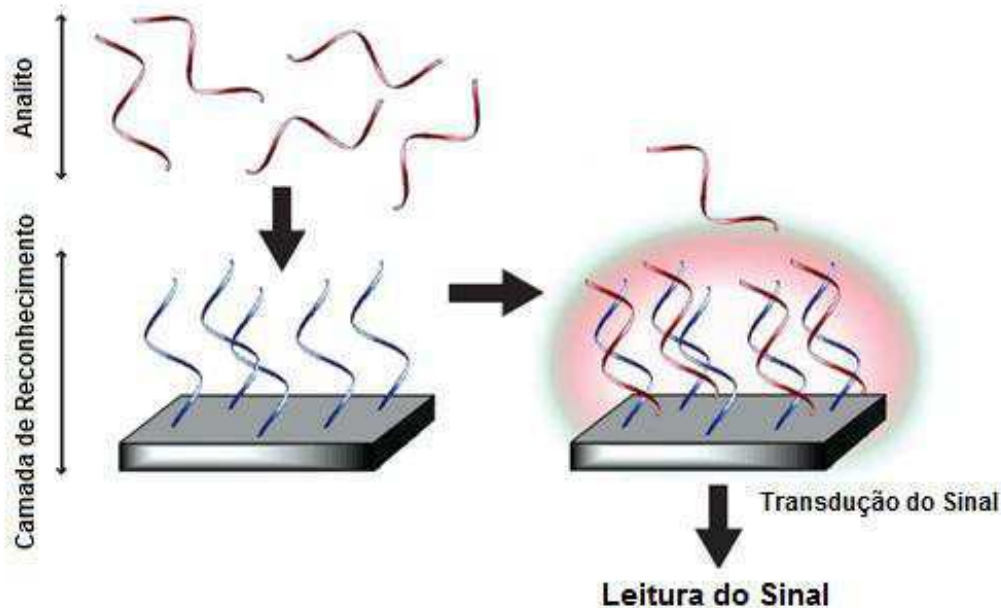
1.3 Genossensores

A detecção de sequências específicas de DNA é objeto de estudo de muitas áreas. Pesquisas envolvendo a hibridização do DNA e indicadores moleculares para monitorar o evento têm se intensificado nos últimos anos, sendo observado o desenvolvimento de uma variedade de técnicas e materiais com esta finalidade. A utilização de DNA na construção de sensores biológicos é um atrativo devido à elevada especificidade das sequências complementares de DNA, que são capazes de hibridizar pelo pareamento das bases nitrogenadas, oferecendo uma maneira simples, econômica e rápida de realizar análises genéticas. As aplicações mais comuns de genossensores incluem a detecção de mutações e modificações genéticas, diagnóstico e monitoramento de infecções virais e microbianas, câncer, análise forense, teste de paternidade e detecção de armas biológicas (KIMMEL *et al.*, 2012; ALVES-BALVEDI *et al.*, 2016).

Atualmente, um grande número de sistemas de detecção baseados na hibridização do DNA vem sendo desenvolvidos. Na configuração típica de um genossensor, uma sequência

específica de DNA simples fita (sonda) é imobilizada sobre um transdutor e quando em contato com o alvo complementar ocorre a geração de um sinal (**Figura 5**). Diferentes métodos de transdução podem ser aplicados para monitorar a hibridização, sendo geralmente adotados transdutores ópticos e eletroquímicos (DRUMMOND; HILL; BARTON, 2003; SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

Figura 5: Esquema de um genossensor.



Fonte: Adaptado de Drummond; Hill; Barton (2003).

A tecnologia de microarranjos de DNA (DNA *microarray*) ou *chips* de DNA é considerada como precursora dos genossensores. Os microarranjos de DNA são sistemas que permitem análises genéticas simultâneas em sistemas miniaturizados. A tecnologia utiliza uma plataforma sólida, geralmente lâmina de vidro ou sílica, no qual amostras de DNA, oligonucleotídeos e produtos de PCR (sondas) são imobilizadas em quantidades e posições precisamente definidas. Marcadores fluorescentes (fluoróforos) são previamente utilizados nas amostras biológicas, que posteriormente são inseridas na plataforma de análise, sob condições de temperatura e pH específicas. Após o processo de hibridização, cada lâmina é lavada para remoção de alvo excedente, e expostas à ação de raios laser, que excitam os fluoróforos incorporados ao alvo, a intensidade do sinal deve ser diretamente proporcional a expressão de um determinado gene (ROSA; ROCHA; FURLAN, 2007; CAGNIN *et al.*, 2009).

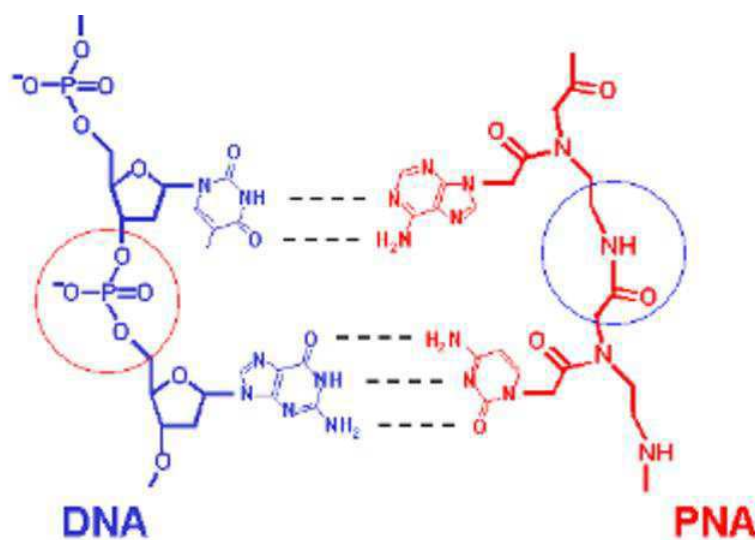
O desenvolvimento de genossensores e *microarrays* de DNA aumentou significativamente nas últimas décadas. Ambos se apresentam como dispositivos eficientes,

rápidos, sensíveis e permitem análises em tempo real. No entanto, a tecnologia de *microarrays* e as diferentes formas de preparação da amostra podem apresentar limitações que influenciam na sensibilidade, acurácia, especificidade e reprodutibilidade dos resultados (DRAGHICI et al., 2006; SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

A tecnologia dos genossensores eletroquímicos é considerada mais apropriada para testes *in situ* devido sua portabilidade. Os genossensores também podem ser utilizados para detectar compostos de baixo peso molecular, como toxinas, poluentes e drogas (SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008).

A composição das sondas de DNA é fundamental para a especificidade do genossensor. Novos tipos de sondas estão sendo desenvolvidas para melhorar a sensibilidade, especificidade e estabilidade dos genossensores, sendo relevante enfatizar a utilização de oligonucleotídeos marcados e os ácidos nucleicos peptídicos (PNAs). Os PNAs são compostos que mimetizam o DNA, entretanto o esqueleto negativo fosfato-pentose é substituído por uma cadeia neutra contendo unidades repetidas de um pseudo-peptídeo com ligações 2-aminoetilglicina. Os PNAs podem formar um duplex com sequências complementares de DNA (**Figura 6**), sendo observada maior estabilidade térmica, possibilidade da formação do duplex em soluções de baixa força iônica, estabilidade em intervalos amplos de pH e elevada sensibilidade para detecção de mutações de ponto (SASSOLAS; LECA-BOUVIER; BLUM, 2008; FERREIRA, 2014).

Figura 6: Modelo esquemático de moléculas de PNA e DNA.



Fonte: Obtido em: Mateo-Marti (2007).

Genossensores ópticos apresentam elevadas sensibilidade e baixos limites de detecção, no entanto podem requerer instrumentação mais sofisticada e dispendiosa (DRUMMOND; HILL; BARTON, 2003; CAGNIN *et al.*, 2009). Uma vertente propõe uma metodologia bem simples para análises ópticas de ácidos nucleicos. Nesta metodologia são utilizados fragmentos de DNA marcados com nanopartículas de ouro ou prata, quando em contato com o alvo complementar observa-se uma mudança de cor (STORHOFF *et al.*, 1998; ALEXANDRE *et al.*, 2001). Esta tecnologia permite realizar análises clínicas de forma simples e rápida, minimizando os custos associados à instrumentação requerida para análises ópticas.

Nas últimas décadas as plataformas eletroquímicas cresceram a um ritmo impressionante, combinados com inovações em nanotecnologia e microchips, os sensores eletroquímicos provaram ser sistemas versáteis, robustos e eficientes para realizar análises biológicas (ZHANG; GUO; CUI, 2009). As vantagens das plataformas eletroquímicas incluem: 1) elevada sensibilidade, baixo custo e rápido *screening*; 2) marcadores eletroativos apresentam elevada estabilidade; 3) os marcadores fluorescentes podem ser adaptados e aplicados para detecção eletroquímica em potenciais específicos; 4) o desenvolvimento de sistemas de circuitos integrados em escala industrial; 5) o desenvolvimento e constante aprimoramento dos materiais e plataformas eletroquímicas (SONG; XU; FAN, 2006).

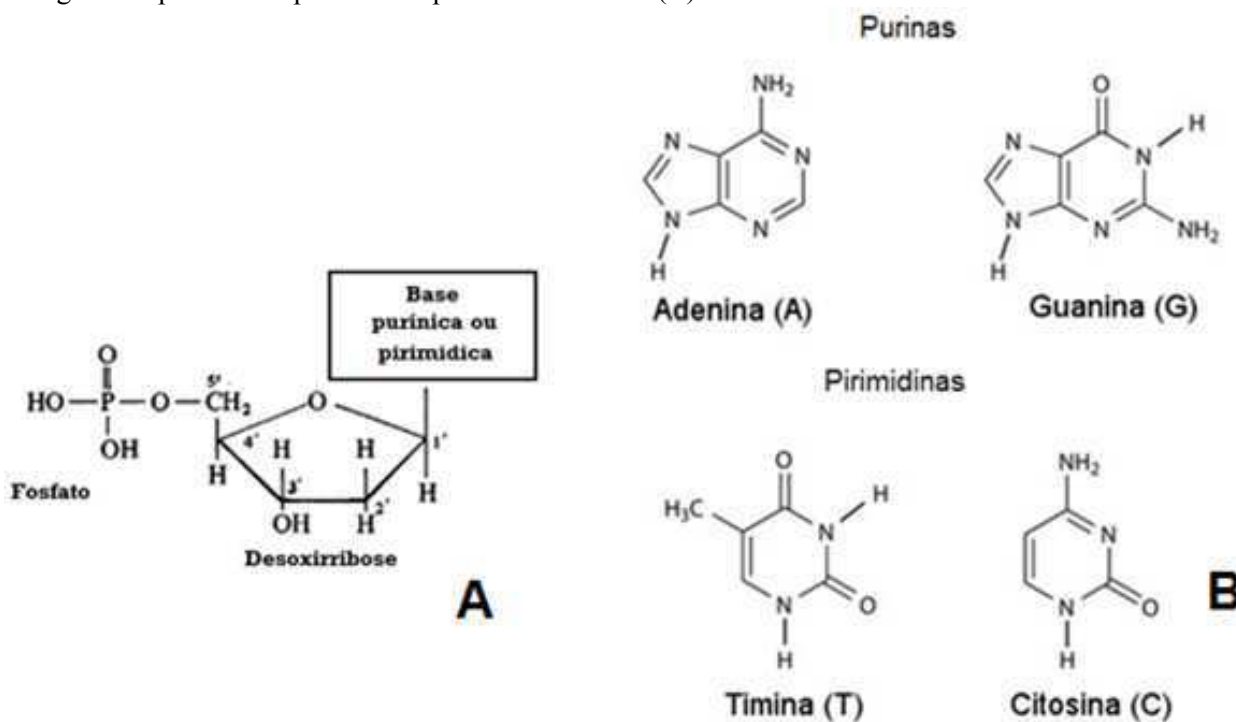
1.3.1 DNA: Estrutura e Propriedades

O DNA tem um papel muito importante para manutenção da vida, é a molécula responsável pelo armazenamento e a transferência de informação genética (IOST *et al.*, 2011). O conjunto completo de informações contidas no DNA de um determinado organismo é denominado genoma, que contém a informação de todas as proteínas que o organismo pode sintetizar (ALBERTS *et al.*, 2002). Os organismos podem ser discriminados de acordo com características do seu DNA. Novos métodos para sequenciamento e o aprimoramento dos procedimentos computacionais desencadearam uma enorme quantidade de dados genômicos, com aplicabilidade para o desenvolvimento de plataformas de análise genética (MADIGAN *et al.*, 2015).

A molécula de DNA é formada por duas fitas simples de DNA, constituídas por quatro tipos de nucleotídeos. Os nucleotídeos apresentam três componentes característicos: uma pentose, um grupo fosfato e uma base nitrogenada. Nesta estrutura, uma desoxirribose está ligada a um grupo fosfato simples e uma das quatro bases nitrogenadas, adenina (A), citosina

(C), guanina (G) ou timina (T). As bases são classificadas em purínicas, onde a estrutura contém dois anéis ou pirimídicas, cuja estrutura contém um único anel (**Figura 7**) (ALBERTS *et al.*, 2002).

Figura 7: Unidade monomérica de um nucleotídeo do DNA (A) e estrutura química das bases nitrogenadas purínicas e pirimídicas presentes no DNA (B).

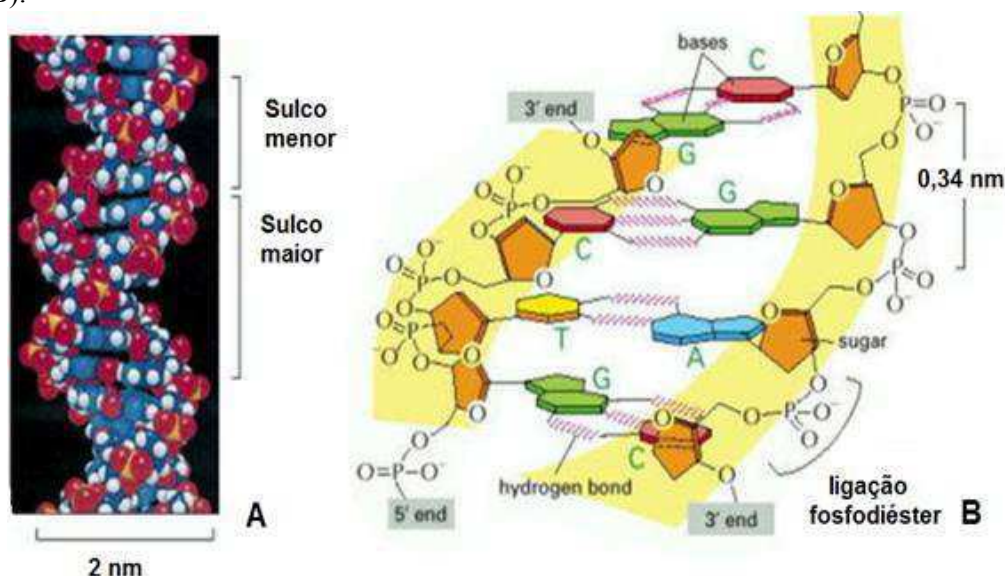


Fonte: Adaptado de Nelson; Cox; Lehninger (2013).

Os nucleotídeos estão ligados covalentemente por ligações fosfodiésteres, que possuem mesma orientação ao longo da cadeia, conferindo polaridades específicas nas extremidades. Os esqueletos covalentes dos ácidos nucleicos consistem em resíduos fosfato e pentoses alternantes, com as bases nitrogenadas voltadas para o interior da hélice, perpendiculares ao longo do eixo unidos entre si por ligações de hidrogênio e outras forças intermoleculares fracas. Os grupos fosfatos possuem pKa próximo de 0, portanto estão carregados negativamente em pH 7,0. Os grupos hidroxila dos resíduos da pentose realizam ligação de hidrogênio com moléculas de água. Estas ligações que envolvem os grupos amina e carbonila das bases nitrogenadas são as maiores responsáveis pela associação complementar das fitas de ácidos nucleicos e o empilhamento das bases nitrogenadas contribui para sua estabilidade. O pareamento das bases adenina com timina (A=T) e citosina com guanina (G≡C) favorece energeticamente a formação do estado duplex. Para as bases nitrogenadas se encaixarem de forma mais adequada, as cadeias de DNA devem ser anti-paralelas, ou seja, a polaridade de uma fita deve apresentar orientação oposta a outra fita. A separação das fitas complementares é dificultada quando maior for o quociente A=T, G≡C e outros pareamentos

de bases tendem a desestabilizar a estrutura de dupla hélice. O pareamento das duas fitas cria um sulco principal e um sulco secundário (**Figura 8A**). O diâmetro da dupla hélice é de aproximadamente 2 nm, e a distância entre bases adjacentes é de aproximadamente 0,34 nm (**Figura 8B**) (ALBERTS *et al.*, 2002; NELSON; COX; LEHNINGER, 2013).

Figura 8: Modelo de preenchimento tridimensional para estrutura do DNA (A) e uma curta secção de DNA (B).



Fonte: Adaptado de Alberts *et al.*, (2002).

O DNA pode sofrer desnaturação reversível através de variações extremas de pH ou pelo aquecimento. Durante a desnaturação, ocorre a ruptura das ligações de hidrogênio e do empilhamento das bases, induzindo o desenrolamento da dupla hélice e a formação de duas fitas simples (ssDNA). A renaturação de uma molécula de DNA, também conhecida como anelamento e hibridização, é um processo rápido, onde os segmentos desenrolados das fitas se enrolam novamente produzindo um duplex. Em condições específicas esse processo é otimizado. Cada espécie de DNA possui uma temperatura de desnaturação e anelamento característica, propriedade dependente do conteúdo de pares de bases G≡C e força iônica da solução (NELSON; COX; LEHNINGER, 2013).

Atualmente muitos métodos estão disponíveis para quantificação de DNA, sendo as técnicas mais comumente utilizadas a espectrofotometria no UV-Vis e eletroforese em gel, pelas quais podem ser obtidas informações sobre a concentração, pureza e integridade de amostras contendo DNA. A espectrofotometria no UV-Vis é considerada uma técnica simples e eficiente para análises de ácidos nucleicos. A absorbância em 260 nm é utilizada para quantificar DNA, enquanto a razão $A_{260/280}$ fornece uma estimativa da pureza da amostra.

Amostras de elevada pureza devem apresentar razão próxima de 1,8 (LINACERO; RUEDA; VÁZQUEZ, 1998; NIELSEN *et al.*, 2006).

1.3.2 Biossensores Eletroquímicos de DNA

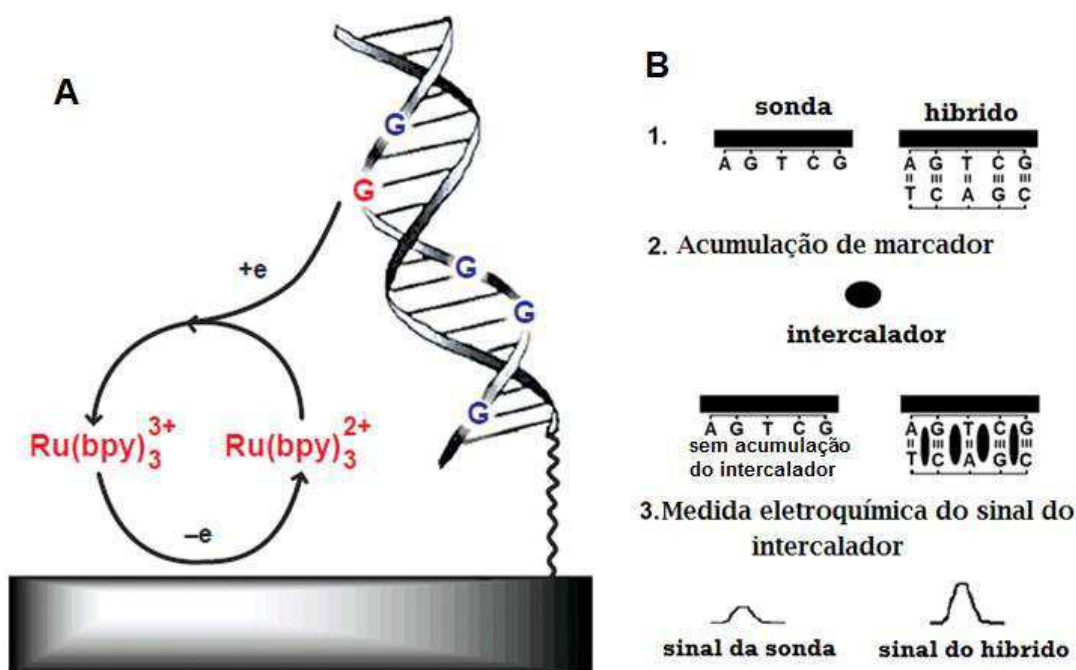
Os avanços tecnológicos em nanotecnologia e genética observados nos últimos anos foram importantes para fornecer novas ferramentas para o desenvolvimento de plataformas de análises biológicas. Sensores eletroquímicos de DNA são promissores para análise de ácidos nucleicos, por causa de sua portabilidade, rapidez de resposta, alta sensibilidade, seletividade e baixo custo. Um número expressivo de plataformas para a detecção eletroquímica de DNA vem sendo desenvolvida recentemente (DRUMMOND; HILL; BARTON, 2003; SILVA *et al.*, 2008; CAGNIN *et al.*, 2009).

A técnica consiste em utilizar sequências de DNA imobilizadas sobre a superfície do transdutor eletroquímico, modificado ou sem modificação, como elemento de reconhecimento, para monitorar hibridização (SILVA *et al.*, 2009). A detecção eletroquímica da hibridização é baseada na diferença no comportamento eletroquímico da sonda (*ssDNA*) e quando em contato com o alvo complementar (*dsDNA*). São comumente adotados métodos de detecção direta e indireta. No primeiro, as bases nitrogenadas podem ser oxidadas ou reduzidas na superfície do transdutor, sendo monitorada a corrente de pico anódica ou catódica durante a hibridização. Entre as quatro bases que compõe a molécula de DNA, a guanina é a mais facilmente oxidada, sendo considerada a base mais adequada para monitorar a detecção direta. O processo depende do comprimento da cadeia de DNA, número de bases oxidáveis e reduzíveis, temperatura, conformação, tempo de contato e eletrólito. Embora esta metodologia seja simples e com elevada sensibilidade, a detecção direta pode requerer potenciais elevados para oxidação das bases nitrogenadas, ocasionando produção de corrente capacitiva e oxidação de espécies interferentes (KERMAN; KOBAYASHI; TAMIYA, 2004; FRANCO, 2010; FERREIRA, 2014).

O método indireto detecta a hibridização por meio de indicadores moleculares, nomeadamente mediadores e intercaladores eletroativos. Ambos apresentam elevadas sensibilidade, seletividade e estabilidade. Os indicadores devem ser moléculas relativamente pequenas, possuir resposta eletroquímica bem definida e em potenciais baixos. Os mediadores eletroquímicos geralmente são complexos metálicos, como os complexos de polipiridil de Ru(II) e Os(II), que atuam mediando a oxidação da guanina, onde o sinal obtido pelo mediador é proporcional a quantidade de guanina oxidável (**Figura 9A**) (DRUMMOND;

HILL; BARTON, 2003; KERMAN; KOBAYASHI; TAMIYA, 2004). Os intercaladores são geralmente moléculas pequenas, aromáticas e hidrofóbicas, que conseguem se ligar entre os pares de bases adjacentes da dupla hélice (**Figura 9B**), geralmente possuem maior afinidade pelo DNA de fita dupla, porém algumas espécies se ligam preferencialmente ao DNA simples fita. Os intercaladores de DNA mais observados em plataformas eletroquímicas são o brometo de etídio e azul de metileno (IOST *et al.*, 2011; BIEBRICHER *et al.*, 2015; ALVES-BALVEDI *et al.*, 2016).

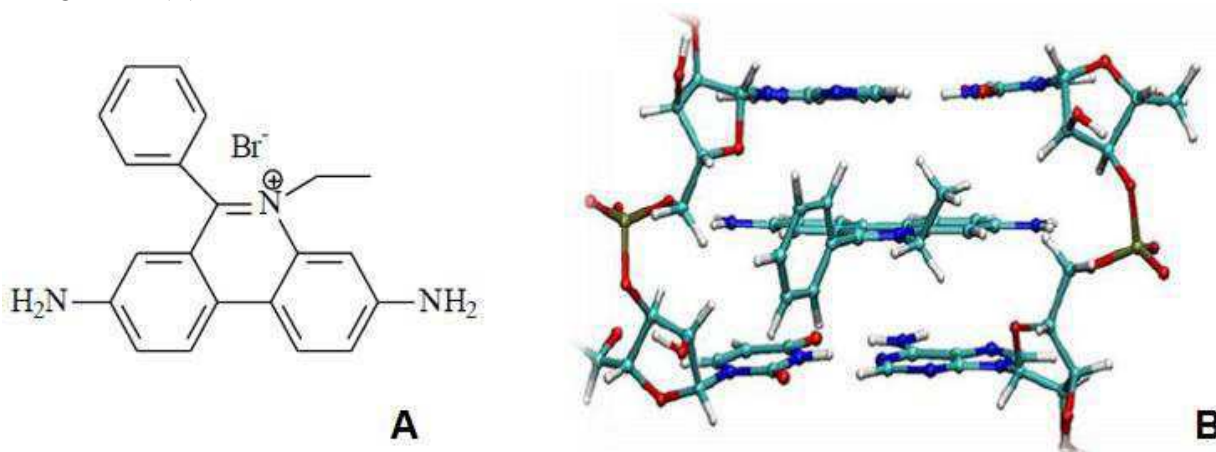
Figura 9: Mecanismo de funcionamento de um genossensor eletroquímico de detecção indireta utilizando um mediador eletroativo (A) e agentes intercaladores (B).



Fonte: Adaptado de Drummond; Hill; Barton (2003) e Kerman; Kobayashi; Tamiya (2004).

O brometo de etídio (BE) é considerado um dos melhores agentes intercaladores para o desenvolvimento de genossensores. É um produto de baixo custo, eletroquimicamente oxidável e a intercalação é imediata. Apresenta aumento na intensidade de fluorescência quando intercalado com a dupla fita de DNA (*dsDNA*) (WANG; QU; GUO, 2008; ALVES-BALVEDI *et al.*, 2016). A intercalação ocorre entre as bases empilhadas adjacentes, causando uma distorção estrutural e um leve estiramento na dupla hélice. O BE atua como inibidor de um grande número de processos biológicos importantes, como síntese, transcrição e transporte de DNA. Essas características são consequência da sua elevada afinidade pela dupla hélice de DNA (PASTRE *et al.*, 2005; NAFISI *et al.*, 2007). A estrutura do BE e seu mecanismo de intercalação podem ser observados na **Figura 10**.

Figura 10: Estrutura química da molécula BE (A) e ação intercalante do BE entre as bases nitrogenadas (B).



Fonte: Obtido em Rodrigues (2014).

O BE é um composto aromático planar, com grupos aminobenzênicos nas extremidades. Os sistemas π conjugados são os maiores responsáveis pela fluorescência e por suas características eletroquímicas. O comportamento eletroquímico do BE já foi estudado em diferentes eletrodos, como carbono vítreo, grafite e diamante dopado com boro (BDD) (NAFISI *et al.*, 2007; BALVEDI *et al.*, 2014). Estudos sobre o comportamento do BE em eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos derivados de aminofenóis já foram estudados pelo Laboratório de Biossensores (BIOSENS) e Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia (LAFIP-NANOTEC) da Universidade Federal de Uberlândia.

Os primeiros genossensores eletroquímicos eram baseados na redução e oxidação do DNA em eletrodos de mercúrio. A oxidação do DNA vem sendo conduzida em um grande número de plataformas, incluindo eletrodos derivados de carbono, ouro, óxido de índio dopado com estanho (ITO) e eletrodos modificados por polímeros condutores (LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999). A utilização de nanopartículas levou a análise eletroquímica a uma nova era, aumentando significativamente a sensibilidade e os limites de detecção. Materiais em nanoescala têm sido usados para otimizar a imobilização de biomoléculas na superfície do eletrodo, para promover reações eletroquímicas e amplificar o sinal originado no evento de biorreconhecimento. Os nanobiosensores eletroquímicos são promissores nas áreas de diagnóstico e detecção de organismos infecciosos e cancerígenos. Um grande número de trabalhos sobre a utilização de nanomateriais para o desenvolvimento de sensores de DNA está disponível na literatura aberta e novas plataformas estão sendo constantemente desenvolvidas (PUMERA *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2010; FERNANDES *et al.*, 2015).

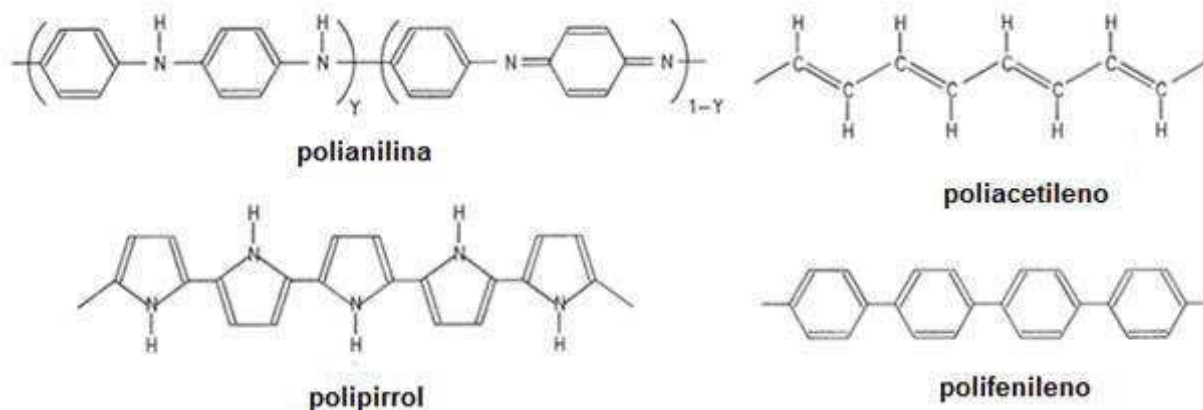
1.4 Eletrodos Quimicamente Modificados e Polímeros Aplicados em Biossensores

Eletrodos quimicamente modificados (EQM) se tornaram particularmente atrativos por oferecerem elevadas sensibilidade e seletividade. EQMs são dispositivos contendo um material condutor ou semi-condutor com a superfície modificada por uma espécie química. A modificação tem como objetivo controlar as propriedades químicas e físicas na interface eletrodo-solução (SOUZA, 2014).

Os polímeros condutores (PCs) têm sido intensamente investigados durante as últimas décadas e isso se deve a sua ampla gama de aplicação. Sua utilização no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos é promissora e descrita por um grande número de pesquisadores (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007). Os PCs podem modificar facilmente a superfície dos transdutores eletroquímicos, incorporando grupos funcionais à superfície, promovendo elevada afinidade e estabilidade do biocomponente. Além disso, as estruturas químicas dos PCs são passíveis de modificação e modelagem química, permitindo a alteração de suas propriedades elétricas, mecânicas e químicas. Os polímeros condutores são comprovadamente compatíveis com moléculas biológicas em soluções aquosas e podem transferir eficientemente cargas elétricas produzidas pelas reações a circuitos eletrônicos. A eficiência da imobilização de biomoléculas em matrizes poliméricas depende de muitos fatores, entre eles a superfície de contato e a presença de grupos funcionais específicos, como por exemplo, grupamentos amino, hidroxila e carboxílicos, que são os grandes responsáveis pela retenção das biomoléculas (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007; TKACH; NECHYPORUK; YAGODYNETS, 2012).

Os PCs comumente aplicados ao desenvolvimento de biossensores são o polipirrol, polianilina, politiofeno e aminas aromáticas (**Figura 11**) (GERARD; CHAUBEY; MALHOTRA, 2002; BRITO-MADURRO *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

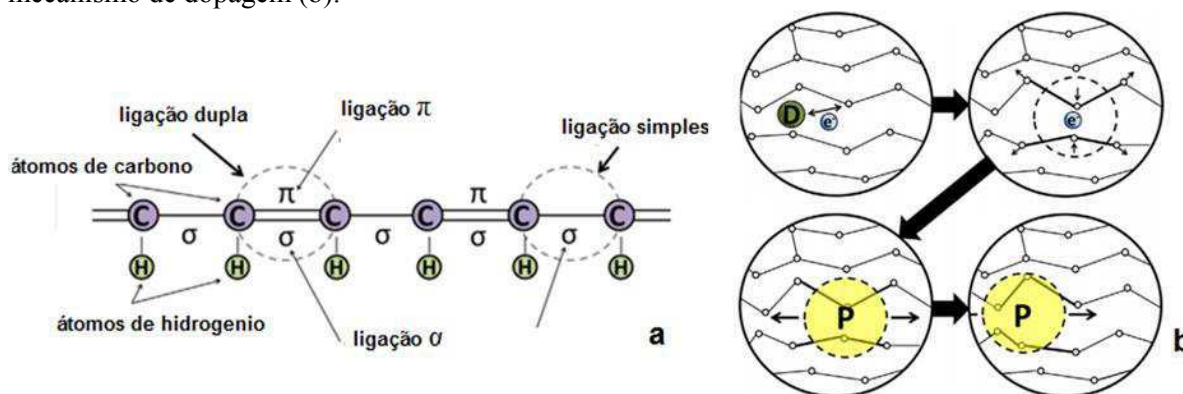
Figura 11: Estrutura química dos polímeros condutores aplicados em biossensores.



Fonte: Adaptado de Gerard; Chaubey; Malhotra (2002).

Polímeros condutores podem conduzir carga, graças à facilidade com a qual os elétrons podem se deslocar entre as cadeias do polímero. A condutividade surge a partir da combinação de vários fatores. Os polímeros possuem um esqueleto de conjugado formado por uma série de ligações simples e duplas alternadas. As ligações simples contêm a ligação sigma, enquanto as ligações duplas apresentam além da sigma, uma ligação π mais fraca (**Figura 12a**). Os orbitais p em série presentes na ligação π se sobrepõem, facilitando o deslocamento dos elétrons e permitindo seu movimento entre os átomos. Além da conjugação, é necessária a presença de um dopante para o polímero ser condutor. O dopante introduz carga elétrica sobre o material pela remoção (dopagem tipo p) ou adição de elétrons (dopagem tipo n) na banda de condução, introduzindo polarons (cátion-radical) e bipolarons na cadeia polimérica (**Figura 12b**). Na síntese eletroquímica o processo de dopagem ocorre devido a compensação de cargas ao longo da cadeia polimérica em contato com eletrólito de suporte (FRANCO, 2010; BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014; RODRIGUES, 2014).

Figura 12: Um esquema da cadeia conjugada, contendo ligações simples e duplas alternadas (a) e mecanismo de dopagem (b).

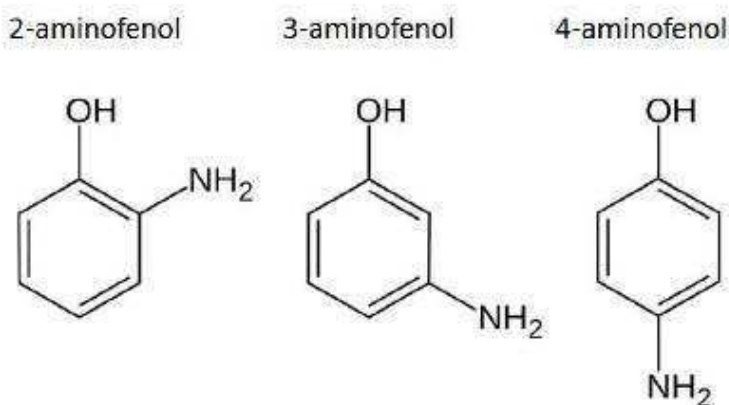


Fonte: Adaptado de Balint; Cassidy; Cartmell (2014).

Matrizes poliméricas condutoras e não-condutoras são excelentes materiais para o desenvolvimento de biossensores já que apresentam espessura e homogeneidade controlados, são quimicamente e mecanicamente estáveis, reprodutíveis, permitem o controle espacial referente ao posicionamento da biomolécula e ao número de sítios ativos presentes na matriz, além de prevenir a adsorção de espécies interferentes (FRANCO, 2010; NAMBIAR; YEOW, 2011). O desenvolvimento de filmes poliméricos e sua aplicação em sensores biológicos têm sido uma das principais atividades do Laboratório de Biossensores (BIOSENS) e o Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia (LAFIP/NANOTEC), sendo destacados os trabalhos de biossensores para diagnóstico molecular utilizando polímeros derivados do ácido hidroxí-fenilacético (RODRIGUES *et al.*, 2015), (SANTOS *et al.*, 2012), 4-aminofenol (CASTRO *et al.*, 2014), (CAETANO *et al.*, 2014), 3-aminofenol (RODRIGUES *et al.*, 2014) e 4-aminotiofenol (BALVEDI *et al.*, 2014).

Uma classe promissora de filmes poliméricos para o desenvolvimento de biossensores são os aminofenóis. Estudos conduzidos por este grupo de pesquisa demonstram a sua estabilidade, reprodutibilidade, eficiência na imobilização de biomoléculas e no desenvolvimento de plataformas para o diagnóstico molecular de biomarcadores (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007; CAETANO *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2014). Os aminofenóis são uma classe de materiais eletroquímicos interessantes. Além do anel aromático, apresentam dois grupos eletroquimicamente oxidáveis ($-NH_2$ e $-OH$), facilitando a polimerização. A posição relativa do grupo amino e hidroxila é muito importante, sendo reportadas propriedades eletroquímicas distintas em seus três isômeros (orto, meta e para) (**Figura 13**) (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007; CHANDRASHEKAR *et al.*, 2011).

Figura 13: Estrutura química dos monômeros isômeros derivados do aminofenol.



Fonte: Obtido em Kochi (2015).

As investigações sobre a modificação de platina, grafite e ouro por polímeros derivados de 4-aminofenol foram reportadas na literatura (CHANDRASHEKAR *et al.*, 2011). A eletropolimerização do 4-aminofenol e sua eficiência na imobilização de bases nitrogenadas, oligonucleotídeos e fragmentos de DNA foi amplamente investigada por este grupo, em eletrodos de grafite (FRANCO *et al.*, 2008), (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007), (AFONSO *et al.*, 2010), (CASTRO *et al.*, 2014) e ouro (FERREIRA *et al.*, 2008), (CAETANO *et al.*, 2014). Os resultados indicam que poli(aminofenóis) são uma plataforma eficiente para melhorar a resposta eletroquímica e facilitar a imobilização de biomoléculas. Sua aplicação em eletroanalítica é promissora, sendo importante enfatizar o desenvolvimento de plataformas para diagnóstico molecular.

1.5 Genossensores Aplicados ao Diagnóstico de Doenças Infecciosas e Inflamatórias

Um teste de diagnóstico é um método para a identificação de uma doença ou condição de um paciente. A importância dos testes de diagnóstico simples, precisos, acessíveis e rápidos é justificada pelo seu impacto no manejo clínico, pois afeta a eficácia da terapia, evita complicações a longo prazo e a transmissão dos patógenos. Os testes de diagnóstico para doenças infecciosas e inflamatórias devem apresentar características como sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade (BANOO *et al.*, 2006). Atualmente, diferentes tipos de biossensores vêm sendo desenvolvidos e aplicados com sucesso para o diagnóstico de patologias cardiovasculares, neurodegenerativas, infecciosas, autoimunes e câncer (RODOVALHO *et al.*, 2015). Um grande número de trabalhos envolvendo o diagnóstico de doenças infecciosas por meio de genossensores está disponível na literatura e a seguir serão abordadas algumas destas plataformas e suas principais características.

Castro e colaboradores (2014) desenvolveram um biossensor eletroquímico para diagnóstico de hepatite C em soro utilizando uma sequência específica de DNA para o vírus imobilizada sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol), utilizando o brometo de etídio como indicador e técnica voltamétrica, obtendo limites de detecção de 2,61 nmol L⁻¹. Niu e colaboradores reportaram um genossensor para diagnóstico de HIV imobilizando um fragmento de ssDNA do vírus sobre um eletrodo de carbono vítreo quimicamente modificado. A hibridização foi monitorada utilizando como indicadores complexos de cobalto, sendo obtidos limites de detecção de 27 pmol L⁻¹. Ittarat e colaboradores (2013) apresentaram um genossensor para o diagnóstico molecular diferencial

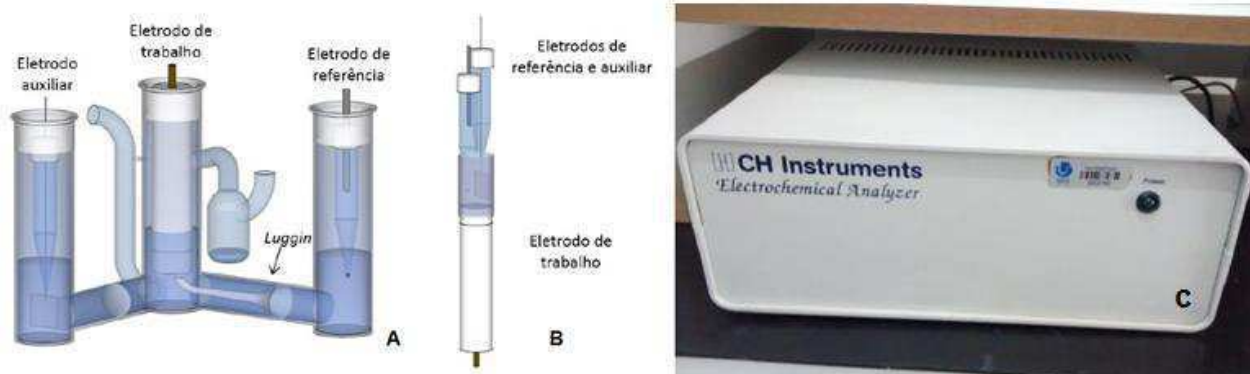
da malária em soro utilizando uma microbalança de quartzo e uma sonda específica marcada. A plataforma mostrou grande precisão, especificidade, sensibilidade, estabilidade e baixo custo. Liu e colaboradores (2014) desenvolveram um genossensor eletroquímico para diagnóstico de tuberculose provocada pela *Mycobacterium tuberculosis*, um dos patógenos mais associados a doença, utilizando uma sequência específica do seu genoma em plataforma contendo nanocompósito, polianilina/óxido de grafeno reduzido/ nanopartículas de ouro. A resposta do sensor foi linear na faixa de 10^{-15} mol L⁻¹ a 10^{-9} mol L⁻¹.

1.6 Técnicas Eletroanalíticas e Instrumentação

Os métodos eletroanalíticos fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis, como corrente elétrica, diferenças de potencial e acúmulo interfacial de cargas, que ocorrem na superfície do eletrodo durante um processo físico e/ou químico para obter informações analíticas. Tais fenômenos podem ocorrer espontaneamente ou quando se aplicam perturbações controladas ao sistema (PACHECO *et al.*, 2013).

As células eletroquímicas (**Figura 14A e 14B**) são os acessórios mais utilizados para realizar análises eletroquímicas. Em métodos voltamétricos, são usualmente adotados sistemas contendo três eletrodos, nomeadamente o eletrodo de trabalho, de referência e eletrodo auxiliar. A transferência eletrônica ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, geralmente um eletrodo sólido imerso em solução contendo um eletrólito e o analito de interesse. O eletrólito tem função de assegurar a condutividade elétrica do meio e garantir força iônica adequada e constante. Em potenciais específicos, deve ocorrer a transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e o analito. A corrente originada deve fluir para o eletrodo auxiliar e são usualmente adotados materiais inertes e com elevada área superficial, como a platina. O eletrodo de referência deve apresentar potencial constante e conhecido e é utilizado para monitorar o potencial do eletrodo de trabalho, sendo adotados eletrodos de calomelano saturados ou eletrodos de prata com cloreto de prata (PACHECO *et al.*, 2004).

Figura 14: Instrumentação em eletroanalítica: Célula eletroquímica de três compartimentos (A) e de compartimento único (B); Potenciostato CH Instruments (C).



Fonte: Obtidos em Kochi (2015).

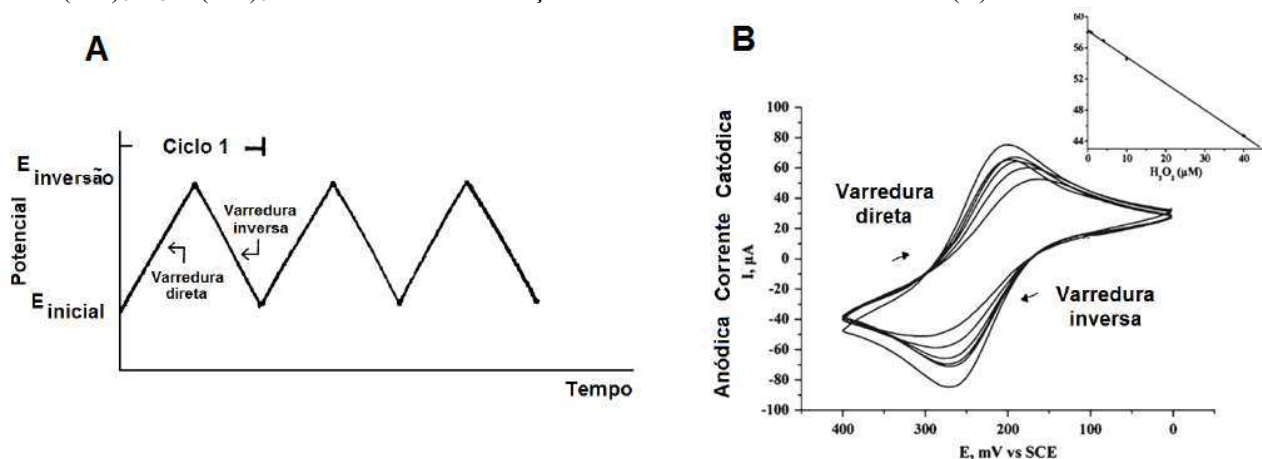
O potenciostato (**Figura 14C**) aplica o potencial e faz as medidas da corrente, além de isolar o eletrodo de referência eletricamente, impedindo a passagem de corrente entre ele e o eletrodo de trabalho, enquanto favorece a passagem de corrente entre este e o eletrodo auxiliar. À medida que o potencial se torna negativo, o eletrodo se torna fonte de elétrons favorecendo a redução das espécies na interface eletrodo-solução, enquanto potenciais positivos favorecem a oxidação de espécies na superfície (PACHECO *et al.*, 2004; LI; MIAO, 2013).

Um analito pode ser caracterizado e/ou quantificado utilizando técnicas voltamétricas somente quando apresenta resposta eletroquímica nos potenciais aplicados. No caso de reações químicas, a transferência de elétrons deve ser favorável termodinamicamente ou cineticamente, originando um fluxo de elétrons. A corrente observada pode ser faradaica ou capacitiva. Na primeira os elétrons são transferidos através da superfície proporcionalmente a oxidação/redução de uma espécie em solução. Enquanto a corrente capacitiva trata-se de uma corrente gerada devido à presença de um acúmulo de elétrons e íons na superfície do eletrodo. Os instrumentos utilizados em eletroanalítica buscam diminuir a contribuição da corrente capacitiva na corrente total medida. Correntes faradaicas não-específicas do analito podem ser minimizadas pelo uso de eletrodos polarizados. A polarização de um eletrodo impede a transferência de carga na interface eletrodo-solução durante um intervalo de potencial, ou seja, seu potencial pode variar amplamente sem afetar a corrente (PACHECO, 2004; PACHECO *et al.*, 2013). A forma pela qual o potencial é aplicado e a corrente é adquirida caracteriza a técnica voltamétrica.

1.6.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica (CV) é uma das técnicas mais usadas em análises eletroquímicas. Pode fornecer informações qualitativas e quantitativas, incluindo informações da cinética de transferência eletrônica das reações, processos termodinâmicos e reações químicas acopladas a processos adsorptivos (LI; MIAO, 2013; PACHECO *et al.*, 2013). Na técnica, registra-se a resposta da corrente de um eletrodo em solução sem agitação quando este é submetido por uma onda triangular de potencial. O potencial varia linearmente até um valor estipulado e em seguida ocorre a inversão no sentido de varredura (**Figura 15A**) (RODRIGUES, 2014). A corrente originada pode ser proporcional à concentração do analito, demonstrando que a técnica pode ser utilizada como um método analítico quantitativo (**Figura 15B**).

Figura 15: Sinal de excitação em voltametria cíclica (A) e voltamogramas cíclicos de uma solução $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$ e diferentes concentrações de H_2O_2 em eletrodos de ouro (B).



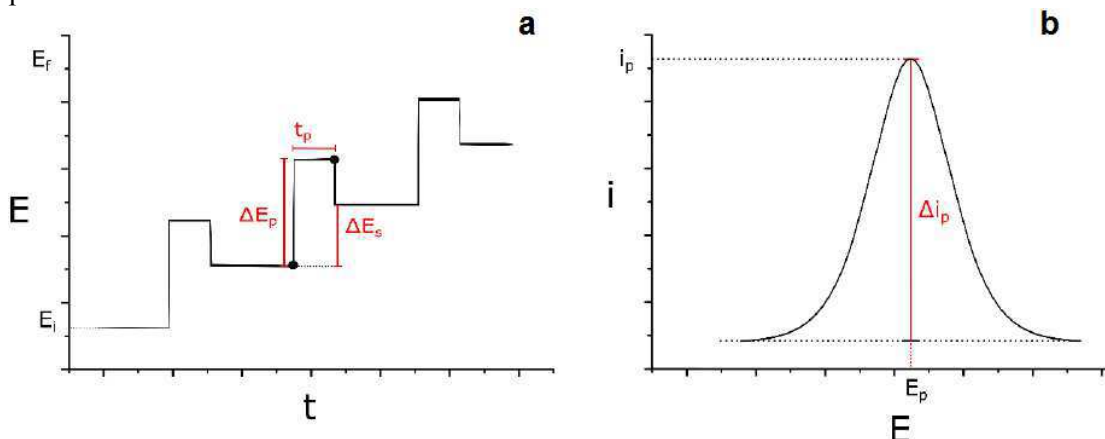
Fonte: Obtidos em Rodrigues (2014) e Li e Miao (2013), respectivamente.

1.6.2 Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica derivada da voltametria de varredura linear e é extremamente útil para a detecção de analitos orgânicos e inorgânicos. Em VPD, são aplicados pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente (**Figura 16**) sobre o eletrodo de trabalho. O nome da técnica é devido ao processo de diferença entre duas correntes; uma é medida antes da aplicação do pulso I (1) e a outra ao final do pulso I (2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada em função do potencial aplicado. O objetivo de se fazer duas medidas de corrente é realizar a correção da corrente capacitiva. O voltamograma obtido apresenta picos de corrente em forma de gaussiana, cuja área e corrente de pico são proporcionais a concentração do analito correspondente. O potencial do pico varia de acordo

com diferentes analitos e também pode ser utilizado para distinguir as espécies em solução (LI; MIAO, 2013; PACHECO *et al.*, 2013).

Figura 16: (a) Representação esquemática da aplicação do potencial em função do tempo e (b) voltamograma obtido em VPD. E: potencial elétrico; i: corrente elétrica; ΔE_p : variação de potencial de pulso; ΔE_s : variação de potencial de amostragem; t_p : período de pulso; Δi_p : variação de corrente de pico.



Fonte: Obtidos em Rodovalho (2016).

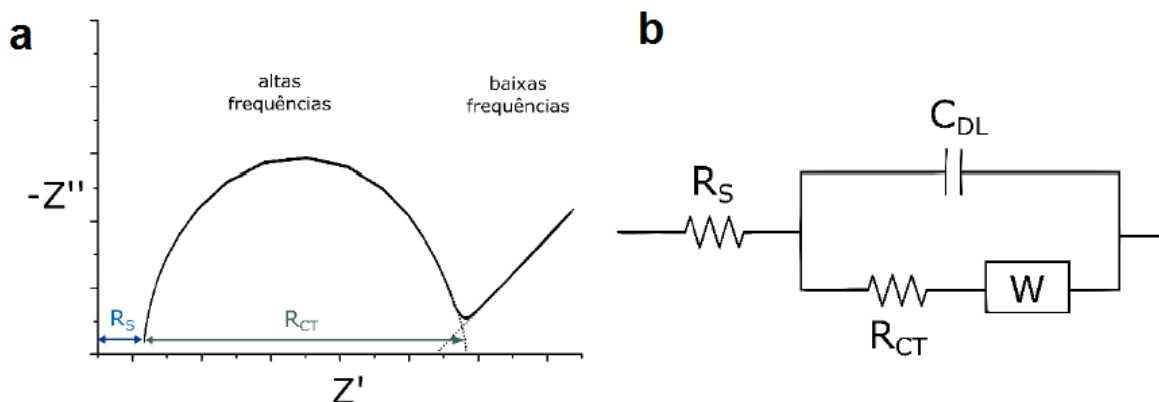
1.6.3 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica que pode fornecer informações importantes relacionadas às características eletroquímicas de um sistema. Entre elas estão a capacitância da dupla camada (C_{dl}), resistência a transferência de carga (R_{ct}), resistência de solução (R_s) e a impedância de difusão (Z_w). A EIE tem sido amplamente utilizada no estudo de mecanismos de eletrodeposição, eletrodissolução, estudos de interface de semi-condutores, filmes poliméricos e biossensores (RODRIGUES, 2014).

A EIE é uma técnica que descreve a resposta de uma interface eletroquímica, como função da frequência de uma perturbação sinusoidal de pequena amplitude. A EIE tem como base a aplicação de um potencial ou corrente alternada, sendo uma delas a variável controlada, medindo-se a intensidade e diferença de fase da outra variável. Entre as formas comuns de representação estão, os diagramas de Nyquist e Bode. No primeiro, os dados relativos a diversas frequências são representados em um plano complexo de impedância. No segundo são representados os valores absolutos de impedância e deslocamento de fase em função da frequência (FERREIRA, 2015; RODOVALHO, 2016).

Os dados obtidos por esta técnica são analisados mediante um modelo teórico de circuito elétrico. A **Figura 17** ilustra a representação dos dados impedimétricos pelo diagrama de Nyquist e um modelo de circuito equivalente.

Figura 17: Ilustração da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica. Diagrama de Nyquist (a) e circuito equivalente (b). Z'' : componente imaginário da impedância Z' : componente real da impedância. R_S : resistência da solução; R_{CT} : resistência à transferência de carga; W : impedância de Warburg; C_{DL} : capacitância da dupla camada.



Fonte: Obtido em Rodovalho, 2016.

O espectro de impedância apresenta um semicírculo na região de altas frequências, que corresponde ao processo limitante de transferência eletrônica e uma reta linear na região de baixas frequências, proveniente da etapa limitante de difusão do processo eletroquímico. O diâmetro do semicírculo exibe a magnitude da resistência a transferência de carga (R_{CT}), sua característica pode ser utilizada para descrever as propriedades de interface do eletrodo, seu valor crescente caracteriza sucessivas modificações na superfície (RODRIGUES, 2014).

Neste trabalho, técnicas eletroquímicas e análise morfológica da superfície foram utilizadas para a detecção de DNA genômico específico para *S. pneumoniae* visando a obtenção de um genossensor que apresente elevada estabilidade em função do tempo, de resposta rápida, precisa e exata.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um genossensor eletroquímico para o diagnóstico de meningite pneumocócica em soro humano enriquecido com DNA da *S. pneumoniae* utilizando oligonucleotídeos específicos e DNA genômico total da *S. pneumoniae* sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com poli (4-aminofenol).

2.2 Objetivos específicos

- Funcionalizar a superfície dos eletrodos de grafite com polímeros derivados do monômero 4-aminofenol e avaliar sua resposta eletroquímica utilizando voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial;
- Imobilizar oligonucleotídeos específicos para o *S. pneumoniae* em eletrodos modificados com poli (4-aminofenol);
- Realizar detecções, direta e indireta, do alvo complementar e do DNA genômico da *S. pneumoniae* sobre a superfície dos eletrodos modificados, monitorando picos de oxidação da guanina, adenina e do intercalador brometo de etídeo;
- Avaliar especificidade e seletividade utilizando uma sequência não complementar de oligonucleotídeos e DNA genômico da *Escherichia coli* em soro humano;
- Validar os parâmetros analíticos do genossensor, quanto à sensibilidade, limites de detecção e quantificação;
- Caracterizar a morfologia do genossensor por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Microscopia de Força Atômica (AFM);
- Avaliar a estabilidade do genossensor.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados apresentam grau analítico. Para o preparo das soluções foi utilizada água deionizada ultrapura em sistema Millipore Milli-Q com resistividade de 18,2 MΩ.cm. As soluções foram preparadas imediatamente antes de cada procedimento e deaeradas com N₂ ultrapuro, por 40 minutos. Os experimentos foram realizados a temperatura ambiente (25 °C) no Laboratório de Filmes Poliméricos e Laboratório de Biossensores na Universidade Federal de Uberlândia.

3.1.1 Preparo de soluções

- **Solução de ácido perclórico (HClO₄, 0,5 mol L⁻¹):** Em um balão volumétrico de 1 L adicionaram-se 42,95 mL de HClO₄ concentrado (Merck, 98%) e completou-se com água deionizada.
- **Solução de ferro/ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 5,0 mmol L⁻¹) em cloreto de potássio (KCl, 0,10 mol L⁻¹):** Foram adicionados 0,1640 g de K₃Fe(CN)₆ (Reagen, 99%), 0,2110 g de K₄Fe(CN)₆.3H₂O (Vetec, 99%) e 0,7490 g de KCl (Vetec, 99%) a um balão volumétrico de 100 mL, em seguida completou-se com água deionizada.
- **Solução monomérica de 4-aminofenol (4-AF, 2,5 mmol L⁻¹):** Foram adicionados 0,014 g do monômero 4-AF (Acros Organics, 97,4%) em um balão volumétrico de 50,0 mL e completou-se com solução HClO₄ 0,5 mol L⁻¹.
- **Solução tampão fosfato (PB, 0,1 mol L⁻¹; pH 7,3):** Em um balão volumétrico de 500mL foram adicionados 4,33 g de Na₂HPO₄ (Vetec, 99%) e 2,33 g NaH₂PO₄ (Vetec, 99%), em seguida completou-se com água deionizada e autoclavada. O pH foi corrigido com o auxílio do pHmetro e uma solução NaOH 0,1 mol L⁻¹.

- **Solução hidróxido de sódio (NaOH, 0,1 mol L⁻¹; pH 13,0):** Utilizando um balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 0,4000 g de NaOH (Vetec, 99%) e completou-se com água deionizada.
- **Tampão citrato de sódio salino (SSC, 0,1 mol L⁻¹):** o tampão SSC foi preparado em um balão volumétrico de 50 mL, foram adicionados 0,4410 g de SSC (Synth, 99%) e 0,08760 g de NaCl (Biotec, 99%) e completou-se com água deionizada e autoclavada. O pH foi corrigido com o auxílio do pHmetro e uma solução NaOH 0,1 mol L⁻¹.
- **Solução brometo de etídio (BE, 0,5 mmol L⁻¹):** Foram adicionados a um balão volumétrico de 10mL, 0,0022 g de C₂₁H₂₀BrN₃ (Vetec, 97%), em seguida completou-se com água deionizada e autoclavada.
- **Solução de albumina de soro bovino (BSA, 0,5 %):** Foram adicionados 0,05 g de BSA a um balão de 10 mL e completou-se com tampão fosfato.
- **Solução de oligonucleotídeo sonda (Strep1, 39 mer, 60 µmol L⁻¹):** A solução utilizada como sonda (Strep1: 5'- GGC TCA CCA AGG CGA CGA TAC ATA GCC GAC CTG AGA GGG -3') foi produzida pelo laboratório de biologia molecular Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brasil) e fornecidos liofilizados. Foi adicionado tampão SSC até completar a concentração desejada.
- **Solução de oligonucleotídeo alvo (Strep2, 39 mer, 180 µmol L⁻¹):** A solução utilizada como alvo complementar (Strep2: 3'- CCG AGT GGT TCC GCT GCT ATG TAT CGG CTG GAC TCT CCC - 5') foi produzida pelo laboratório de biologia molecular Invitrogen Life Technologies (São Paulo, Brasil) e fornecidos liofilizados. Foi adicionado tampão SSC até obter a concentração desejada.
- **Solução DNA genômico de *S. pneumoniae* (200 ng mL⁻¹):** A solução de DNA genômico da *S. pneumoniae* foi fornecida pela fundação Oswaldo Cruz de Belo Horizonte. Adicionou-se tampão SSC até obter a concentração desejada.
- **Solução DNA genômico de *E. coli* (200 ng mL⁻¹):** A solução de DNA genômico de *E. coli* foi fornecida pelo Instituto Rene Rachou de Belo Horizonte. Adicionou-se tampão SSC até obter a concentração desejada.

- **Solução de soro humano:** o soro humano foi fornecido pelo Hospital das Clínicas de Uberlândia. O soro humano adotado nos experimentos foi previamente diluído em tampão fosfato (1:100).
- **Solução controle positivo:** A solução controle positivo foi preparada na proporção 1:1, utilizando 7,5 μL da solução de DNA genômico da *S. pneumoniae* 150 ng mL^{-1} em tampão SSC e 7,5 μL de soro humano, totalizando 15 μL para cada eletrodo.
- **Solução controle negativo:** A solução controle negativo foi preparada na proporção 1:1, utilizando 7,5 μL da solução de DNA genômico da *E. coli* (150 ng mL^{-1}) em tampão SSC e 7,5 μL de soro humano, totalizando 15 μL para cada eletrodo.

3.2 Materiais e equipamentos

O eletrodo de trabalho foi produzido pelo corte de barras de grafite obtidos pela Alfa Aesar (99,9995%) com diâmetros de 6 mm. Um fio de prata/cloreto de prata em solução saturada de KCl (3,0 mol L^{-1}) foi utilizado como eletrodo de referência e uma placa de platina com área geométrica de 2 cm^2 foi adotada como eletrodo auxiliar. Uma célula eletroquímica convencional de três compartimentos foi adotada durante a eletropolimerização, caracterização eletroquímica e espectroscopia de impedância eletroquímica, enquanto que as voltametrias de pulso diferencial (VPD) foram realizadas em célula de um compartimento. Para a aplicação das técnicas eletroquímicas utilizou-se um potenciostato da CH Instruments, modelo 420A, com a exceção dos experimentos de espectroscopia de impedância eletroquímica, em que foi utilizado um potenciostato da Metrohm Autolab modelo PGSTAT302.

A quantificação dos oligonucleotídeos e DNA genômico foi realizada por espectrofotometria no UV-Vis, utilizando o espectrofotômetro Biodrop $\mu\text{Lite}^{\text{R}}$.

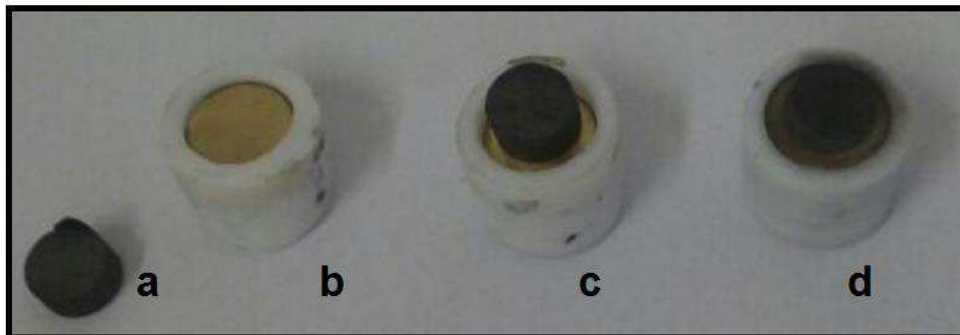
3.3 Procedimento Experimental

3.3.1 Construção e pré-tratamento dos eletrodos de grafite

O disco de grafite (Figura 18a) foi colado sobre uma base metálica revestida com Teflon (Figura 18b), utilizando cola de prata. O eletrodo foi reservado por 24 horas para a secagem da cola de prata (Figura 18c), em seguida os espaços vazios foram preenchidos com

cola epóxi (Araudite). Após 24 horas, os eletrodos foram polidos em lixas d'água de espessura grossa para fina, e em seguida ultra-sonicados. Posteriormente, os eletrodos foram polidos em suspensão aquosa de alumina 0,3 μm (Micropolish A, Buehler), ultra-sonicados, lavados com água deionizada e secos com gás N_2 ultrapuro (**Figura 18d**).

Figura 18: Preparação dos eletrodos de grafite.



Fonte: Autor.

3.3.2 Seleção dos eletrodos de grafite

Para selecionar os eletrodos utilizados na construção da plataforma de detecção, os eletrodos foram caracterizados eletroquimicamente por voltametria cíclica em solução de HClO_4 (0,5 mol L^{-1}) variando o potencial de 0,00 V a +1,00 V. Velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Eletrodos com perfis eletroquímicos apropriados foram encaminhados para etapas posteriores.

Para verificar o perfil eletroquímico dos eletrodos produzidos, utilizou-se a voltametria cíclica em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5,0 mmol L^{-1} e KCl 0,1 mol L^{-1} , um sistema redox bem conhecido.

3.3.3 Eletropolimerização do poli-4-aminofenol

A eletropolimerização do poli-4-aminofenol foi realizada seguindo a metodologia de Vieira e colaboradores (2006). A solução monomérica de 4-AF (2,5 mmol L^{-1}) foi deaerada por 40 minutos, em seguida foi submetida a uma voltametria cíclica em célula de três compartimentos, sendo aplicados 50 ciclos, numa faixa de potencial de +0,0 V a +1,0 V, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} e HClO_4 (0,5 mol L^{-1}) como eletrólito de suporte. Após polimerização procedeu-se com a remoção do monômero residual utilizando voltametria cíclica em solução de HClO_4 (0,5 mol L^{-1}), 12 ciclos de potencial na mesma faixa de potencial da polimerização. Os eletrodos foram em seguida secos com gás N_2 ultrapuro e reservados.

3.3.4 Caracterização eletroquímica da plataforma

Para avaliar o comportamento eletroquímico e a reprodutibilidade da plataforma, os eletrodos foram submetidos a uma voltametria cíclica em solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) variando o potencial de $+0,00\text{V}$ a $+1,00\text{V}$, velocidade de varredura 50 mV s^{-1} . Apenas eletrodos com resposta eletroquímica apropriada foram encaminhados para etapas posteriores.

O desempenho dos eletrodos modificados em comparação aos eletrodos de grafite sem modificação foi avaliado pela voltametria cíclica em solução $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, faixa de potencial $-0,1$ a $+0,5 \text{ V}$, 50 mV s^{-1} .

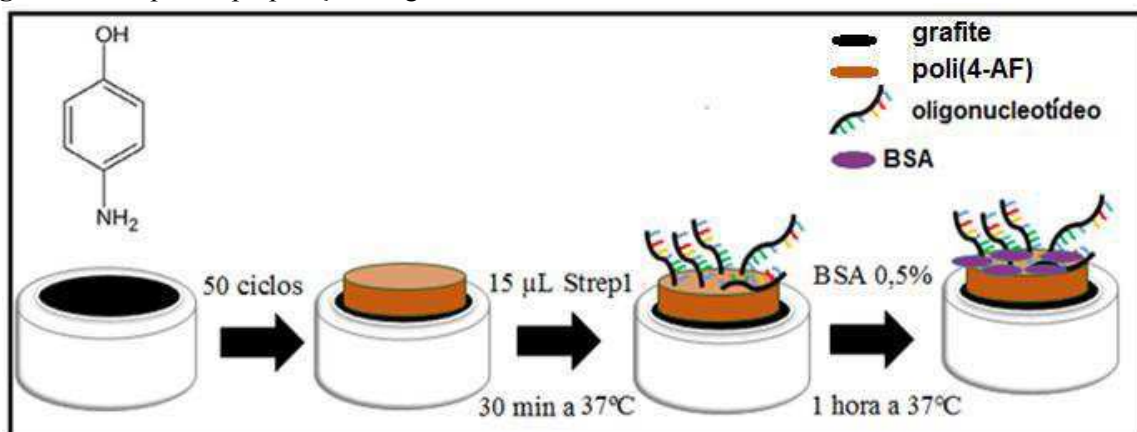
3.3.5 Preparação do genossensor

Os eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) foram colocados em contato com uma solução tampão fosfato e em seguida procedeu-se com a leitura de linha base utilizando VPD em célula de um compartimento, na faixa de $+0,4$ a $+1,4 \text{ V}$ utilizando o tampão fosfato como eletrólito. Posteriormente, os eletrodos modificados foram secos em N_2 ultrapuro e reservados.

A imobilização da sonda Strep1 foi realizada por adsorção física, sendo gotejados $15 \mu\text{L}$ de solução Strep1 ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre os eletrodos, que em seguida foram mantidos em um dessecador a 37°C durante diferentes períodos de tempo: 10, 20, 25, 30 e 35 minutos. Os eletrodos foram posteriormente lavados em tampão fosfato, sob agitação, durante 6 segundos e submetidos a uma VPD nas mesmas condições da linha base. Para avaliar a eficiência da plataforma na imobilização de oligonucleotídeos e o melhor tempo, foram monitorados os picos de oxidação das bases nitrogenadas guanina e adenina. As concentrações de sonda e alvo foram adotadas de acordo com Castro e colaboradores (2014).

Após obtenção do tempo ótimo de imobilização, os eletrodos com a sonda imobilizada foram lavados e procedeu-se com o bloqueio da superfície pela imersão dos eletrodos em uma solução de BSA 0,5% durante 1 hora a 37°C . Em seguida, os eletrodos foram lavados sob agitação, usando tampão fosfato, durante 6 segundos, secos com N_2 ultrapuros e reservados. As etapas de preparação do genossensor podem ser observadas na **Figura 19**.

Figura 19: Etapas de preparação do genossensor.

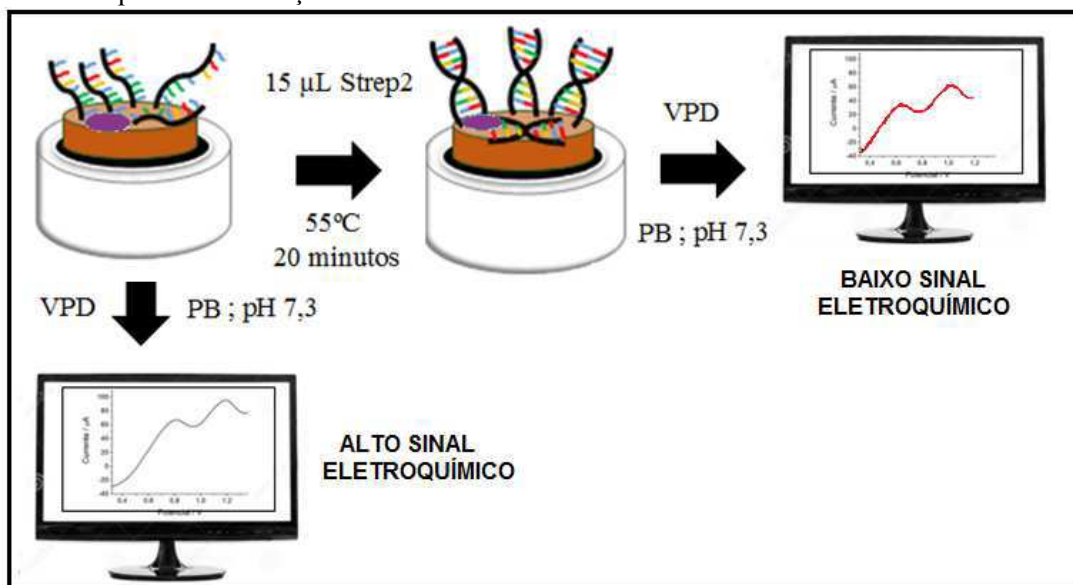


Fonte: Autor.

3.3.6 Detecção eletroquímica do alvo complementar

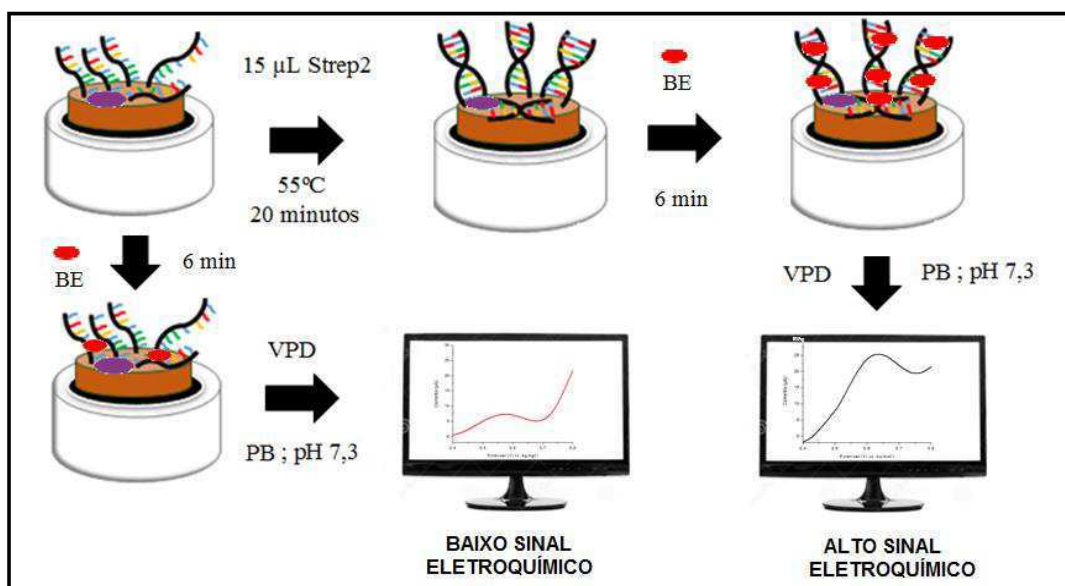
A detecção da hibridização do DNA foi realizada de forma direta, pelo monitoramento dos picos de oxidação das bases nitrogenadas adenina e guanina, antes e após processo de hibridização, e indireta, utilizando o intercalador BE e monitorando seu pico de oxidação. A temperatura de anelamento entre Strep1:Strep2 foi definida usando o programa gene runner® versão 3.01. A não ser que especificado de outra forma, as detecções realizadas no trabalho foram feitas em triplicata.

Para a detecção direta (**Figura 20**) foram gotejados sobre a superfície do genossensor 15 µL de solução contendo o alvo complementar (Strep2, 180 µmol L⁻¹), que em seguida foi colocado em estufa à 55°C durante 20 minutos. Posteriormente, o eletrodo foi lavado em tampão fosfato, sob agitação, por 6 segundos e imediatamente secos com N₂ ultrapuro. A detecção foi conduzida por VPD em tampão fosfato, em faixa de potencial +0,4 V a +1,4 V.

Figura 20: Esquema de detecção direta.

Fonte: Autor.

Na detecção indireta (**Figura 21**), os eletrodos, após incubação com alvo complementar a 55°C durante 20 minutos, foram lavados e secos em N₂ e posteriormente, foram gotejados 15 µL de uma solução de BE (5 µmol L⁻¹) sobre sua superfície. Após 6 minutos, os eletrodos foram lavados sob agitação em tampão fosfato durante 6 segundos e a detecção conduzida por VPD em tampão fosfato, em faixa de potencial +0,3 V a +1,0 V.

Figura 21: Esquema de detecção indireta.

Fonte: Autor.

3.3.7 Influência do tempo de hibridização do DNA

Foi verificado o efeito do tempo de incubação na resposta do sinal eletroquímico. Adotou-se a metodologia descrita no item 3.3.6, no entanto variou-se o tempo de incubação com o alvo complementar em 10, 15, 20 e 25 minutos.

3.3.8 Detecção do DNA genômico

A detecção do DNA genômico foi realizada de forma direta e indireta. A solução contendo a sequência genômica da *S. pneumoniae* (200 ng mL⁻¹) foi previamente desnaturada em uma temperatura de 99 °C durante 5 minutos.

Na detecção direta, foram gotejados 15 µL da solução na superfície do genossensor, que foi encaminhado posteriormente para a estufa à 55 °C durante 20 minutos. Em seguida, os eletrodos foram lavados em tampão fosfato sob agitação constante durante 6 segundos e imediatamente secos com N₂ ultrapuro. A detecção direta foi conduzida por VPD em tampão fosfato numa faixa de potencial de +0,4 V a +1,4 V.

Na detecção indireta, após incubação dos eletrodos com o material genômico da *S. pneumoniae* na estufa à 55 °C durante 20 minutos e posterior lavagem, foram gotejados 15 µL de uma solução de BE (5 µmol L⁻¹) sobre sua superfície. Após 6 minutos, os eletrodos foram lavados sob agitação em tampão fosfato durante 6 segundos, e a detecção conduzida por VPD em tampão fosfato, em faixa de potencial de +0,3 V a +1,0 V.

3.3.9 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os espectros de impedância eletroquímica foram obtidos em experimentos realizados em célula de três compartimentos. Utilizou-se a voltametria cíclica em solução K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 5,0 mmol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹. Os eletrodos foram preparados de acordo com as seções anteriormente descritas, com exceção da etapa de imobilização de BE. A região de frequência adotada foi de 100 kHz a 10 mHz, amplitude de 10 mV e potencial aplicado de +0,23 V.

3.3.10 Validação dos parâmetros analíticos do biossensor

Foi avaliada a resposta do genossensor mediante variação na concentração da solução contendo DNA genômico da *S. pneumoniae* em tampão SSC (0,5 mol L⁻¹) por meio de duas

técnicas eletroquímicas, a voltametria de pulso diferencial (VPD) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE).

A VPD foi realizada em tampão fosfato, adotou-se a metodologia de detecção indireta, monitorando o pico de oxidação do BE. As concentrações da solução de DNA genômico adotadas foram de 200, 150, 100, 50 ng mL⁻¹, respectivamente.

A EIE foi realizada em solução K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆.3H₂O, 5,0 mmol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹ segundo a metodologia descrita em 3.6.9. As concentrações da solução de DNA genômico adotadas foram de 500, 350, 250, 125 e 100 ng mL⁻¹ respectivamente.

Para o cálculo da sensibilidade considerou o coeficiente angular da reta (*m*). Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados segundo as equações 1 e 2.

$$LD = \frac{3DP\alpha}{m} \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = \frac{10DP\alpha}{m} \quad \text{Equação 2}$$

Nas equações, o DP α é o desvio-padrão do branco e *m* é o coeficiente angular da reta correspondente à curva de calibração (JUSTINO *et al.*, 2010).

3.3.11 Estudo de especificidade e seletividade da plataforma

Para avaliar a especificidade e seletividade da plataforma na detecção do alvo foi avaliada a resposta do genossensor mediante as soluções controle negativo e positivo. O controle positivo foi preparado utilizando soro humano enriquecido com o DNA genômico da *S. pneumoniae* (150 ng mL⁻¹). Para o controle negativo utilizou-se soro humano enriquecido com DNA genômico da bactéria *E. coli* (150 ng mL⁻¹). Foram gotejados 15 μ L de cada solução previamente desnaturada a 99 °C sobre a superfície do genossensor, em seguida adotou-se o protocolo descrito na detecção indireta, monitorando o pico de oxidação do BE.

3.3.12 Análise da morfologia e topografia da superfície

Para avaliar a morfologia da superfície do eletrodo de grafite antes e após modificação com o filme polimérico, procedeu-se com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). O ensaio de MEV foi realizado em um microscópio Zeiss, modelo EVO MA10. Os

eletrodos foram metalizados em prata no aparelho de metalização à vácuo Leica, modelo EM SDC050.

Para avaliar a topografia da superfície do genossensor após cada etapa de modificação, procedeu-se com a técnica de microscopia de força atômica (AFM). Para o ensaio de AFM utilizou-se um microscópio da Shimadzu, modelo SPM-9600 e ponteiros de silício com constante de mola na faixa de 0,15 a 0,57 N m⁻¹ e frequência de ressonância entre 24 e 73 kHz. As leituras foram realizadas no modo de contato.

3.3.13 Teste de Estabilidade

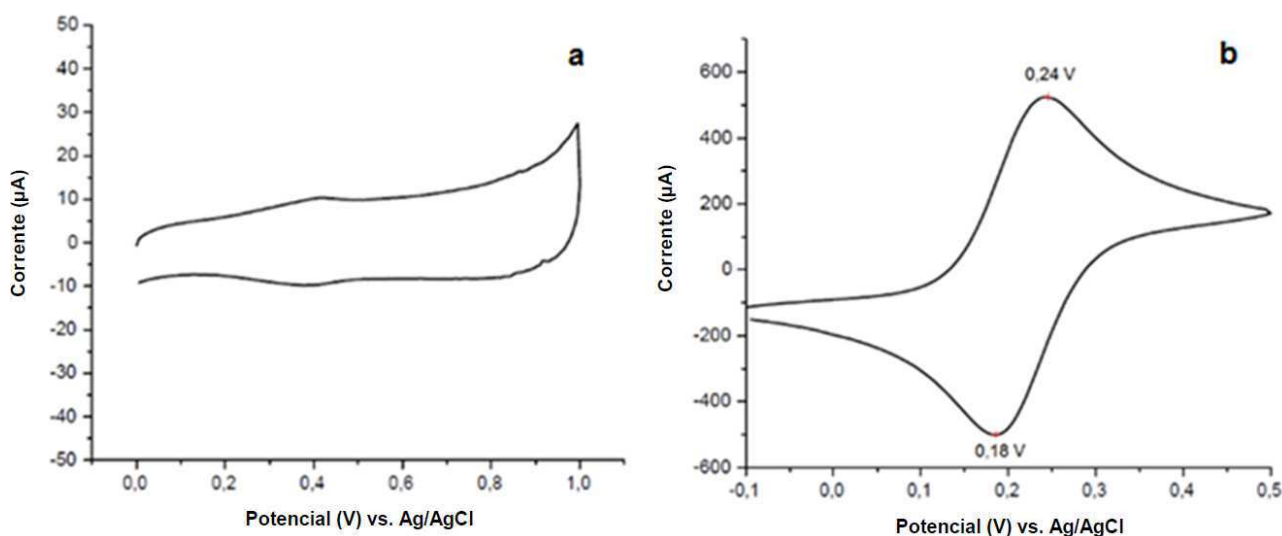
Para avaliar a estabilidade do biossensor, adotou-se a metodologia de Balvedi e colaboradores (2014). Os EG/poli(4-AF) contendo a sonda Strep1 foram estocados à 4 °C, protegidos da luz solar e do oxigênio durante 60 dias. Foi avaliada a resposta eletroquímica do genossensor após interação com o DNA genômico da *S. pneumoniae* (150 ng mL⁻¹). Seguindo a primeira leitura, foram feitas novas leituras após 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 dias. Procedeu-se com a detecção indireta em tampão fosfato descrita em 3.3.8. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção dos eletrodos de grafite

É importante otimizar as condições experimentais para se obter resultados reprodutíveis e confiáveis. Os eletrodos de grafite utilizados neste experimento foram selecionados mediante resposta eletroquímica em uma solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ (**Figura 22a**).

Figura 22: Voltamogramas cíclicos com o eletrodo de grafite: (a) Eletrólito: HClO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$); (b) Eletrólito: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol L^{-1}) em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); $0,05 \text{ V s}^{-1}$.



Fonte: Autor.

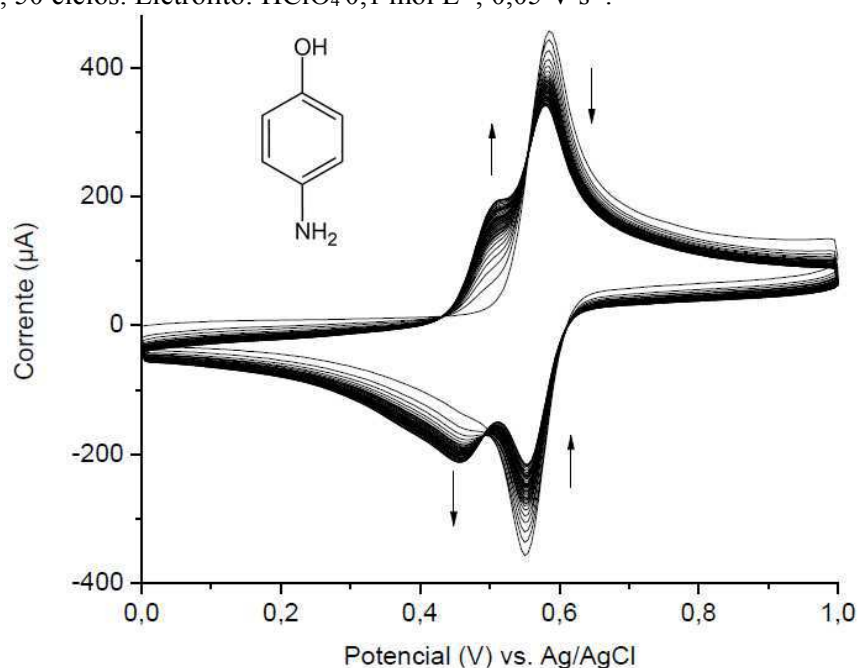
Eletrodos com valores de corrente de pico próximos de $25 \mu\text{A}$ na faixa de $+0,00$ a $+1,00 \text{ V}$ foram selecionados para as etapas posteriores. As medidas realizadas com o par redox Fe(II)/Fe(III) (**Figura 22b**) são utilizadas para verificar a resposta eletroquímica do EG confeccionado. A diferença de potencial entre os picos anódicos e catódicos ($E_{\text{pa}} - E_{\text{pc}}$) inferior a 100 mV e relação das correntes de pico ($I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$) próximo a 1 são requisitos básicos para garantir um bom desempenho do eletrodo em experimentos eletroquímicos (FERREIRA, 2009).

A **Figura 22b** ilustra o comportamento eletroquímico típico do par redox ferrocianeto/ferricianeto de potássio sobre eletrodos de grafite. Observa-se o ΔE de 60 mV e uma relação $I_{\text{pa}}/I_{\text{pc}}$ de cerca de $1,04$, satisfazendo as condições do processo reversível.

4.2 Funcionalização do eletrodo de grafite com poli-(4AF)

Após seleção dos eletrodos adequados, a eletropolimerização do 4-aminofenol foi conduzida a voltametria cíclica na superfície do EG em meio ácido (**Figura 23**).

Figura 23: Voltamograma cíclico obtido pela polimerização eletroquímica do 4-AF ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$), 50 ciclos. Eletrólito: HClO_4 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; $0,05 \text{ V s}^{-1}$.



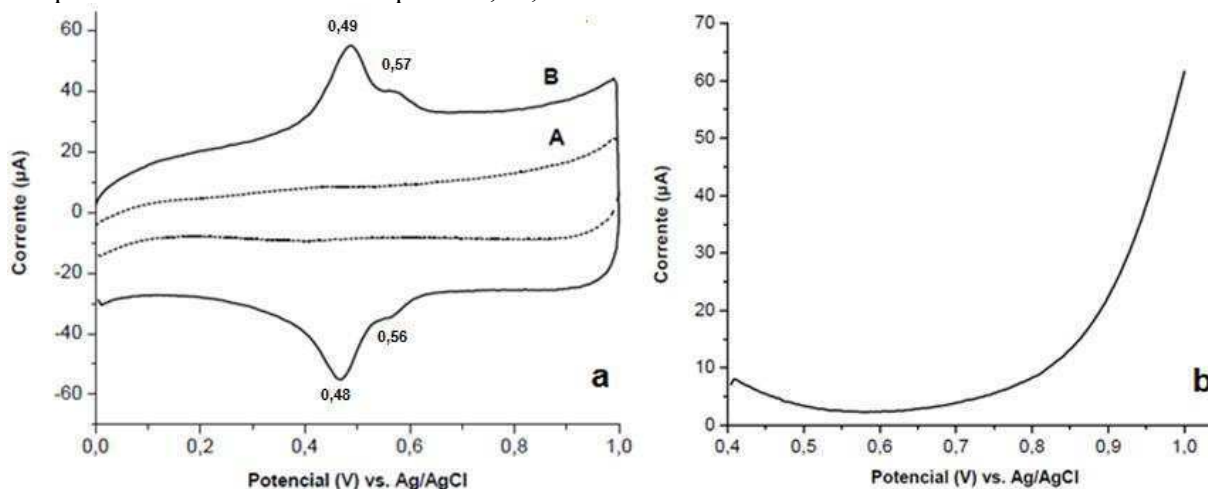
Fonte: Autor.

Durante os sucessivos ciclos de potencial, um crescimento gradual na corrente em valores próximo a $+0,5 \text{ V}$ após o primeiro ciclo foi observado. De acordo com a literatura, trata-se do pico de oxidação referente à formação do polímero (VIEIRA *et al.*, 2006; COELHO *et al.*, 2012).

Os picos de oxidação ($+0,49 \text{ V}$) e redução ($+0,46 \text{ V}$) do polímero apresentam um aumento sucessivo nos valores de corrente, quando comparadas ao eletrodo descoberto, confirmando a cobertura da superfície do eletrodo de grafite por um filme polimérico eletroativo. As setas da direita indicam a diminuição dos picos de corrente anódica ($+0,58 \text{ V}$) e catódica ($+0,56 \text{ V}$), as quais se referem ao consumo do monômero.

A **Figura 24a** mostra a região de atividade eletroquímica do eletrodo modificado com poli(4-AF) em comparação ao eletrodo de grafite sem modificação em solução de HClO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e o perfil eletroquímico dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) (**Figura 24b**).

Figura 24: (a) Voltamogramas cíclicos do eletrodo de grafite antes (A) e após (B) a sua modificação com poli(4-AF). Eletrólito: HClO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); $0,05 \text{ V s}^{-1}$; (b) Voltamograma de pulso diferencial da plataforma EG/poli (4-AF). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1} .



Fonte: Autor.

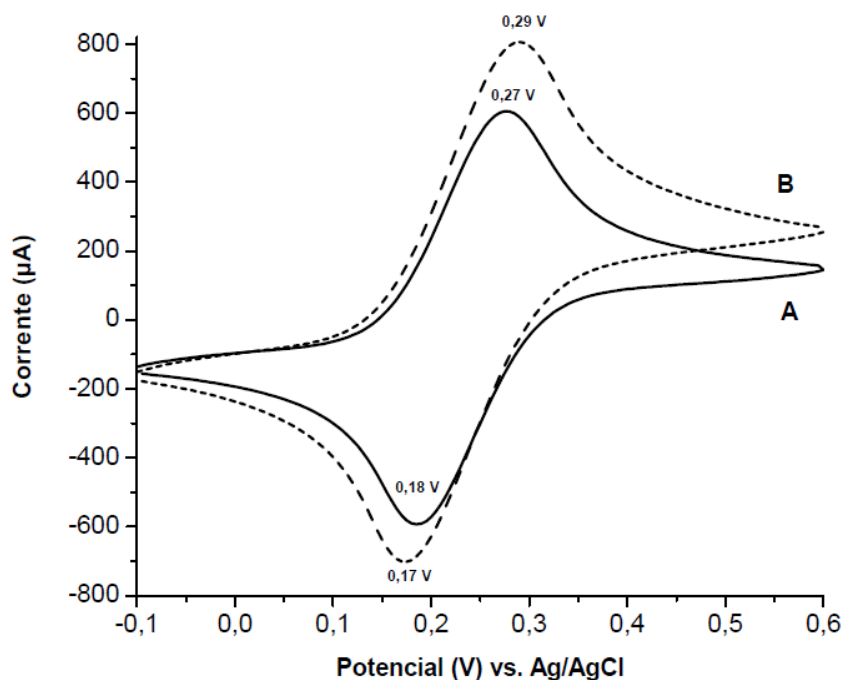
Como observado na **Figura 24a**, a formação do poli(4-AF) resultou em um aumento na resposta eletroquímica em comparação ao eletrodo de grafite, os picos observados no voltamograma em $+0,49 \text{ V}$ e $+0,48 \text{ V}$ são relacionados ao material polimérico depositado sobre a superfície do EG, indicando a modificação do eletrodo de grafite. Os pequenos picos observados em $+0,56 \text{ V}$ e $+0,57 \text{ V}$ são referentes a monômeros residuais, provavelmente devido a existência de cavidades no polímero que permitem a incorporação dos monômeros.

A ausência de resposta eletroquímica na região da oxidação do brometo de etídio (em torno de $+0,6$ a $+0,7 \text{ V}$) observada na **Figura 24b** indica que nesta faixa de potencial, o material depositado no eletrodo não interfere na resposta do sensor, e que provavelmente não há interferentes eletroativos em solução nesta faixa. Em termos de análise clínica, a detecção eletroquímica em tampão fosfato é considerada a mais adequada, uma vez que a solução apresenta pH fisiológico (RODRIGUES, 2014).

4.3 Caracterização eletroquímica e morfológica da plataforma EG/poli(4-AF)

A modificação dos EG com filme eletroativo derivado do 4-aminofenol promove uma alteração na resposta eletroquímica dos eletrodos modificados em diferentes eletrólitos. A caracterização eletroquímica da plataforma mediante uso da sonda aniônica ferrocianeto/ferricianeto de potássio pode ser observada na **Figura 25**.

Figura 25: Voltamogramas cíclicos obtidos do eletrodo de grafite (A) e eletrodos modificados com poli(4-AF) (B) usando $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol L^{-1}) em KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como eletrólito; $0,05 \text{ V s}^{-1}$.



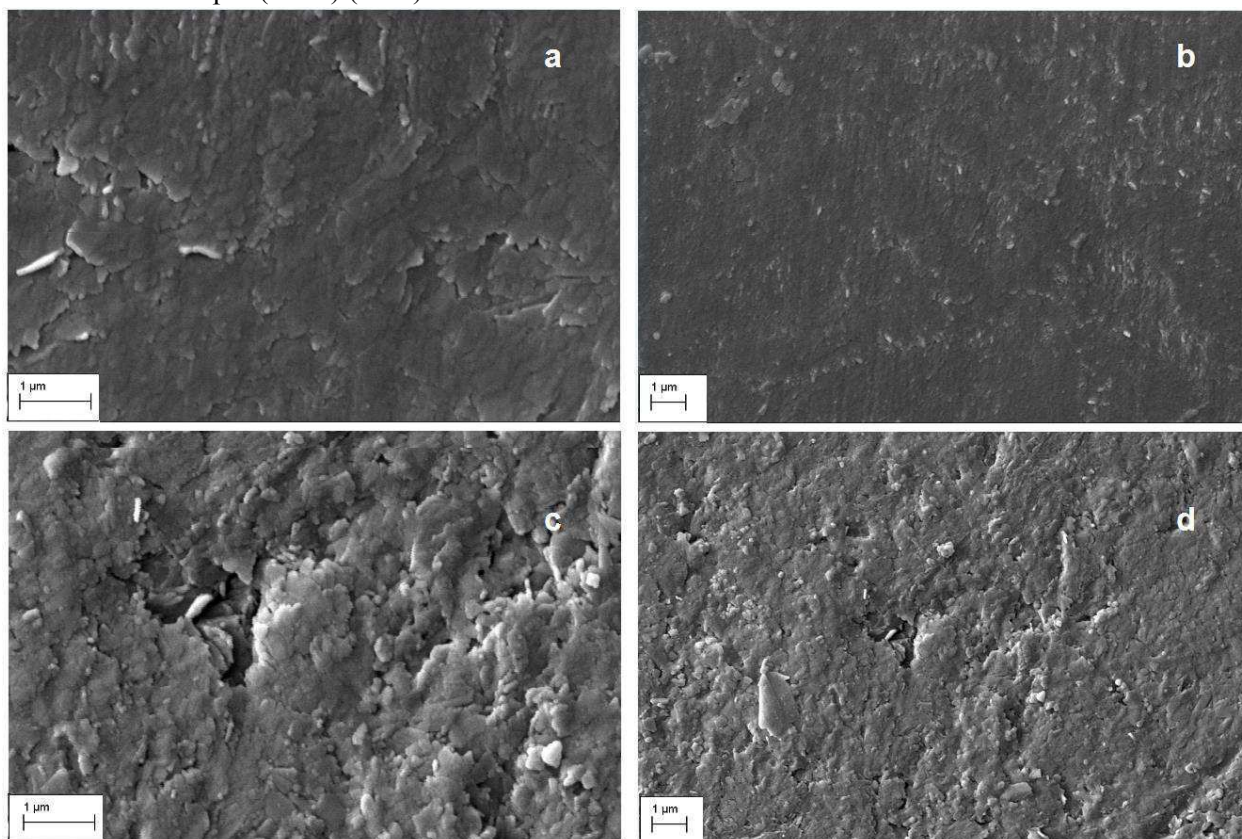
Fonte: Autor.

Pode se observar que o perfil eletroquímico do EG/poli(4-AF) apresentou um valor de corrente anódica 20% superior ao EG sem modificação, indicando que a modificação melhora a resposta eletroquímica frente a sonda aniônica. Esse aumento no valor de corrente pode ser explicado pelo aumento da área eletroquimicamente ativa e pela característica catiônica do filme, que promove uma força de atração entre a superfície do eletrodo e a sonda (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007).

No entanto, pode-se observar um deslocamento do pico de oxidação para potenciais mais anódicos (+0,29 V), indicando que o filme dificulta a transferência eletrônica. A diferença entre os picos de potencial catódico e anódico ($\Delta E = 120 \text{ mV}$) também indica que o filme desfavorece a cinética de transferência eletrônica, porém permite um maior acúmulo da sonda aniônica sobre sua superfície.

A **Figura 26** apresenta a imagem da Microscopia Eletrônica de Varredura do eletrodo de grafite sem modificação e do EG/poli(4-AF). Podem ser observadas diferenças significativas na morfologia do poli(4-AF) em comparação ao eletrodo de grafite sem modificação, indicando a formação do filme polimérico sobre a superfície do grafite. As imagens indicam que o filme polimérico apresenta estrutura irregular, aleatoriamente distribuída na superfície do eletrodo.

Figura 26: Microscopias eletrônicas de varredura de eletrodos de grafite sem modificação (a e b) e modificados com poli(4-AF) (c e d).



Fonte: Autor.

4.4 Estudos de imobilização de oligonucleotídeos

A sequência específica para a *S. pneumoniae* foi desenvolvida em parceria com a Fiocruz Minas, com sede em Belo Horizonte. O Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) é o procedimento mais comum e difundido para análise de sequências de oligonucleotídeos. O programa identifica um ou mais trechos da sequência de interesse (sequência de entrada) que são semelhantes a porções de sequências presentes no banco de dados e fornece um relatório a respeito dessa comparação. A análise da sequência Strep1 pode ser observada no **Quadro 4**.

Quadro 4: Análise da sequência Strep1 pelo software BLAST.

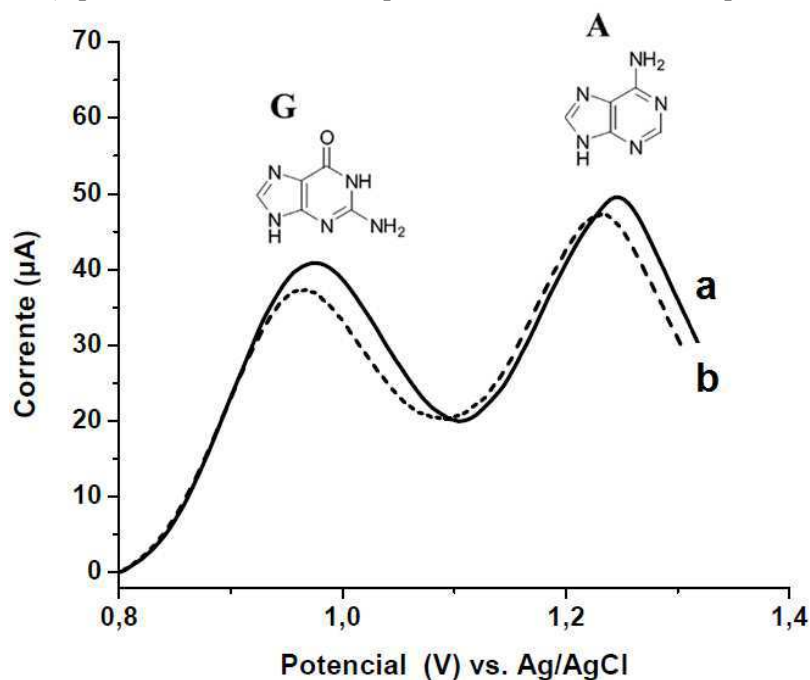
Organismo	BLASTn			
	Cobertura	Ident Max	Valor E	Número de Acesso
<i>S. pneumoniae</i> INV104 genome	100%	100%	1e ⁻¹³	FQ312030.1
<i>S. pneumoniae</i> G54, complete genome	100%	100%	1e ⁻¹³	CP001015.1
<i>S. pneumoniae</i> strain D141 genome	100%	100%	1e ⁻¹³	CP016633.1
<i>S. pneumoniae</i> ST556, complete genome	100%	100%	1e ⁻¹³	CP003357.2
<i>S. pneumoniae</i> D39, complete genome	100%	100%	1e ⁻¹³	CP000410.1

Valor E (*Expected Value*): Permite ter uma idéia de quão significativos são os alinhamentos obtidos. Quanto menor o valor, mais significativa a pontuação.

Pode-se observar no **Quadro 4** que a sequência Strep1 apresenta uma elevada similaridade com o DNA genômico de diferentes serotipos da bactéria *S. pneumoniae*. O baixo Valor E obtido indica uma maior confiabilidade na predição.

A versatilidade das técnicas eletroquímicas propiciou não apenas a análise estrutural dos ácidos nucleicos, como também sua determinação em baixos níveis de concentração. A oxidação eletroquímica de ácidos nucleicos naturais e sintéticos tem sido amplamente estudada em eletrodos de carbono (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004; KUILA *et al.*, 2011; KIMMEL *et al.*, 2012). A imobilização da Strep1 sobre a superfície do eletrodo de grafite modificado com o poli(4-AF) e sobre eletrodos de grafite sem modificação ocorreu com sucesso. As correntes de pico observadas são referentes ao pico de oxidação dos resíduos das bases guanina (+0,96 V) e adenina (+1,23 V) de acordo com a literatura (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004; BRITO-MADURRO *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2014). A **Figura 27** apresenta os voltamogramas de pulso diferencial referentes a imobilização da Strep1 sobre o EG/poli(4-AF) e sobre o eletrodo de grafite sem modificação.

Figura 27: (a) Voltamograma de pulso diferencial referente a imobilização da StrepI (39 mer, $63 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre o EG/poli(4-AF) (a) e sobre o eletrodo de grafite (b); Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} .

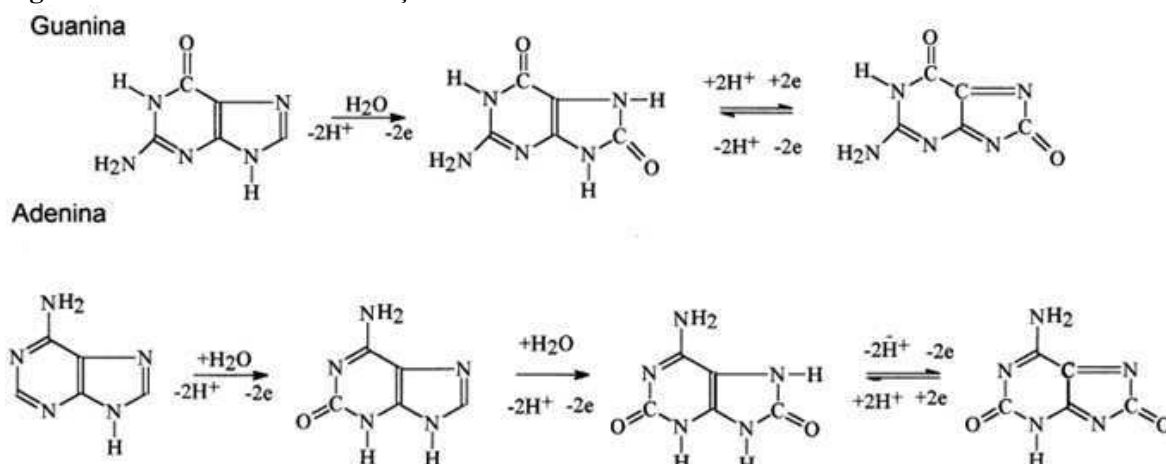


Fonte: Autor.

O aumento na resposta eletroquímica indica que a plataforma poli (4-AF) favoreceu a imobilização da sonda em cerca de 12% em relação ao pico da guanina e 6% em relação ao pico da adenina. Este aumento justifica a utilização do filme polimérico, uma vez que a combinação de incrementos na medida da corrente resulta em um biossensor com maior sensibilidade, resposta linear e menores limites de detecção. Em adição, o filme polimérico pode contribuir com a estabilidade da plataforma (BALVEDI *et al.*, 2014). Estes resultados estão de acordo com os trabalhos sobre imobilização de bases púricas sobre o poli(4-AF) (BRITO-MADURRO *et al.*, 2007). As justificativas para tal comportamento são: a) a matriz catiônica do poli(4-AF) gerou atração eletrostática ao esqueleto aniônico do oligonucleotídeo; b) os grupos funcionais hidroxila e amina derivados do filme polimérico atuaram como sítios ativos, ligando-se covalentemente aos oligonucleotídeos (CASTRO *et al.*, 2014).

A oxidação eletroquímica de guanina e adenina em eletrodos de carbono compreende duas etapas, ocorrendo a perda de quatro elétrons e quatro prótons. Para ambos os casos a primeira etapa é determinante para a velocidade da reação (LA-SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999). A **Figura 28** apresenta os mecanismos de oxidação para guanina e adenina em eletrodos de carbono vítreo.

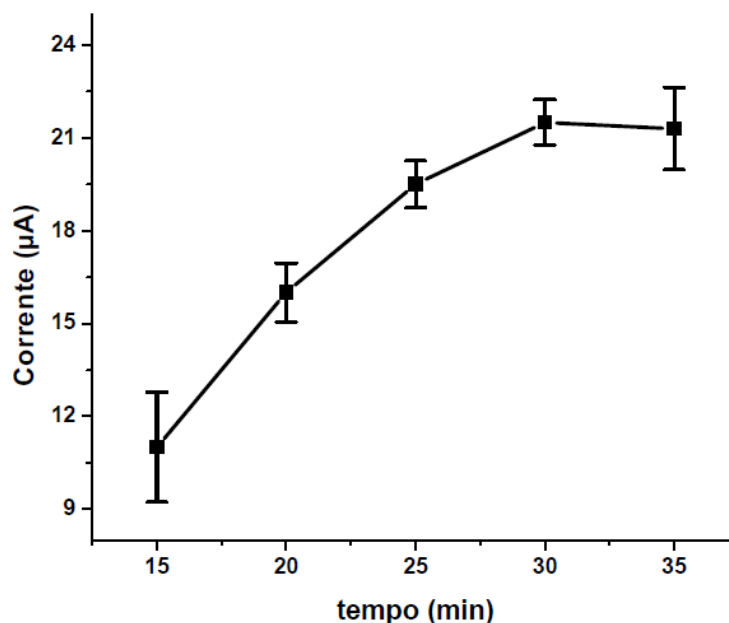
Figura 28: Mecanismos de oxidação da Guanina e Adenina.



Fonte: Obtido em La-Scalea; Serrano; Gutz (1999).

A influência do tempo de imobilização da biomolécula na plataforma EG/poli(4-AF) pode ser vista na **Figura 29**.

Figura 29: Gráfico da influência do tempo de imobilização. Corrente de pico de oxidação da guanina em diferentes tempos de imobilização. Eletrólito: tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mVs⁻¹.



Fonte: Autor.

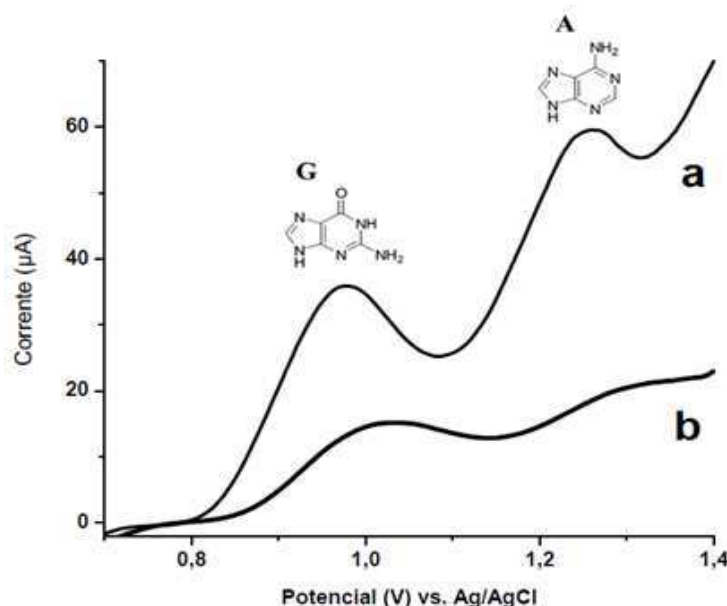
Observa-se que o valor máximo de corrente referente a oxidação da guanina foi atingido após cerca de 30 minutos de imobilização. Após este tempo, o valor de amplitude de sinal de corrente permaneceu constante. Intervalos de tempo pequenos para a imobilização impossibilitam uma adsorção efetiva, podendo ocasionar o lixiviamento da biomolécula durante a etapa de lavagem.

4.5 Detecção eletroquímica

4.5.1 Detecção direta do alvo complementar

A análise direta da imobilização da sonda e detecção do alvo complementar foi realizada usando a voltametria de pulso diferencial. A **Figura 30** apresenta a voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) antes (a) e depois (b) da hibridização com o alvo complementar.

Figura 30: Voltamograma de pulso diferencial com o eletrodo de grafite modificado com poli(4-AF), 50 ciclos, contendo a sonda Strep1 (39 mer, $63 \mu\text{mol L}^{-1}$): antes da hibridização (a) e após incubação com o alvo complementar Strep2 (39 mer, $180 \mu\text{mol L}^{-1}$) a 55°C (b). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mVs^{-1} .



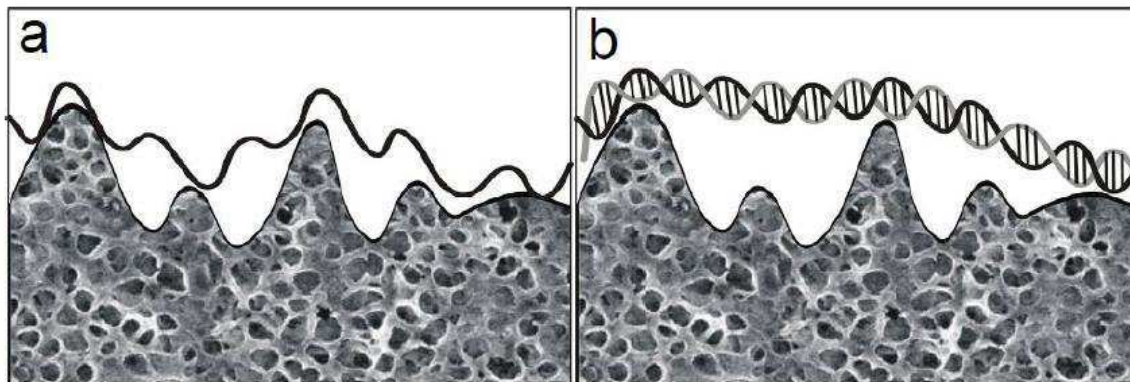
Fonte: Autor.

Para os EG/poli(4-AF) contendo apenas a sonda (Strep1), os voltamogramas apresentaram o pico de oxidação da guanina em $E_p = +0,98 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 20,73 \pm 0,80 \mu\text{A}$ e adenina em $E_p = +1,26 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 13,81 \pm 0,98 \mu\text{A}$. Para os eletrodos contendo o alvo complementar Strep2, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação referente a guanina em $E_p = +1,08 \text{ V}$ e $\Delta i_p = 8,02 \pm 0,30 \mu\text{A}$ e adenina em $E_p = +1,30 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 2,72 \pm 0,70 \mu\text{A}$. Pode-se observar um decréscimo de 33,42% na resposta da corrente referente a guanina e 80,30% referente a adenina.

Os picos de oxidação atribuídos a guanina e adenina diminuem após incubação com alvo complementar durante 15 min a 55°C , sendo observado um pequeno deslocamento no potencial de oxidação da guanina e adenina para valores mais anódicos. Isto ocorre devido a formação de ligações de hidrogênio entre as sequências complementares durante a

hibridização, levando a formação de uma molécula de DNA *duplex*, dificultando a oxidação das bases nitrogenadas. Além disso, a simples fita de DNA apresenta maior flexibilidade conformacional, resultando em uma maior proximidade à superfície e um grau de adsorção superior em comparação a sua forma duplex (**Figura 31**), facilitando a transferência eletrônica na superfície do genossensor (CASTRO *et al.*, 2014).

Figura 31: Representação esquemática da adsorção de DNA na superfície de eletrodos de grafite (a) ssDNA e (b) dsDNA.

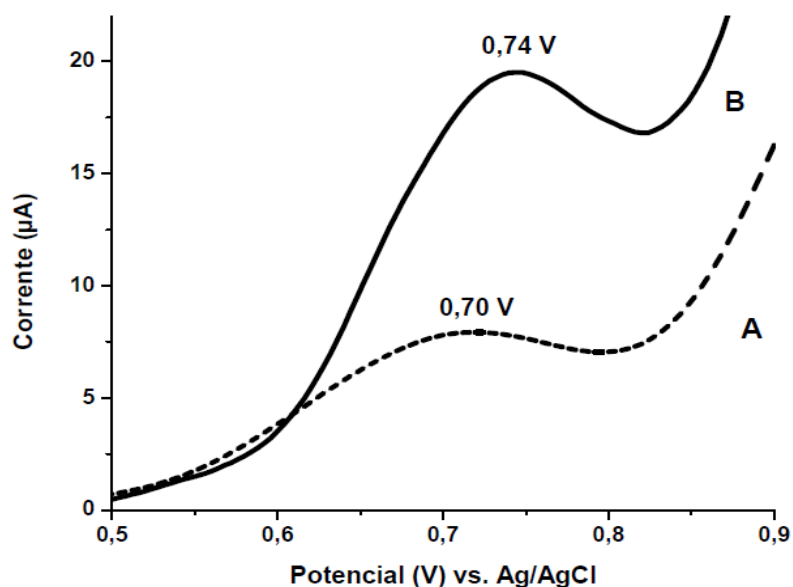


Fonte: Obtido em Silva (2008).

4.5.2 Detecção indireta do alvo complementar

A **Figura 32** mostra os voltamogramas de pulso diferencial da detecção indireta, na presença e ausência do alvo complementar, utilizando o agente intercalador BE.

Figura 32: Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídio ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) preparados em pH 0,5, 50 ciclos, na ausência do alvo (a) e após hibridização com o alvo complementar (Strep2) (b). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} .



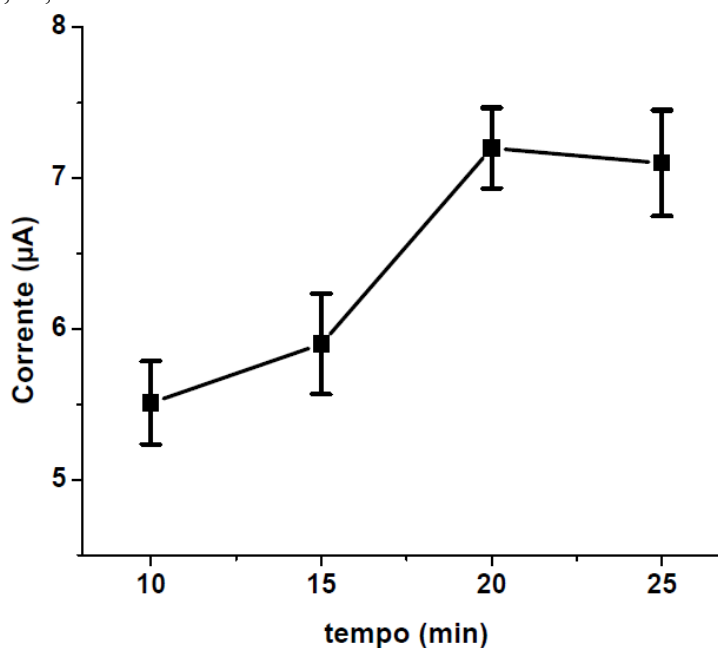
Fonte: Autor.

Na Figura 32 observa-se que os EG/poli(4-AF) contendo apenas a sonda apresentaram o pico de oxidação do BE em $E_p = +0,70$ V com $\Delta i_p = 3,25 \pm 0,80$ μA . Os eletrodos contendo o alvo complementar Strep2 apresentaram pico de oxidação referente ao BE em $E_p = +0,74$ V com $\Delta i_p = 6,98 \pm 0,60$ μA . Os resultados mostram um aumento na amplitude do sinal de corrente na presença do alvo complementar de cerca de 2 vezes em relação a simples fita, indicando a acumulação do brometo de etídio sobre a superfície do eletrodo modificado. Essa acumulação indica a ocorrência do processo de hibridização, pois a formação da dupla hélice do DNA permite a intercalação do mediador brometo de etídio, que apresenta afinidade com a região hidrofóbica dos pares de bases nitrogenadas do DNA (BALVEDI *et al.*, 2014; CASTRO *et al.*, 2014).

4.5.3 Influência do tempo de incubação

O tempo de hibridização entre Strep1/sonda : Strep2/alvo são importantes para avaliar o tempo de resposta do genossensor. Ainda é importante destacar que intervalos de tempo curtos podem impossibilitar uma hibridização eficiente, enquanto tempos extensos podem resultar em adsorções indesejadas. O tempo de hibridização foi avaliado usando a VPD e brometo de etídio como indicador (**Figura 33**).

Figura 33: Resposta de corrente em função do tempo de imobilização monitorando o pico de oxidação do BE. Eletrólito: tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mVs⁻¹.



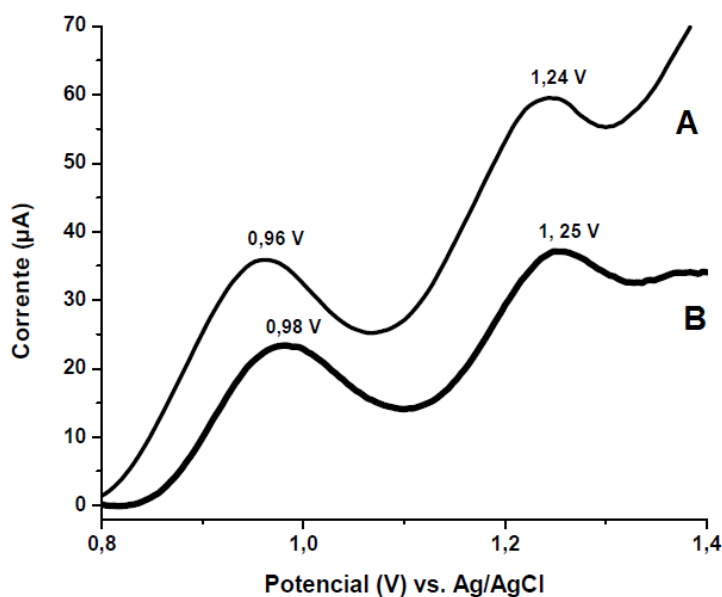
Fonte: Autor.

Observou-se um aumento na corrente do pico do BE em função do aumento do tempo de incubação até cerca de 20 minutos. Após 20 minutos de incubação, a resposta sofreu um pequeno decréscimo. O tempo de 20 minutos foi adotado para a condução dos experimentos de reconhecimento do genossensor pelo seu alvo complementar.

4.5.4 Detecção direta e indireta do DNA genômico

A **Figura 34** apresenta os voltamogramas de pulso diferencial obtidos para os eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) antes (a) e depois (b) da hibridização com o material genômico da *S. pneumoniae* previamente desnaturado a 99 °C.

Figura 34: Voltamograma de pulso diferencial de eletrodo de grafite modificado com poli(4-AF), 50 ciclos, contendo a sonda Strep1 (39 mer, 63 $\mu\text{mol L}^{-1}$): antes da hibridização (A) e após incubação com o DNA genômico da *S. pneumoniae* (200 ng mL^{-1}) a 55 °C (B). Eletrólito: tampão fosfato (0,10 mol L^{-1}), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} .



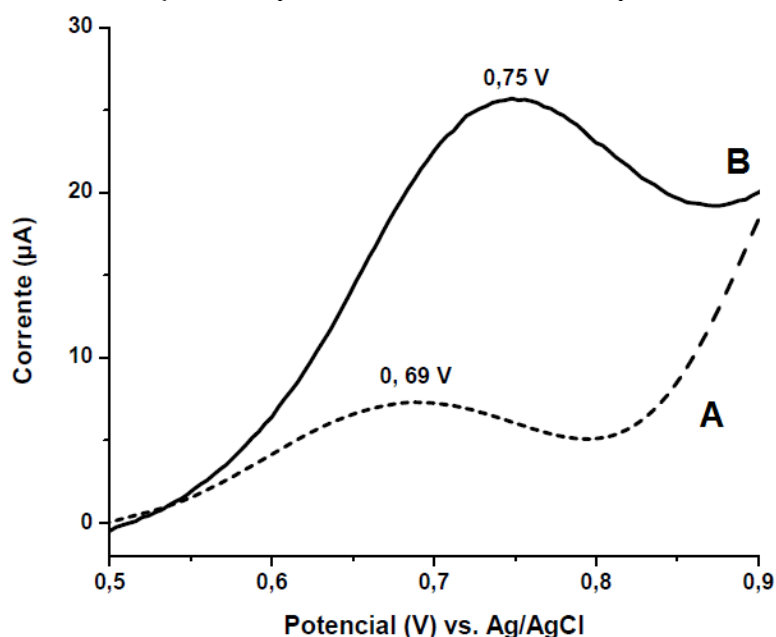
Fonte: Autor.

Na **Figura 34** pode-se observar a diminuição nos picos de oxidação referentes aos resíduos de adenina e guanina e um sutil deslocamento no potencial de oxidação após hibridização, indicando que o fenômeno ocorreu com sucesso. Nos eletrodos contendo apenas a sonda (Strep1), os voltamogramas apresentaram o pico de oxidação da guanina em $E_p = +0,96 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 21,11 \pm 0,88 \mu\text{A}$ e adenina em $E_p = +1,24 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 13,08 \pm 0,80 \mu\text{A}$. Nos eletrodos contendo o DNA genômico da *S. pneumoniae*, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação referente a guanina em $E_p = +0,98 \text{ V}$ e $\Delta i_p = 16,80 \pm 0,70 \mu\text{A}$ e adenina em $E_p = +1,25 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 13,43 \pm 0,70 \mu\text{A}$. Pode ser observada uma diminuição de 20,60% na

resposta da corrente referente a guanina, enquanto que a corrente referente a oxidação dos resíduos de adenina não apresentou variação significativa.

A **Figura 35** apresenta o voltamograma de pulso diferencial da detecção indireta do DNA genômico da *S. pneumoniae* pelo monitoramento do pico de oxidação do agente intercalador brometo de etídio.

Figura 35: Voltamogramas de pulso diferencial do brometo de etídio ($5 \mu\text{mol L}^{-1}$) sobre a superfície de eletrodos de grafite modificados com poli(4-AF) preparados em pH 0,5, 50 ciclos, na ausência do alvo (**A**) e após hibridização com o DNA genômico da *S. pneumoniae* (**B**). Eletrólito: tampão fosfato ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s^{-1} .



Fonte: Autor.

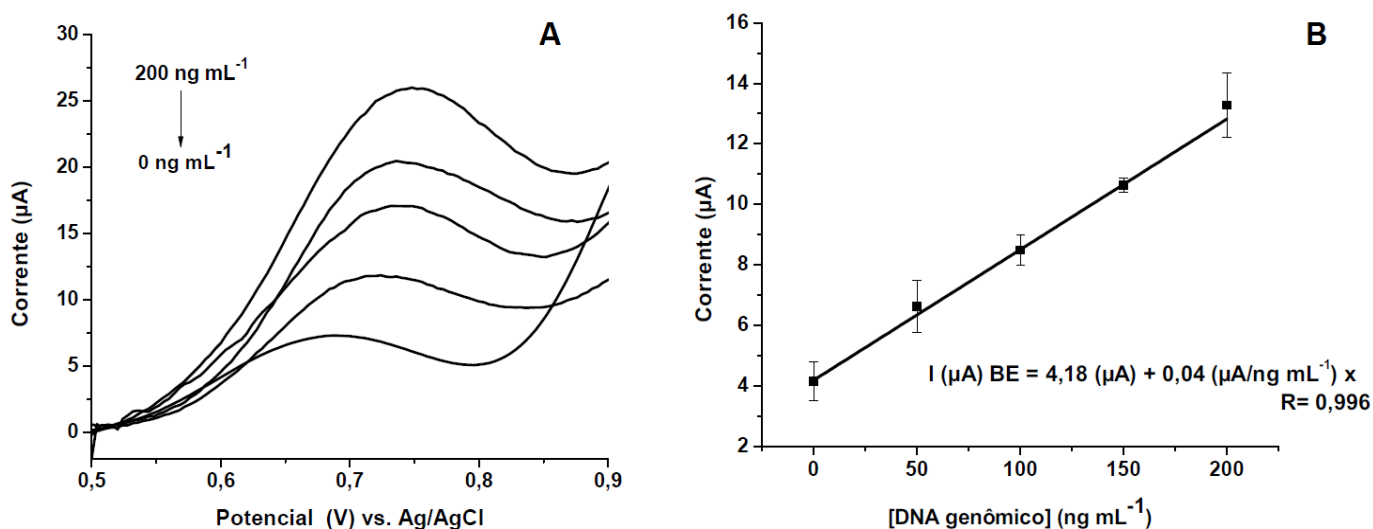
Nos eletrodos contendo apenas a sonda (Strep1), os voltamogramas apresentaram o pico de oxidação do BE em $E_p = +0,69 \text{ V}$ com $\Delta i_p = 4,42 \pm 0,72 \mu\text{A}$. Nos eletrodos contendo o DNA genômico da *S. pneumoniae*, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação em $E_p = +0,75 \text{ V}$ e $\Delta i_p = 14,76 \pm 0,90 \mu\text{A}$. Pode ser observado um aumento na amplitude do sinal de 3,34 vezes, indicando que a acumulação do BE ocorreu com sucesso. O deslocamento do pico de oxidação do BE após hibridização com material genômico ocorre devido à resistência a transferência de carga causado pela formação do duplex (BALVEDI *et al.*, 2014). Os resultados indicam que a plataforma é capaz de reconhecer o material genômico da *S. pneumoniae* de forma eficiente.

4.6 Validação dos parâmetros analíticos do genossensor

A resposta de corrente em função da adição de diferentes concentrações do alvo complementar (DNA genômico) está indicada na **Figura 36**.

A **Figura 36A** mostra os voltamogramas de pulso diferencial do intercalador brometo de etídio, antes e após contato com DNA genômico da *S. pneumoniae* em diferentes concentrações. Os resultados indicam que o alvo complementar promove um aumento na amplitude do sinal da corrente, diretamente proporcional à concentração do material genômico da *S. pneumoniae*. Isto ocorre devido à acumulação do intercalador na dupla fita de DNA. A **Figura 36B** mostra a relação entre o sinal de amplitude de corrente do brometo de etídio em função das diferentes concentrações de material genômico, por meio de uma reta de regressão linear, obtida a partir dos voltamogramas de pulso diferencial.

Figura 36: (A) Voltamogramas de pulso diferencial do BE após hibridização com DNA genômico da *S. pneumoniae* em diferentes concentrações (0, 50, 100, 150, 200 ng mL⁻¹). Eletrólito: tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mVs⁻¹. (B) Resposta linear e parâmetros da regressão linear da curva Δip vs. [DNA]/ng mL⁻¹.



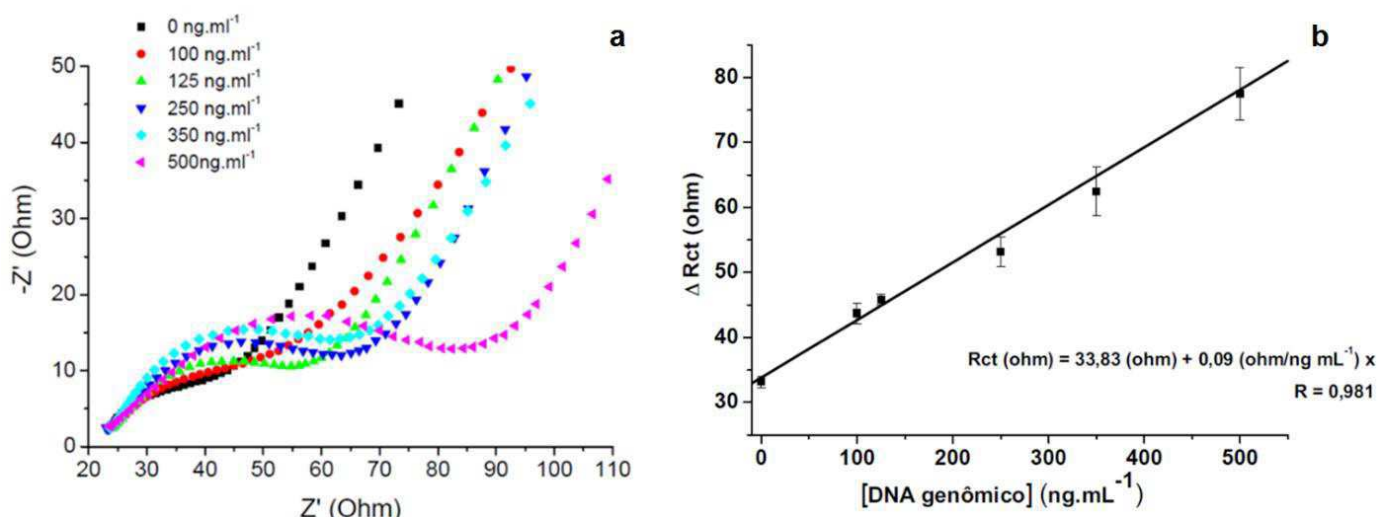
Fonte: Autor.

Pode-se observar que a plataforma apresenta bom coeficiente de correlação ($R = 0,996$). A corrente é proporcional à concentração de DNA genômico da *S. pneumoniae* na faixa linear de 0 ng mL⁻¹ a 200 ng mL⁻¹. A sensibilidade da plataforma foi de 0,04 µA/ng mL⁻¹. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 54 ng mL⁻¹ e 180 ng mL⁻¹, respectivamente.

A **Figura 37A** mostra o espectro de impedância em forma de Diagrama de Nyquist da plataforma, antes e após contato com DNA genômico da *S. pneumoniae* em diferentes

concentrações. O parâmetro escolhido para o monitoramento (Rct) representa a resistência à transferência de carga em relação à área superficial mais externa da plataforma eletroquímica.

Figura 37: (A) Diagramas de Nyquist (Z'' vs. Z') em KCl 0,1 M contendo $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$ 5 mmol L⁻¹ após hibridização com DNA genômico da *S. pneumoniae* em diferentes concentrações (0, 100, 125, 250, 350 e 500 ng mL⁻¹). Epa: + 0,23 V; Amplitude 10 mV; Intervalo de Frequência: 100 kHz a 10 mHz. Resposta linear e parâmetros da regressão linear da curva ΔR_{ct} vs. [DNA]/ng mL⁻¹.



Fonte: Autor.

Os resultados indicados na **Figura 37a** mostram que o reconhecimento do material genômico da *S. pneumoniae* promove um aumento na Rct do par redox $Fe(CN)_6^{4-} / Fe(CN)_6^{3-}$. A **Figura 37b** representa a reta de regressão linear obtida mediante variação da concentração da solução contendo DNA genômico da *S. pneumoniae* sob a plataforma.

A **Figura 37b** indica que a equação que relaciona o sinal de Rct em função da variação na concentração de material genômico da *S. pneumoniae* apresentou bom coeficiente de correlação linear ($R = 0,981$). O Rct é proporcional à concentração de DNA genômico da *Streptococcus pneumoniae* na faixa linear de 100 ng mL⁻¹ a 500 ng mL⁻¹. A sensibilidade da plataforma foi de 0,09 ohm/ng mL⁻¹. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de 27,9 ng mL⁻¹ e 93 ng mL⁻¹, respectivamente.

A técnica de EIE possibilitou a obtenção de uma maior faixa de resposta linear e limites de detecção e quantificação inferiores. Em outros trabalhos encontrados na literatura, utilizando a técnica de PCR em tempo real, foi possível detectar o material genômico da *S. pneumoniae* em amostras de soro humano enriquecido na ordem de 32 pg mL⁻¹ (PARK; LEE; KIM, 2010). Mesmo com a PCR em tempo real se apresentando como uma técnica mais sensível e com limites de detecção inferiores, a portabilidade, acessibilidade e outras vantagens já citadas anteriormente justificam a pesquisa e o desenvolvimento de biossensores

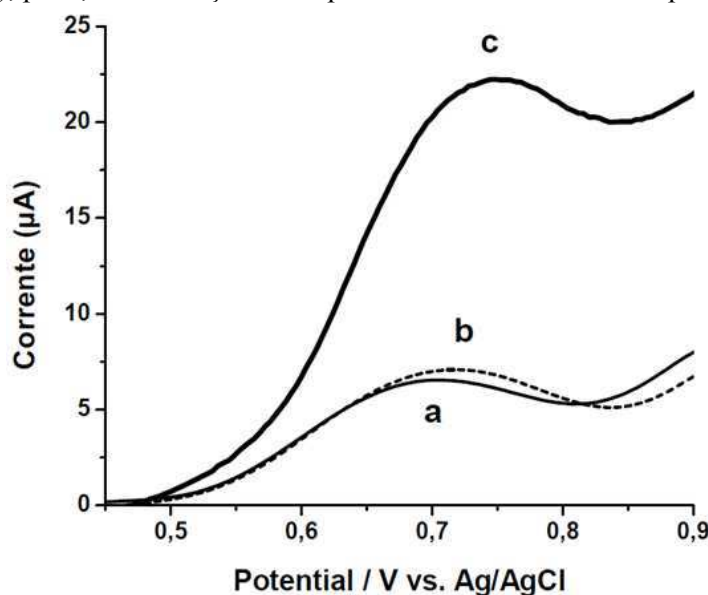
como plataformas de diagnóstico clínico. Além disso, os constantes aprimoramentos e utilização de nanotecnologia podem permitir o desenvolvimento de dispositivos mais robustos, com de limites de detecção ainda menores.

4.7 Estudo de especificidade e seletividade do genossensor

A especificidade e a seletividade são características fundamentais para o desenvolvimento de uma plataforma de diagnóstico, tem como finalidade garantir que o sistema desenvolvido não apresente resultados falsos positivos, sendo funcional e específico, independente dos demais componentes presentes em uma amostra real. O teste em soro é considerado apropriado para avaliar a seletividade dos biossensores com aplicação no diagnóstico clínico, uma vez que o patógeno a ser detectado pode estar presente na corrente sanguínea e no soro, tornando este estudo com interferentes o mais próximo de uma amostra real (KOCHI, 2015).

A **Figura 38** apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do agente intercalador brometo de etídio na presença do soro enriquecido com DNA genômico de *S. pneumoniae*, controle positivo (SpneumoGEN, 150 ng mL⁻¹), e soro enriquecido com DNA genômico de *E. coli*, controle negativo (EcoliGEN, 150 ng mL⁻¹), nas mesmas condições experimentais adotadas anteriormente.

Figura 38: Voltamograma de pulso diferencial do BE (5 μmol L⁻¹) sobre a superfície do EG/poli(4-AF)/Strep1 na ausência do alvo (a), na presença do soro enriquecido com DNA genômico de *E. coli*, controle negativo EcoliGEN (150 ng mL⁻¹) (b) e na presença do soro enriquecido com DNA genômico de *S. pneumoniae*, controle positivo SpneumoGEN (150 ng mL⁻¹) (c). Eletrólito: tampão fosfato (0,10 mol L⁻¹), pH 7,4. Modulação de amplitude: 25 mV. Intervalo de pulso: 0,2 s; 20 mV s⁻¹.



Fonte: Autor.

Nos EG/poli(4-AF) contendo apenas a sonda (Strep1), os voltamogramas apresentaram o pico de oxidação do BE em $E_p = +0,70$ V com $\Delta i_p = 3,30 \pm 0,40$ μ A. Nos eletrodos contendo o DNA genômico da *E. coli*, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação em $E_p = +0,72$ V e $\Delta i_p = 4,01 \pm 0,35$ μ A. Nos eletrodos contendo o DNA genômico da *S. pneumoniae*, os voltamogramas apresentaram pico de oxidação em $E_p = +0,75$ V e $\Delta i_p = 8,66 \pm 0,82$ μ A. Pode-se observar um aumento de 61,9% na resposta de corrente do controle positivo em relação ao EG/poli(4-AF)/Strep1, enquanto que ao adicionar a solução controle negativo a resposta eletroquímica obtida não foi significativa foi estatisticamente àquela observada na ausência do alvo.

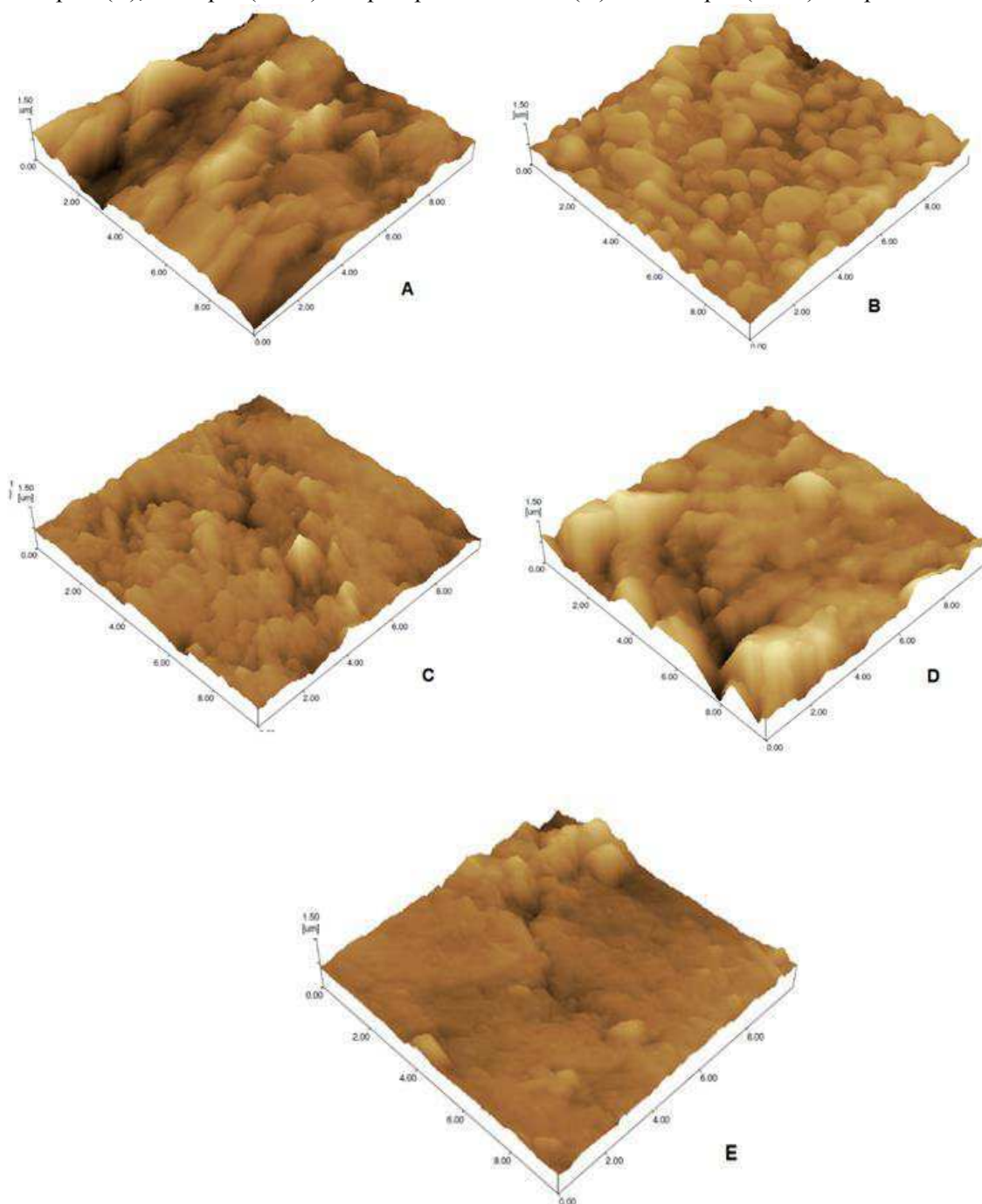
A diferença nos voltamogramas observada na **Figura 38** ocorre porque a sonda utilizada (Strep1) é uma sequência nucleica conservada do DNA genômico da *S. pneumoniae*. O evento de biorreconhecimento ocorre apenas com a porção complementar do controle positivo. O BE acumula-se na região hidrofóbica do *duplex* do DNA e quando sofre o processo de oxidação, ocorre a transferência eletrônica, cuja corrente elétrica e pico de oxidação devem ser proporcionais à quantidade de BE acumulado na superfície do genossensor. Não existindo uma região específica para o material genético da *E. coli*, a adição da amostra contendo o controle negativo não permite a hibridização. Após o processo de lavagem, todo o material que não foi adsorvido ou que não interagiu com a sonda é removido.

Estes resultados confirmam que o genossensor desenvolvido apresenta boa especificidade e que os compostos presentes no soro não interferem na detecção do material genômico da *S. pneumoniae*.

4.8 Análise morfológica

A análise da topografia da superfície do eletrodo de grafite modificado com o polímero na presença ou ausência das biomoléculas (sonda e/ou alvo) foi avaliada por microscopia de força atômica (**Figura 39, Quadro 5**).

Figura 39: Microscopias de força atômica atômica do EG (A), EG/poli(4-AF) (B), EG/poli(4-AF)/Strep1 (C), EG/poli(4-AF)/Strep1/SpneumoGEN (D) e EG/poli(4-AF)/Strep1/EcoliGEN (E).



Fonte: Autor.

Pode ser observado pela **Figura 39A** que o EG apresenta superfície irregular e porosa, apresentando maior número de picos e vales que em relação as superfícies modificadas nas etapas posteriores. A rugosidade do EG é diminuída em cerca de 40% após a eletrodeposição do filme derivado do poli(4-AF), indicando o recobrimento dos vales do grafite pelo polímero. Os resultados estão de acordo com trabalhos realizados por Castro e colaboradores (2014). Pode-se observar a formação de pequenos *clusters* randomicamente distribuídos sob a

superfície do EG após modificação (Figura 39B). A imobilização da Strep1 sob a superfície do EG/poli(4-AF) promoveu o decréscimo na rugosidade em 26%, sendo observada a diferenças na quantidade, comprimento e tamanho dos *clusters* em comparação ao EG/poli(4-AF) sem biomoléculas, indicando que o oligonucleotídeo foi incorporado sobre a superfície do eletrodo modificado com sucesso. Estudos encontrados na literatura indicam que o DNA simples fita pode penetrar filmes condutores como polipirrol (LASSALE *et al.*, 2001) e poli(4-aminofenol) (CASTRO *et al.*, 2014).

Os valores de rugosidade das superfícies estão indicados no **Quadro 5**.

Quadro 5: Valores de rugosidade obtidos por AFM da plataforma após sucessivas modificações.

Amostras	Rq (nm)
EG	185,32 ± 2,44
EG/poli(4-AF)	115 ± 3,55
EG/poli(4-AF)/Strep1	85 ± 2,66
EG/poli(4-AF)/Strep1/SpneumoGEN	163 ± 1,77
EG/poli(4-AF)/Strep1/EcoliGEN	104 ± 2,62

Fonte: Autor.

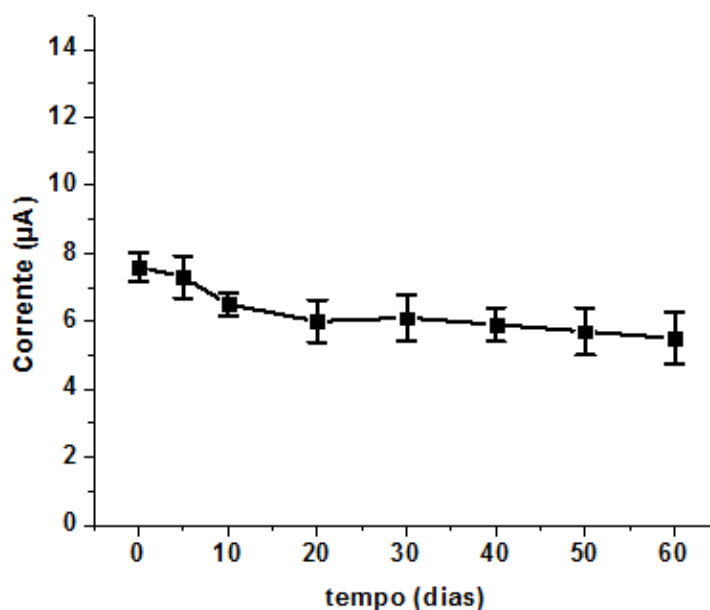
É possível verificar no **Quadro 5** que a superfície do EG/poli(4-AF)/Strep1 tornou-se mais rugosa após adição da solução controle positivo, sendo observado um aumento de 48% em relação ao EG/poli(4-AF)/Strep1. Na **Figura 39D** pode-se observar uma topografia com glóbulos irregularmente distribuídos, apresentando grandes *clusters*. Os resultados estão de acordo com o trabalho de Balvedi e colaboradores (BALVEDI *et al.*, 2014). Estas modificações na superfície do eletrodo podem ser justificadas baseadas no fato das moléculas de DNA dupla fita serem mais alongadas e menos flexíveis que a forma DNA simples fita, formando estruturas mais largas (BALVEDI *et al.*, 2014). A adição da solução controle negativo sob o EG/poli(4-AF)/Strep1 ocasionou um aumento de 18% na rugosidade da plataforma. Pode ser observada na **Figura 39E**, a presença de pequenos *clusters* randomicamente distribuídos sobre a superfície e um aspecto visual muito diferente quando comparado ao eletrodo contendo a solução controle positivo. Estes resultados indicam que a plataforma consegue reconhecer e discriminar eficientemente a presença de material genômico da *S. pneumoniae*.

4.9 Teste de estabilidade

Para viabilizar a utilização e a comercialização de um biossensor é importante que o dispositivo apresente seletividade e estabilidade. A estabilidade de um biossensor não só

beneficia seu transporte e estocagem, mas também ajuda a diminuir os custos das análises, características importantes para aplicações farmacêuticas e industriais (BALVEDI *et al.*, 2014). A **Figura 40** mostra os resultados de resposta relativa do genossensor em função do tempo de estocagem em dias. Os resultados foram obtidos em duplicata.

Figura 40: Estudo de estabilidade do genossensor em soro humano enriquecido.



Fonte: Autor.

Após os primeiros vinte dias de armazenamento o genossensor apresentou uma queda de corrente de aproximadamente 20%. Após o vigésimo dia, a resposta do genossensor se manteve estável. Ao final de sessenta dias a plataforma ainda foi capaz de reconhecer o material genômico da *S. pneumoniae*, sendo observada uma queda na resposta de aproximadamente 27,6%. A utilização de filmes poliméricos para construção de biossensores desempenha um papel fundamental na estabilidade da plataforma (BALVEDI *et al.*, 2014).

5. CONCLUSÃO

Foi possível eletrodepositar poli(4-aminofenol), em meio ácido, sobre superfície de grafite. A presença do polímero foi confirmada por voltametria e análise de topografia de superfície, usando microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica.

O eletrodo de grafite funcionalizado mostrou um aumento de resposta de corrente favorecendo a imobilização da sonda em cerca de 12% para a guanina e 6% para a adenina, usando uma sequência de oligonucleotídeo específica para *S. pneumoniae* (Strep1), quando comparado ao eletrodo de grafite descoberto.

O genossensor foi capaz de detectar a sequência complementar e específica para *S. pneumoniae* (Strep2) e o material genômico da bactéria, direta e indiretamente, em diferentes concentrações, por meio da voltametria de pulso diferencial e espectroscopia de impedância eletroquímica. A primeira apresentou faixa de resposta linear de 0 ng mL⁻¹ a 200 ng mL⁻¹ e limite de detecção e quantificação de 54 ng mL⁻¹ e 180 ng mL⁻¹, respectivamente. Enquanto a segunda obteve uma resposta linear de 0 ng mL⁻¹ a 500 ng mL⁻¹, com limites de detecção e quantificação de 28 ng mL⁻¹ e 93 ng mL⁻¹, respectivamente.

O genossensor produzido mostrou-se específico e seletivo, na presença de soro humano enriquecido com DNA genômico da *Escherichia coli*, os resultados foram confirmados por microscopia de força atômica e voltametria de pulso diferencial.

A plataforma desenvolvida permaneceu estável durante 60 dias, mediante armazenamento em condições específicas, sendo promissora para o desenvolvimento de diagnóstico da meningite pneumocócica.

Posteriormente, devem ser realizados experimentos utilizando pacientes portadores da doença. Também é interesse utilizar nanotecnologia para melhorar a resposta do biossensor e proceder com a miniaturização e automatização das análises.

REFERÊNCIAS

- ABDINIA, B.; REZAEI, M. A.; OSKOUIE, S. A. Etiology and antimicrobial resistance patterns of acute bacterial meningitis in children: a 10-year referral hospital-based study in northwest Iran. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 16, n. 7, p. e17616, 2014.
- AFONSO, A. S. et al. A promising bioelectrode based on gene of *Mycobacterium leprae* immobilized onto poly(4-aminophenol). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 118, n. 5, p. 2921-2928, 2010.
- ALBERTS, B. et al. The Structure and Function of DNA. **New Garland Science**, New York: 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26821/>>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- ALEXANDRE, I. et al. Colorimetric silver detection of DNA microarrays. **Analytical Biochemistry**, v. 295, n. 1, p. 1-8, 2001.
- ALVES-BALVEDI, R. P. et al. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 226-231, 2016.
- ANDERSON, V. et al. Cognitive and Executive Function 12 Years after Childhood Bacterial Meningitis: Effect of Acute Neurologic Complications and Age of Onset. **Journal of Pediatric Psychology**, v. 29, n. 2, p. 67-81, 2004.
- BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomater**, v. 10, n. 6, p. 2341-2353, 2014.
- BALVEDI, R. P. et al. Detection of a specific biomarker for Epstein-Barr virus using a polymer-based genosensor. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 5, p. 9051-9066, 2014.
- BANOO, S. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 9 Suppl, p. S21-S31, 2006.
- BIEBRICHER, A. S. et al. The impact of DNA intercalators on DNA and DNA-processing enzymes elucidated through force-dependent binding kinetics. **Nature Communications**, v. 6, p. 18-39, 2015.
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 144-154, 2004.
- BORA, U.; SETT, A. Nucleic Acid Based Biosensors for Clinical Applications. **Biosensors Journal**, v. 02, n. 01, 2013.
- BRITO-MADURRO, A. G. et al. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v. 42, n. 9, p. 3238-3243, 2007.

BROUWER, M. C.; TUNKEL, A. R.; VAN DE BEEK, D. Epidemiology, diagnosis, and antimicrobial treatment of acute bacterial meningitis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 467-492, 2010.

CAETANO, L. et al. Use of gold nanoparticles on graphite electrodes functionalized with poly (4-aminophenol) in the development of a bioelectrode for hepatitis B. **BMC Proceedings**, v. 8, n. 4, P57, 2014.

CAGNIN, S. et al. Overview of electrochemical DNA biosensors: new approaches to detect the expression of life. **Sensors (Basel)**, v. 9, n. 4, p. 3122-3148, 2009.

CASTRO, H. A. C. et al. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Applied Surface Science**, v. 314, p. 273-279, 2014.

CHADWICK, D. Viral meningitis. **British Medical Bulletin**, n. 75-76, p. 1-14, 2006.

CHANDRASHEKAR, B. N. et al. Electrochemical Investigation of 4-Aminophenol at CTAB Modified Carbon Paste Electrode: A Cyclic Voltammetric Technique. **Analytical & Bioanalytical Electrochemistry**, v. 3, n. 3, p. 227-232, 2011.

COELHO, N. M. M. et al. Surface properties of sensors based on aminophenol-polymerized film. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 16, n. 3, p. 945-951, 2011.

CORDEIRO, A. P. **Pesquisa de biomarcadores e alvos terapêuticos para as meningites por meio da proteômica comparativa do líquido de pacientes**. 2013. 190 f. (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, n. 1-2, p. 41-69, 2003.

DRAGHICI, S. et al. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. **Trends Genet**, v. 22, n. 2, p. 101-109, Feb 2006.

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

EPSTEIN, J. R.; LEE, M.; WALT, D. R. High-Density Fiber-Optic Genosensor Microsphere Array Capable of Zeptomole Detection Limits. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 1836-1840, 2002.

FERNANDES, A. M. et al. Development of highly sensitive electrochemical genosensor based on multiwalled carbon nanotubes-chitosan-bismuth and lead sulfide nanoparticles for the detection of pathogenic *Aeromonas*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 63, p. 399-406, 2015.

FERREIRA, D. S. C. **Desenvolvimento de genossensores para o diagnóstico do papilomavírus humano (HPV)**. 2014. 120 f. (Doutorado) - Laboratório De Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

FERREIRA, L. F. et al. Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide. **Polymer International**, v. 57, n. 4, p. 644-650, 2008.

FRANCO, D. L. **Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utilizando matriz polimérica modificada com biomoléculas, para o diagnóstico de câncer de próstata e hepatite C**. 2010. 118 f. (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia.

FRANCO, D. L. et al. Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines. **Polymer Engineering & Science**, v. 48, n. 10, p. 2043-2050, 2008.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, n. 17, p. 345-359, 2002.

HASBUN R. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/232915overview#showall>> Atualizado em 16 de fev 2016. Acesso em: 20 ago. 2016.

HAYAT K. Difference Between Plasma And Serum. **Medical**. 2012. Disponível em: <<http://medimoon.com/2012/07/difference-between-plasma-and-serum/>> Acesso em: 20 nov. 2016.

HOFFMAN, O.; WEBER, J. R. Pathophysiology and treatment of bacterial meningitis. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, v. 2, n. 6, p. 401-412, 2009.

IOST, R. M. et al. Electrochemical nanobiosensors: advances, diagnosis and monitoring of diseases. **Frontiers in bioscience**, v. 3, p. 663-689, 2011.

ITTARAT, W. et al. Biosensor as a molecular malaria differential diagnosis. **Clinical Chimica Acta**, v. 419, p. 47-51, 2013.

JUSTINO, C. I. L et al., Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 10, p. 1172-1183, 2010.

KERMAN, K.; KOBAYASHI, M.; TAMIYA, E. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. **Measurement Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. R1-R11, 2004.

KIM, K. S. Acute bacterial meningitis in infants and children. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 32-42, 2010.

KIMMEL, D. W. et al. Electrochemical sensors and biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 685-707, 2012.

KISSINGER, P. T. Biosensors-a perspective. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2512-2516, 2005.

KOROTKAYA, E. Biosensors: Design, Classification, and Applications in the Food Industry. **Foods and Raw Materials**, v. 2, n. 2, p. 161-171, 2014.

KOCHI, L. T. **Desenvolvimento de bioeletrodo para detecção do DNA genômico da *Neisseria meningitides***. 2015. 44 f. (Monografia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

KUILA, T. et al. Recent advances in graphene-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 12, p. 4637-4648, 2011.

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

LASSALE, N. et al., Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electrosensors of DNA. Preliminary study of real time monitoring by *in situ* techniques. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 509, p. 48-57, 2001.

LI, G.; MIAO, P. Theoretical Background of Electrochemical Analysis. **SpringerBriefs in Molecular Science**, p. 5-18, 2013.

LINACERO, R.; RUEDA, J.; VÁZQUEZ, A. M. Quantification of DNA. **Springer Netherlands**, ed. 1, p. 18-21, 1998.

LIU, C. et al. An electrochemical DNA biosensor for the detection of Mycobacterium tuberculosis, based on signal amplification of graphene and a gold nanoparticle-polyaniline nanocomposite. **Analyst**, v. 139, n. 21, p. 5460-5, 2014.

LIU, D.; EVANS, T.; ZHANG, F. Applications and advances of metabolite biosensors for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 31, p. 35-43, 2015.

LIU, S. et al. Development of electrochemical DNA biosensor based on gold nanoparticle modified electrode by electroless deposition. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 1, p. 37-42, 2010.

MACE, S. E. Acute bacterial meningitis. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 281-317, 2008.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre, ed. 14, 1160 p., 2015.

MAGO, V. K. et al. Supporting meningitis diagnosis amongst infants and children through the use of fuzzy cognitive mapping. **BMC Medical Informatics and Decision Making**, n. 2, p. 98, 2012.

Market and Market TM. **Biosensors Market worth \$22.68 Billion by 2020**. Disponível em: <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/biosensors.asp>>. Acesso em: 06 nov. 2016.

MATEO-MARTI, E. et al., A DNA biosensor based on Peptide Nucleic Acids on Gold Surfaces. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, p. 1926-1932, 2007.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153-159, 2016.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v. 20, p. 1113-1126, 2004.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; ŠTURDÍK, E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 109–120, 2012.

MORAES C. Perfil epidemiológico da Meningite no Brasil e no mundo. Ministério da Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Porto Alegre. 2015. Disponível em <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1437759444_Perfil%20Epidemiol%C3%B3gico%20da%20Meningite%20Brasil%20&%20Mundo.pdf> Acesso em: 15 jun. 2016.

NAFISI, S. et al. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, v. 827, n. 1-3, p. 35-43, 2007.

NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1825-1832, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. New York: W.H. Freeman, ed. 6, 2013.

NETTER, F. H. **Atlas de Anatomia Humana**. Artmed. Porto Alegre. 2ed. 2000.

NIELSEN, K. et al. Comparison of six DNA quantification methods. **International Congress Series**, v. 1288, p. 759-761, 2006.

NIU, S.-Y. et al. Hybridization biosensor using di(1,10-phenanthroline) (imidazo[f]1,10-phenanthroline)cobalt(II) as electrochemical indicator for detection of human immunodeficiency virus DNA. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 597, n. 2, p. 111-118, 2006.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 321-329, 2004.

PACHECO, W. F. **Desenvolvimento e comparação de métodos voltamétricos para a determinação de ciclofenil e primaquina em medicamentos e em urina**. 2004. 111 f. (Mestrado) - Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PACHECO, W. F. et al. Voltammetry: A Brief Review About Concepts. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013.

PARK, H. K., LEE, H. J. AND KIM, W. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, p. 48-53, 2010.

PASTRE, D. et al. Study of the DNA/ethidium bromide interactions on mica surface by atomic force microscope: influence of the surface friction. **Biopolymers**, v. 77, n. 1, p. 53-62, 2005.

PATEL, M. K. et al. Electrochemical DNA sensor for *Neisseria meningitidis* detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, n. 12, p. 2586-2591, 2010.

PUMERA, M. et al. Electrochemical nanobiosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 123, n. 2, p. 1195-1205, 2007.

RASOOLY, A. Biosensor technologies. **Methods**, v. 37, n. 1, p. 1-3, 2005.

RAYMOND, J. Epidemiology of nosocomial infections in pediatrics. *Pathologie Biologie*, v. 48, p. 879-884, 2000.

RODOVALHO, V. R. et al. Biosensors Applied to Diagnosis of Infectious Diseases – An Update. **Austin J Biosensors and Bioelectronics**, v. 1, n. 3, 1015 p., 2015.

RODOVALHO, V. R. **Biossensor baseado em peptídeo mimético ligante de imunoglobulina G: uma plataforma para diagnóstico de artrite idiopática juvenil**. 2016. 59 f. (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RODRIGUES, L. P. **Desenvolvimento e caracterização de filmes derivados de poli(acidos hidroxifenilacéticos) para aplicação abiodeteccção de *Neisseria meningitidis* e *Anaplasma marginale***. 2014. 155 f. (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RODRIGUES, L. P. et al. Electropolymerization of hydroxyphenylacetic acid isomers and the development of a bioelectrode for the diagnosis of bacterial meningitis. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 45, n. 12, p. 1277-1287, 2015.

RODRIGUES, L. P. et al. Bioelectrode Applied to Diagnosis of Cardiac Disease. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 9, p. 6528-6538, 2014.

ROOS, K. L. Bacterial infections of the central nervous system. **Handbook of clinical neurology**. Elsevier Health Sciences, 278 p., 2010

ROSA, G. J. D. M.; ROCHA, L. B. D.; FURLAN, L. R. Estudos de expressão gênica utilizando-se microarrays: delineamento, análise, e aplicações na pesquisa zootécnica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. suplemento especial, p. 185-209, 2007.

RUMAYOR, V. G. et al. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. **Madri: Elecé Industria Gráfica**, 113 p., 2005.

SANTOS, T. V. et al. Bioelectrode for detection of human salivary amylase. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 3, p. 530-535, 2012.

SASSOLAS, A; LECA-BOUVIER B. D.; BLUM L. J. DNA Biosensors and Microarrays. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 109–139, 2008.

SETHI, R. S. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 9 p. 243-264, 1994.

SILVA, F. B. et al. Electrochemical Investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1173-1188, 2008.

SILVA, T. A. R. et al. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 539-545, 2009.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433-440, 2006.

SOUZA P. V. V. **Desenvolvimento de biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados**. (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 124 p. 2014.

STORHOFF, J. J. et al. One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes. **Journal of the American Chemical Society**, n. 120, p. 1959-1964, 1998.

SURINDER, K.; BINEETA, K.; MEGHA, M. Latex particle agglutination test as an adjunct to the diagnosis of bacterial meningitis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 395-397, 2007.

THIGPEN, M. C. et al. Bacterial Meningitis in the United States, 1998–2007. **The New England Journal of Medicine**, n. 364, p. 2016-2025, 2011.

TKACH, V. V.; NECHYPORUK, V. V. O.; YAGODYNETS, P. I. A investigação matemática do desempenho de biossensores eletroquímicos enzimáticos baseados nos polímeros condutores. **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, v. 41, n. 2, p. 203-216, 2012.

TURNER, A. P. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-3196, 2013.

VIEIRA, S. N. et al. Electrochemical Modification of Graphite Electrodes with Poly(4-aminophenol). **Macromolecular Symposia**, v. 245-246, n. 1, p. 236-242, 2006.

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-1892, 2006.

WANG, L.-R.; QU, N.; GUO, L.-H. Electrochemical Displacement Method for the Investigation of the Binding Interaction of Polycyclic Organic Compounds with DNA. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 3910–3914, 2008.

WHO. Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by neisseria meningitidis, streptococcus pneumoniae, and haemophilus influenzae: **WHO Manual**. World Health Organization, Centers for disease control and prevention. Geneva, ed. 2. 323 p. 2011.

ZHANG, X.; GUO, Q.; CUI, D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. **Sensors (Basel)**, v. 9, n. 2, p. 1033-1053, 2009.