



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Genossensor para a detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris* baseado  
em nanocompósito polimérico**

**Aluno:** José Manuel Rodrigues Flauzino

**Orientador:** Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro

**UBERLÂNDIA – MG**

**2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Genossensor para a detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris* baseado  
em nanocompósito polimérico**

**Aluno:** José Manuel Rodrigueiro Flauzino

**Orientador:** Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA – MG**

**2017**

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

---

F587g  
2017      Flauzino, José Manuel Rodrigues, 1992  
            Genossensor para a detecção de Alicyclobacillus acidoterrestris  
            baseado em nanocompósito polimérico / José Manuel Rodrigues  
            Flauzino. - 2017.  
            66 p. : il.

Orientador: João Marcos Madurro.  
Coorientadora: Ana Graci Brito Madurro.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2017.1>  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Alicyclobacillus - Teses. 3. Suco de laranja -  
Teses. 4. Bactérias - Teses. I. Madurro, João Marcos. II. Madurro, Ana  
Graci Brito. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Genossensor para a detecção de *Alicyclobacillus acidoterrestris* baseado  
em nanocompósito polimérico**

**Aluno:** José Manuel Rodrigues Flauzino

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:**

Prof. Dr. João Marcos Madurro (Orientador)


**Examinadores:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Massako Takeuchi

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Oliveira Fonseca Goulart

**Data da defesa: 31/07/2017**

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas do PPGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas



---

Prof. Dr. João Marcos Madurro



*“Alguns acreditam que apenas um grande poder pode manter o mal sob controle; mas não é o que eu descobri. Descobri que são as pequenas coisas, as tarefas diárias de pessoas comuns, que mantêm o mal afastado; simples ações de bondade e amor.”*

J. R. R. Tolkien

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha família, pelo amor incondicional e pelo apoio em toda minha jornada durante meu período de graduação e pós-graduação.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. João Marcos Madurro e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Graci Brito Madurro, por acreditarem no meu potencial e me acolherem no Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia e no Laboratório de Biossensores.

Aos meus colegas de laboratório: Ana Cristina, Anna Clara, Bárbara Costa, Bárbara Cunha, Carlos, Drielly, Héden, Heliane, Isabela, João Afonso, Laíse, Mirian, Mônica, Rafael, Rafaela, Sandro e Vinícius, pelos ótimos momentos de aprendizado e divertimento. Agradeço especialmente à Jussara, por todo o conhecimento que me passou e pela sua contribuição na revisão deste trabalho. Agradeço também à Hery Mitsutake do Laboratório de Quimiometria do Triângulo, pela ajuda nas análises dos espectros de infravermelho e ao Guilherme Fernandes pela ajuda nas análises das imagens de microscopia de força atômica.

À Danielle, Livia e Priscila, que além de grandes colegas de laboratório se revelaram grandes amigas e confidentes, nos contentamentos e nas aflições. Ao Wenderson, que apesar do pouco tempo presente em minha vida, mostrou-se ser um grande amigo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr. Regina Takeuchi e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília Goulart, membros da banca, que cordialmente aceitaram meu convite e contribuíram muito para este trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Genética e Bioquímica e ao Instituto de Química, pelo espaço físico disponibilizado e por todo apoio técnico-administrativo. Em especial agradeço à secretária do PPGBB, Janaína, pela paciência, disponibilidade, e profissionalismo.

Aos órgãos de fomento: CAPES, CNPQ, FAPEMIG e Rede Mineira de Química, pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de mestrado

E agradeço a você, leitor, por demonstrar interesse na leitura deste trabalho!

## Lista de abreviaturas e siglas

- 3-HBA** – *3-Hydroxybenzoic Acid* (Ácido 3-hidroxibenzóico)
- AFM** – *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de força atômica)
- BSA** – *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)
- DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- dsDNA** - *double-stranded DNA* (DNA dupla fita)
- EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético
- EG** – Eletrodo de grafite
- EG/OG** - Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno
- EG/OGRE** – Eletrodo de grafite modificado com óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente
- EG/OGRE/poli(3-HBA)** - Eletrodo de grafite modificado com o nanocompósito óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente/poli(ácido 3-hidroxibenzóico)
- EG/poli(3-HBA)** - Eletrodo de grafite modificado com poli(ácido 3-hidroxibenzóico)
- EQM** – Eletrodo quimicamente modificado
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- OG** – Óxido de grafeno
- OGra** – Óxido de grafite
- OGR** – Óxido de grafeno reduzido
- OGRE** – Óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente
- OGRE/poli(3-HBA)** – Nanocompósito óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente/poli(ácido 3-hidroxibenzóico)
- Poli(3-HBA)** – Poli(ácido 3-hidroxibenzóico)
- Poli(GA)** – Oligonucleotídeo poli(Guanina/Adenina)
- Rq** – Coeficiente de rugosidade média
- ssDNA** - *single-stranded DNA* (DNA simples fita)
- TRIS** - Tris(hidroximetil)aminometano
- VC** – Voltametria cíclica
- VPD** – Voltametria de pulso diferencial

## Resumo

Neste trabalho foi desenvolvido um nanocompósito polimérico de óxido de grafeno reduzido e poli(ácido 3-hidroxibenzóico) para a modificação de eletrodos de grafite, visando o desenvolvimento de um genossensor para a detecção do DNA genômico de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Esta é uma bactéria associada à deterioração de sucos ácidos, como o suco de laranja, do qual o Brasil é o maior produtor mundial. Neste contexto, os biossensores aparecem como dispositivos de detecção rápidos e fáceis de manusear, com grande potencial para serem utilizados em toda a cadeia produtiva do suco. Para a construção do genossensor, óxido de grafeno foi produzido pelo método de Hummers modificado, gotejado sobre a superfície do eletrodo de grafite e reduzido eletroquimicamente. O ácido 3-hidroxibenzóico foi eletropolimerizado sobre esta superfície contendo o nanomaterial. Análises por espectroscopia no infravermelho e voltametria cíclica comprovaram a redução do óxido de grafeno. Além disso, as análises eletroquímicas evidenciaram que o nanocompósito produzido apresenta propriedades eletrônicas superiores às do filme polimérico. Sobre este nanocompósito foi imobilizado um oligonucleotídeo sonda ALIC1, específico para *A. acidoterrestris*, o qual foi utilizado para detecção de um oligonucleotídeo alvo complementar ALIC2 pela técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD), tanto direta quanto indiretamente, esta última utilizando-se o intercalante da dupla fita de DNA Hoechst 33258. Um lisado celular obtido a partir de uma cultura de *A. acidoterrestris* também foi detectado de maneira indireta pela técnica de VPD, e uma curva de calibração foi construída. O genossensor proposto apresentou um limite de detecção de  $174 \text{ ng mL}^{-1}$  e limite de quantificação de  $581 \text{ ng mL}^{-1}$ , sendo capaz de detectar o DNA genômico em uma amostra real de suco de laranja e de discernir entre amostras de *A. acidoterrestris* e *Escherichia coli*. Deste modo, este bioeletrodo apresenta-se como a primeira plataforma de detecção eletroquímica do DNA genômico de *A. acidoterrestris* na literatura científica.

**Palavras chaves:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, genossensor, óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente, ácido 3-hidroxibenzóico, suco de laranja

## Abstract

In this work a polymeric nanocomposite of reduced graphene oxide and poly (3-hydroxybenzoic acid) was developed for the modification of graphite electrodes, aiming the development of a genossensor for the detection of the *Alicyclobacillus acidoterrestris* genomic DNA. This bacterium is associated with the spoilage of acidic juices, such as orange juice, of which Brazil is the largest producer in the world. In this context, biosensors appear as fast and easy to handle detection devices, with great potential for use throughout the juice production chain. For the construction of the genosensor, graphene oxide was produced by the modified Hummers method, dripped onto the surface of the graphite electrode and reduced electrochemically. The 3-hydroxybenzoic acid was electropolymerized on this surface containing the nanomaterial. Analyzes by infrared spectroscopy and cyclic voltammetry proved the reduction of graphene oxide. In addition, the electrochemical analysis showed that the nanocomposite produced has higher electronic properties than the polymeric film. On this nanocomposite, an oligonucleotide probe ALIC1, specific for *A. acidoterrestris*, was immobilized, and was used to detect a complementary target oligonucleotide ALIC2, both directly and indirectly, the latter using the Hoechst 33258 double strand DNA intercalator, by the differential pulse voltammetry (DPV) technique. A cell lysate obtained from an *A. acidoterrestris* culture was also indirectly detected by DPV, and a calibration curve was constructed. The proposed genosensor presented a limit of detection of 174 ng mL<sup>-1</sup> and limit of quantification of 581 ng mL<sup>-1</sup>, being able to detect the genomic DNA in a real sample of orange juice and to distinguish between the samples of *A. acidoterrestris* and *Escherichia coli*. Thus, this bioelectrode presents as the first platform of electrochemical detection of the genomic DNA of *A. acidoterrestris* in the scientific literature.

**Keywords:** *Alicyclobacillus acidoterrestris*, genosensor, electrochemically reduced graphene oxide, 3-hydroxybenzoic acid, orange juice

## Sumário

1. Introdução .....	1
1.1. Suco de laranja e o mercado citrícola brasileiro.....	1
1.2. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> .....	2
1.3. Biossensores.....	3
1.3.1. Genossensores.....	4
1.3.2. Hoechst 33258.....	6
1.4. Eletrodos modificados.....	7
1.4.1. Polímeros.....	8
1.4.2. Nanocompósitos .....	11
1.4.3. Grafeno e seus derivados.....	11
1.5. Técnicas Eletroquímicas .....	14
1.5.1. Voltametria Cíclica.....	14
1.5.2. Voltametria de Pulso Diferencial.....	16
2. Objetivos .....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
3. Material e métodos.....	19
3.1. Reagentes e soluções.....	19
3.2. Amostras biológicas.....	20
3.3. Cultivo e obtenção do lisado celular de <i>A. acidoterrestris</i> .....	20
3.4. Amostras de suco de laranja.....	21
3.5. Medidas Eletroquímicas.....	21
3.6. Síntese do Óxido de Grafite.....	22
3.6. Obtenção do OGRE .....	24
3.7. Caracterização do OG e do OGRE .....	25
3.7.1. Análise elementar .....	25
3.7.2. Espectroscopia no Infravermelho.....	25
3.7.3. Caracterização com sonda aniônica .....	26
3.7.4. Análises morfológicas .....	26
3.8. Eletropolimerização do 3-HBA .....	26
3.9. Caracterização dos eletrodos modificados com filme polimérico .....	27
3.9.1. Caracterização eletroquímica .....	27

3.9.2. Análises morfológicas .....	27
3.9.3. Estabilidade do nanocompósito .....	28
3.9.4. Detecção de oligonucleotídeos imobilizados .....	28
3.10. Construção do bioeletrodo e detecção do alvo complementar .....	29
3.11. Detecção do DNA genômico de <i>A. acidoterrestris</i> presente no lisado celular .....	30
3.12. Construção da curva de calibração .....	31
3.13. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo .....	32
3.14. Estatística e tratamento dos dados .....	32
4. Resultados e discussão.....	33
4.1. Obtenção do óxido de grafeno reduzido .....	33
4.2. Caracterização do OG e do OGRE .....	34
4.2.1. Análise Elementar.....	34
4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	34
4.2.3. Caracterização com sonda aniônica .....	36
4.2.4. Análises Morfológicas .....	37
4.3. Eletropolimerização do 3-HBA .....	38
4.4. Caracterização dos eletrodos modificados com filme polimérico .....	42
4.4.1. Caracterização Eletroquímica .....	42
4.4.2. Análises morfológicas .....	43
4.4.3. Estabilidade do nanocompósito .....	44
4.4.4. Detecção de oligonucleotídeos imobilizados .....	45
4.5. Detecção do alvo complementar.....	46
4.5.1. Detecção Direta .....	46
4.5.2. Detecção Indireta.....	48
4.6. Detecção do DNA genômico presente no lisado celular .....	50
4.6.1. Detecção em solução tampão .....	50
4.6.2. Detecção em suco de laranja .....	52
4.7. Curva de calibração .....	54
4.8. Estabilidade do bioeletrodo .....	55
5. Conclusões.....	57
Referências .....	58

# 1. Introdução

## 1.1. Suco de laranja e o mercado citrícola brasileiro

O suco de laranja é o suco de fruta mais consumido no mundo. O Brasil possui grande destaque na produção mundial de suco de laranja, sendo o maior produtor e exportador mundial: de cada cinco copos do suco consumidos no mundo, três foram produzidos em solo brasileiro (CITRUSBR, 2016). O suco de laranja brasileiro está presente em mais de 90 países, sendo os principais mercados importadores a União Europeia, os Estados Unidos e o leste asiático (Tabela 1). As exportações brasileiras somaram mais de 1,7 bilhões de dólares na safra 2015/2016, evidenciando a importância dessa *commodity* para a economia nacional.

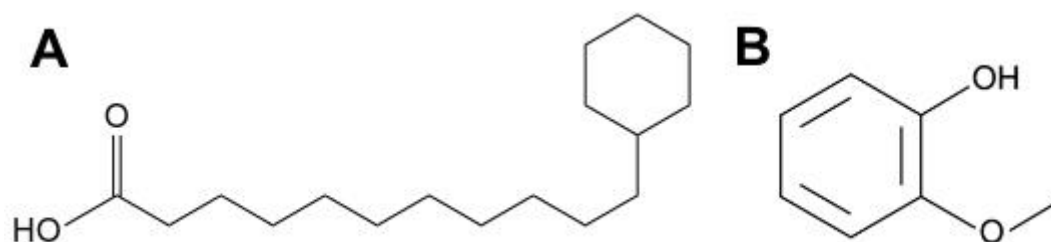
**Tabela 1** – Toneladas e valores das exportações de suco de laranja brasileiro na safra 2015/2016 (CITRUSBR, 2016).

<b>Região</b>	<b>Toneladas de suco brasileiro exportados</b>	<b>Valor das exportações (em milhares de US\$)</b>
União Europeia	748.167	1.216.989
Estados Unidos	197.582	305.604
Japão	45.078	70.675
China	27.452	48.024
Outros países	62.659	103.581
<b>Total</b>	<b>1.080.938</b>	<b>1.744.873</b>

Tem-se então a importância da garantia da qualidade do suco brasileiro, visando um produto apto ao mercado interno e externo. Da colheita da fruta até o consumidor final, o suco de laranja passa por diversas etapas de preparo e análise. A etapa de pasteurização do suco é essencial para a garantia de um produto de boa qualidade, porém existem microrganismos resistentes às condições normalmente aplicadas (SILVA; TAN; FARID, 2012), assim deve-se dar atenção especial para tais espécies, sendo necessária a detecção das mesmas para que outros processos sejam aplicados no suco, como a ultrafiltração.

## 1.2. *Alicyclobacillus acidoterrestris*

Em 1982, um surto de deterioração de sucos de maçã eclodiu na Alemanha, durante o transporte e armazenamento do mesmo em um verão atipicamente quente. Anos mais tarde, foi verificado que o surto foi devido à presença de uma bactéria nova até então, denominada *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CERNY; HENNLICH; PORALLA, 1984). Seu nome deriva-se do fato da mesma ser um bacilo cuja parede celular apresenta ácidos graxos  $\omega$ -alicíclicos (Figura 1A), o que confere uma extraordinária resistência ao calor (95 °C por até 5 min), e por ser encontrada naturalmente em solos ácidos (pH 2,0-6,0) (HUANG *et al.*, 2015). Essas condições fazem de *A. acidoterrestris* uma bactéria resistente a processos de pasteurização típicos, além de sobreviver em sucos ácidos por um grande período de tempo, uma vez que é capaz de formar esporos muito resistentes (HUNNIGER; FISCHER; *et al.*, 2015).



**Figura 1 – (A)** Estrutura do ácido 11-ciclohexilundecanoico, presente na parede celular de *A. acidoterrestris*. **(B)** Estrutura do guaiacol (autoria própria).

Apesar de não ser patogênica ao ser humano, *A. acidoterrestris* produz metabólitos secundários, com destaque para o guaiacol (Figura 1B), que alteram as propriedades organolépticas dos sucos nos quais está presente (WITTHUHN *et al.*, 2013). É reportado um típico odor fenólico e antisséptico em produtos contaminados com essa bactéria, o que inviabiliza sua comercialização e consumo. Geralmente a contaminação não está associada com a formação de gases, o que dificulta ainda mais a detecção da mesma (CAI *et al.*, 2015).

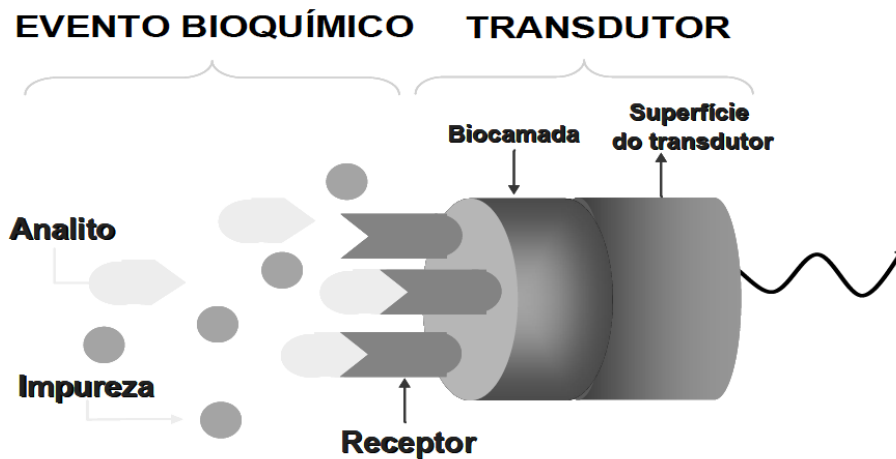
O método padrão para a detecção de *A. acidoterrestris* é o plaqueamento e cultivo em meio de cultura (CHANG; PARK; KANG, 2013).

Apesar de ser específico, o crescimento das colônias bacterianas demora em média 48 h, o que não é atrativo em termos comerciais, uma vez que a cadeia produtiva sempre visa processos rápidos. Além disso, há o requerimento de equipamentos laboratoriais apropriados, como estufas, câmara de fluxo e vidrarias específicas, e de pessoal qualificado para se realizar os testes. Métodos mais rápidos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) (HUNNIGER; FELBINGER; *et al.*, 2015) e o ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA) (MAST *et al.*, 2016) também são utilizados em determinados casos, mas exigem o uso de reagentes caros e também necessitam de ambiente laboratorial e pessoal qualificado. Eguiluz e colaboradores desenvolveram um eletrodo baseado em vidro de óxido de estanho dopado com flúor (FTO) para a detecção eletroquímica de uma sequência específica de *A. acidoterrestris*, porém exigia a aplicação da técnica de PCR reversa em amostras de RNA visando sua detecção, tornando-se inviável em um laboratório de controle de qualidade, visto a instabilidade do RNA isolado e os gastos de tempo e reagentes específicos para as reações de amplificação. (EGUILUZ *et al.*, 2009).

Tendo isso em mente, a procura por novos métodos de detecção de *A. acidoterrestris* que sejam rápidos, baratos e precisos é muito atrativa para a indústria citrícola. Os biossensores entram nesse nicho, com a proposta de desenvolvimento de dispositivos que sejam de fácil manuseio, para detecção de inúmeros analitos.

### **1.3. Biossensores**

Os biossensores são dispositivos analíticos que incorporam algum elemento biológico, capazes de produzir sinais mensuráveis que se relacionem à concentração do analito de interesse (TURNER, 2013). Os biossensores combinam um sistema de reconhecimento bioquímico a um transdutor (Figura 2), que converte esse evento de reconhecimento em um sinal mensurável (SANVICENS *et al.*, 2011).



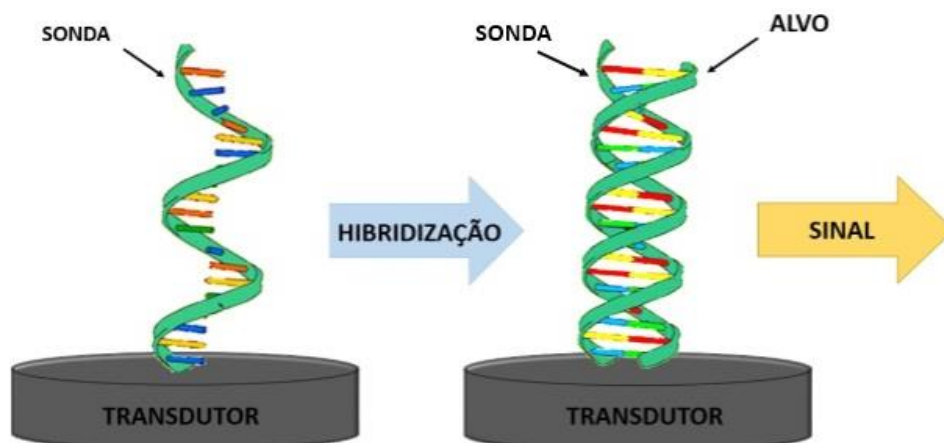
**Figura 2** – Esquema representativo de um biossensor (autoria própria).

O sucesso da associação entre as técnicas de detecção e biomoléculas específicas possibilitou o desenvolvimento de tecnologias de reconhecimento molecular sensíveis e seletivas, com aplicações que incluem a análise clínica (SOHRABI *et al.*, 2016), ambiental (FEBBRAIO *et al.*, 2011) toxicológica, medicina do esporte (RAPP; GRUHL; LANGE, 2010), segurança alimentar (IZADI *et al.*, 2016), descoberta de novas drogas (HASANZADEH; SHADJOU, 2016), segurança e defesa (RAMACHANDRAN *et al.*, 2015), dentre outras.

Vários tipos de biomoléculas podem ser incorporados nos biossensores, como anticorpos, antígenos, enzimas ou ácidos nucleicos, sendo este último denominado genossensor.

### 1.3.1. Genossensores

Genossensores são dispositivos analíticos resultantes da integração de uma sequência de sonda específica (geralmente um oligonucleotídeo) a um transdutor (GONG *et al.*, 2015). A sonda imobilizada na superfície do transdutor reconhece uma molécula-alvo de ácido nucleico pela hibridização das sequências complementares (Figura 3).



**Figura 3** – Esquema representativo de um genossensor (autoria própria).

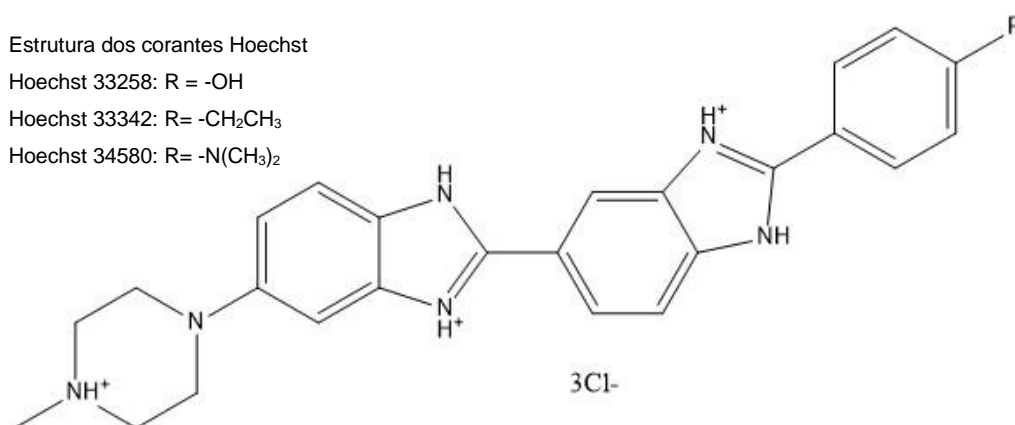
Cada organismo vivo possui seu próprio código genético, e consequentemente, regiões do DNA com sequências de bases nitrogenadas específicas para cada espécie. Diante disto, a utilização de oligonucleotídeos que reconhecem tais regiões é largamente utilizada. Eletroquimicamente, esse reconhecimento pode ser feito tanto diretamente (através da oxidação direta das bases nitrogenadas do DNA) presentes na superfície do genossensor, quanto indiretamente (pela utilização de moléculas eletroativas intercalantes de DNA) (CASTRO *et al.*, 2014). Em ambos os casos citados, a reação envolve a transferência de elétrons, constituindo um genossensor eletroquímico. Nesses, o transdutor converte a resposta do evento de reconhecimento biológico em um sinal elétrico (WANG, K. *et al.*, 2011). Em geral, os métodos eletroquímicos destacam-se pela sua especificidade por um estado de oxidação particular de uma substância, pelo baixo custo da instrumentação e pela possibilidade de fornecer informações acerca da atividade de espécies químicas (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

A oxidação das bases nitrogenadas do DNA já é bem estudada. Brett e colaboradores estudaram a oxidação das bases nitrogenadas isoladas em solução e também quando as mesmas estão presentes na fita de DNA (resíduos de bases), em eletrodos de carbono vítreo (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004). Foi verificado que os resíduos das bases nitrogenadas púricas (guanina e adenina) são os mais facilmente oxidáveis, possuindo potencial de oxidação de 0,9 e 1,2 V (vs. Ag/AgCl), respectivamente. Na detecção eletroquímica direta das bases nitrogenadas são esses os potenciais monitorados, porém, em

amostras complexas, essa faixa pode ser problemática, principalmente devido à presença de interferentes eletroativos. Dessa forma, a procura por novos indicadores eletroativos cujos potenciais de oxidação sejam menores é de grande valia (ALVES-BALVEDI *et al.*, 2016).

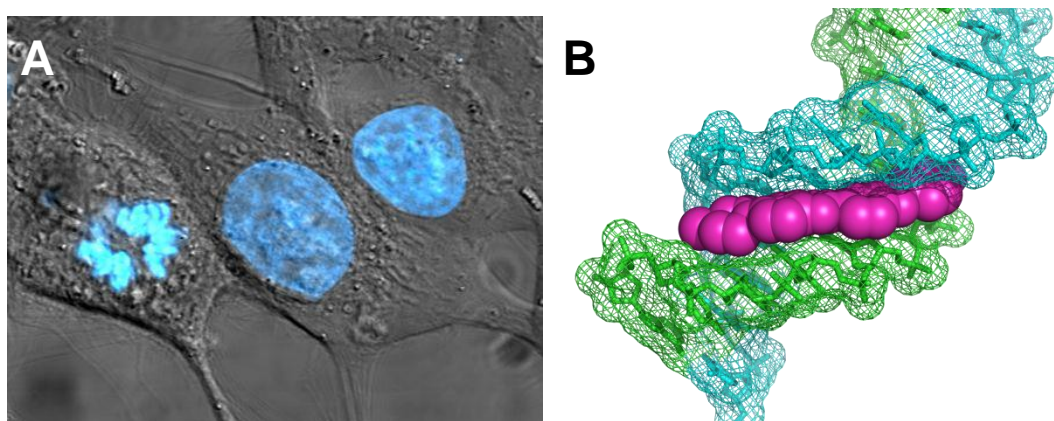
### 1.3.2. Hoechst 33258

Dentre as diversas substâncias intercalantes do DNA, a classe das bis-benzidimidas é amplamente utilizada na biologia molecular como corante de ácidos nucleicos (BREUSEGEM *et al.*, 2001). A empresa química alemã Hoechst® foi pioneira na produção de tais compostos, numerando-os de acordo com seu descobrimento. Os compostos Hoechst 33258, Hoechst 33342, e Hoechst 34580 são os mais utilizados para tal finalidade, possuindo uma estrutura semelhante na qual um grupo funcional varia (Figura 4).



**Figura 4** – Estrutura dos compostos Hoechst mais utilizados (autoria própria).

Esses compostos possuem espectros de emissão e excitação bem conhecidos, possuindo uma fluorescência azul característica, sendo assim muito utilizados como corantes do núcleo celular em eletromicrografias de fluorescência. O Hoechst 33258 se liga ao sulco menor do DNA, sendo assim um intercalante da dupla fita, não exibindo afinidade pela simples fita de DNA (BUSTO *et al.*, 2015) (Figura 5).



**Figura 5 – (A)** Micrografia de fluorescência do núcleo de células HeLa coradas com Hoechst 33258. **(B)** Modelo molecular da interação do Hoechst 33258 (em magenta) com o duplex de DNA (azul e verde) (Protein Data Bank, 2017).

O uso do Hoechst 33258 não se limita apenas à micrografia, uma vez que é uma molécula eletroquimicamente ativa. Seu uso nessa área é recente, sendo reportados poucos estudos com sua utilização como indicador eletroativo. Kobayashi e colaboradores reportaram seu uso pela primeira vez como um indicador eletroquímico para a quantificação de DNA (KOBAYASHI *et al.*, 2004). Já Zhao e colaboradores desenvolveram um *microchip* para a detecção eletroquímica do DNA utilizando Hoechst 33258 como um intercalante da dupla fita, mostrando sua aplicabilidade em genossensores (ZHAO *et al.*, 2012). Em ambos os trabalhos, foi verificado que esse intercalante possui um pico de oxidação característico por volta de 0,5 V (vs. Ag/AgCl), o que é atrativo devido a esse ser um potencial mais baixo daquele da oxidação das bases nitrogenadas do DNA. Além disso, o Hoechst 33258 é menos mutagênico e carcinogênico do que outros intercalantes da dupla fita de DNA (FERGUSON; DENNY, 1995). Essas características tornam esse composto de grande interesse para a construção de dispositivos de detecção de DNA, como os já mencionados genossensores.

#### 1.4. Eletrodos modificados

Em 1975, o termo eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi introduzido para designar um eletrodo em cuja superfície espécies quimicamente ativas foram imobilizadas (MOSES *et al.* 1975). Essa

modificação visa pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como uma forma de alterar a seletividade e sensibilidade do eletrodo (MURRAY *et al.* 1987).

Há várias vantagens na utilização de EQMs como, por exemplo, facilitação das interações de um analito na camada modificada, eletrocatalise de reações redox, transferência otimizada de elétrons para o eletrodo base, permissividade com uso de membranas para inibir interferentes, detecção eletroquímica de analitos iônicos não-redox e a incorporação de biomoléculas (PEREIRA *et al.* 2002).

É primordial a escolha adequada do material do eletrodo base, pois essa matriz deve apresentar características apropriadas e também deve ser adequada para o método de imobilização selecionado. Dentre os materiais mais utilizados incluem-se ouro, platina, mercúrio, vidros condutores e carbono em suas mais variadas formas (carbono vítreo, fibras de carbono, pasta de carbono, grafite e carbono reticulado). Destaca-se o carbono grafite por seu baixo custo, versatilidade e ampla faixa de trabalho (HOROZOVA; DODEVSKA; DIMCHEVA, 2009).

Existe uma gama de técnicas que podem ser utilizadas para a modificação desses eletrodos, sendo as mais utilizadas a adsorção física, ligação covalente e a imobilização de filmes poliméricos. Esta última vem ganhando espaço atualmente, devido à imensa variedade de monômeros disponíveis que conferem propriedades únicas como a possibilidade de imobilização de espécies ativas, bloqueio de interferentes e aumento da velocidade de transferência de elétrons, da área superficial, da sensibilidade e da seletividade dos eletrodos (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015).

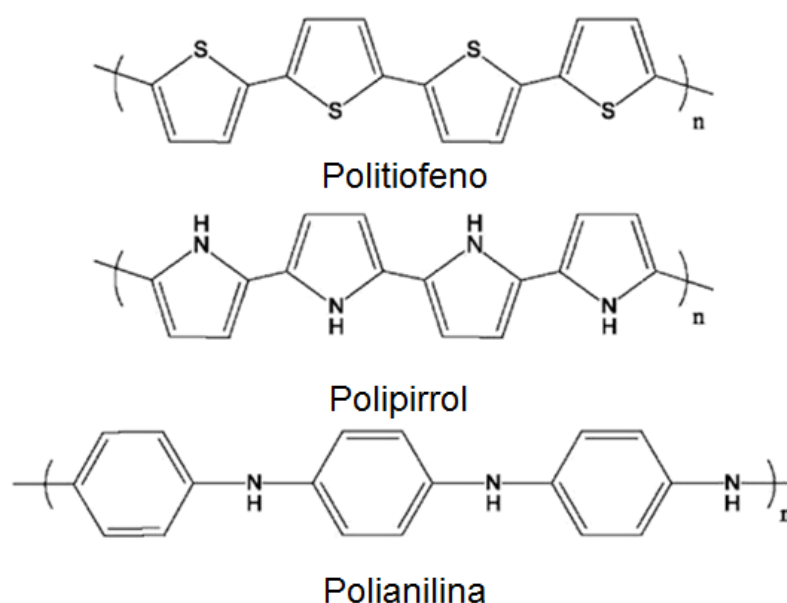
#### **1.4.1. Polímeros**

Os polímeros são materiais compostos por unidades de moléculas relativamente simples que se repetem, ligadas entre si por ligações covalentes, formando macromoléculas. Essas unidades de moléculas que dão origem aos polímeros são chamadas monômeros.

Os polímeros constituem várias substâncias comuns e essenciais na vida diária do ser humano, como as proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos e

materiais como plásticos, borrachas, tintas e poliésteres. Além disso, são amplamente utilizados na indústria automobilística, civil, de transporte, na área médica e odontológica e também podem ser utilizados como compósitos, devido à sua combinação com um ou mais materiais (NAMBIAR; YEOW, 2011).

Avanços na pesquisa permitiram a descoberta de polímeros orgânicos condutores de eletricidade, que se tornam promissores devido à sua aplicabilidade na construção de dispositivos elétricos como os biossensores, pois possuem a capacidade de transferir eficientemente elétrons produzidos por reações bioquímicas para os equipamentos eletrônicos usados para a leitura do sinal, funcionando como uma camada intermediária. Esses materiais são capazes de adquirir carga positiva ou negativa por meio de oxidação ou redução, contribuindo para a condutividade elétrica. Alguns exemplos de polímeros condutores amplamente utilizados são o politiofeno, o polipirrol e a polianilina (Figura 6), polímeros esses que possuem uma rede de elétrons  $\pi$  (NAMBIAR; YEOW, 2011).

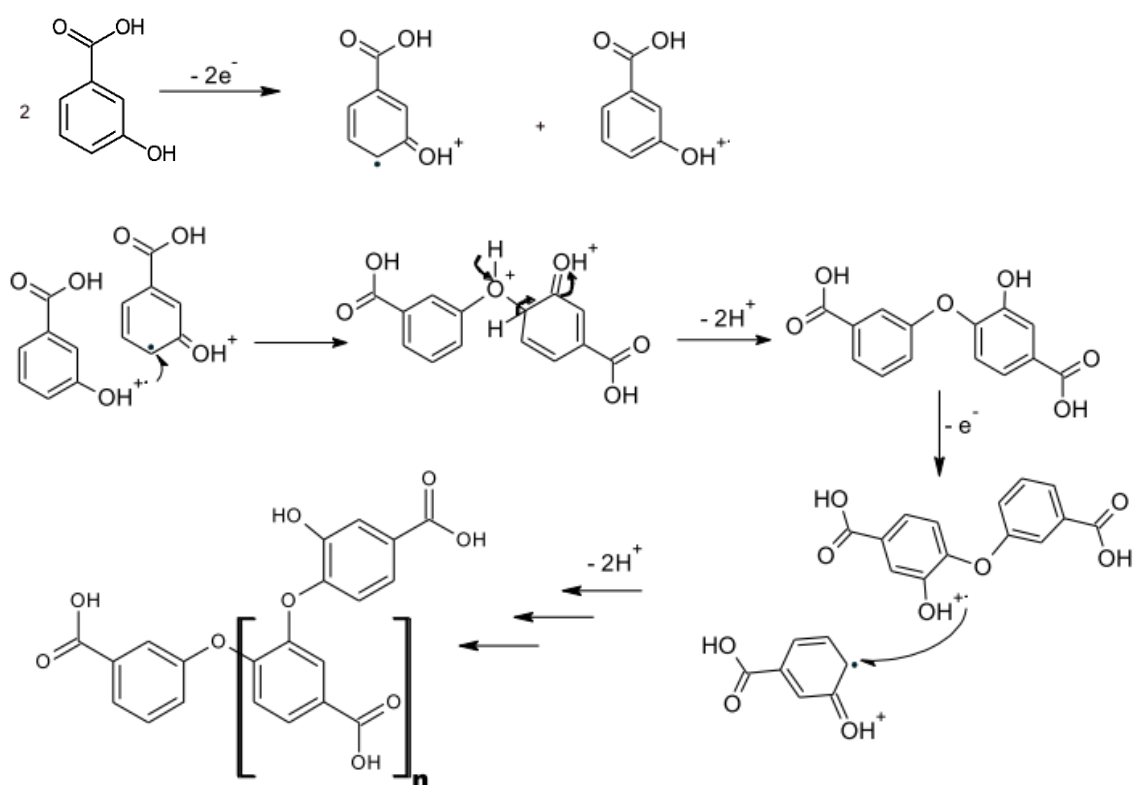


**Figura 6** – Fórmulas estruturais do politiofeno, do polipirrol e da polianilina. Destaque para as ligações duplas alternadas que tornam esses polímeros condutores. A polianilina está representada na sua forma isolante (leucoesmeraldina base), porém assume formas condutoras (autoria própria).

Polímeros contendo elétrons  $\pi$  apresentam propriedades eletrônicas não usuais tais como condutividade elétrica, baixo potencial de ionização e elevada

afinidade eletrônica. A preparação de tais polímeros pode ser feita por métodos eletroquímicos, metodologia que apresenta grande reprodutibilidade, é simples, barata, e pode ser realizada à temperatura ambiente. Além disso, a espessura do filme pode ser controlada pela variação de potencial ou corrente versus tempo ou por meio da variação do número e/ou velocidade de varreduras de potencial (FRANCO *et al.*, 2008).

Isômeros do ácido hidroxibenzóico podem ser utilizados no desenvolvimento de filmes poliméricos condutores para a modificação de eletrodos (FERREIRA, L. F. *et al.*, 2011) devido à presença de grupos funcionais (ácido carboxílico e hidroxila) que são passíveis de sofrerem eletropolimerização e interagirem com nanomateriais e biomoléculas. O grupo hidroxila ligado ao anel aromático pode ser oxidado gerando um cátion radical, dando origem à espécie reativa, e propagando a formação de cadeias de poliéter (FERREIRA, D. C. *et al.*, 2014). A Figura 7 mostra o mecanismo proposto de eletropolimerização do ácido 3-hidroxibenzóico (3-HBA) para a formação do poliéter.



**Figura 7** – Mecanismo proposto para a formação de poliéteres durante a eletropolimerização do 3-HBA em meio ácido (FERREIRA, D. C. *et al.*, 2014).

Nosso grupo de pesquisa têm desenvolvido várias estratégias para melhorar as propriedades de filmes poliméricos como o 3-HBA, destacando-se a incorporação de materiais nanoestruturados, originando nanocompósitos poliméricos.

#### **1.4.2. Nanocompósitos**

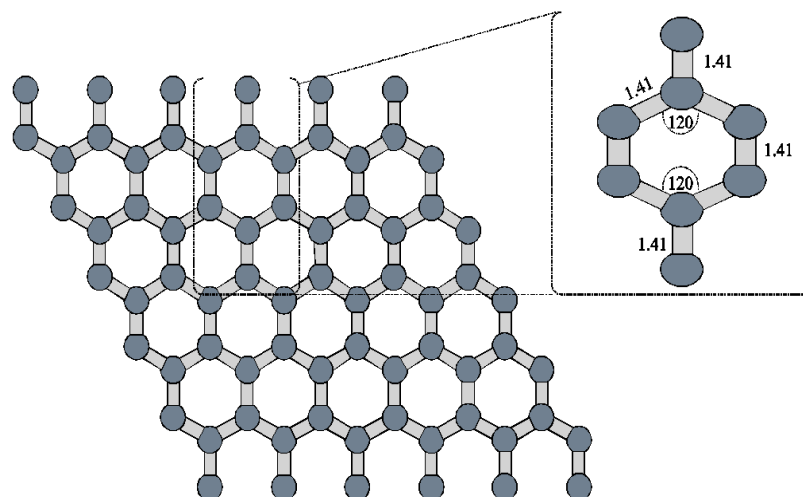
Os compósitos representam uma classe de materiais onde duas ou mais substâncias combinadas passam a exibir propriedades únicas, que não são possíveis de serem obtidas a partir de seus componentes individuais. Quando pelo menos uma das fases constituintes do compósito possui uma de suas dimensões em escala nanométrica, este passa a ser denominado nanocompósito (WANG, Q. *et al.*, 2011).

Nanocompósitos estão sendo projetados para as mais diversas finalidades, como a produção de plásticos que retardam a chama (IDUMAH; HASSAN; AFFAM, 2015), entrega e liberação controlada de medicamentos em nanocápsulas (MERINO *et al.*, 2015), tratamento de água (SUBRAMANI; JACANGELO, 2015), embalagem de alimentos (BUMBUDSANPHAROKKE; KO, 2015), cirurgias e transplantes de órgãos (CROWLEY; BIRCHALL; SEIFALIAN, 2015), dispositivos eletrônicos (RATH; KUNDU, 2015), dentre outras.

Vários materiais nanoestruturados vêm sendo utilizados na preparação de nanocompósitos poliméricos, como, por exemplo, nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro, pontos quânticos, grafeno e seus derivados (NASIR; KAUSAR; YOUNUS, 2015). Recentemente, o grafeno e seu derivado, o óxido de grafeno reduzido (OGR), têm se destacado devido às suas propriedades únicas como elevada área superficial, baixo custo, alta velocidade de transferência de elétrons e alta resistência mecânica (LEE *et al.*, 2015)

#### **1.4.3. Grafeno e seus derivados**

O grafeno é um material formado por uma camada de átomos de carbono organizados em um plano de forma hexagonal e em hibridização  $sp^2$ . As distâncias entre as ligações C-C são de aproximadamente 1,41 Å (Figura 8) e com uma espessura de um átomo de carbono (YANG *et al.*, 2012).



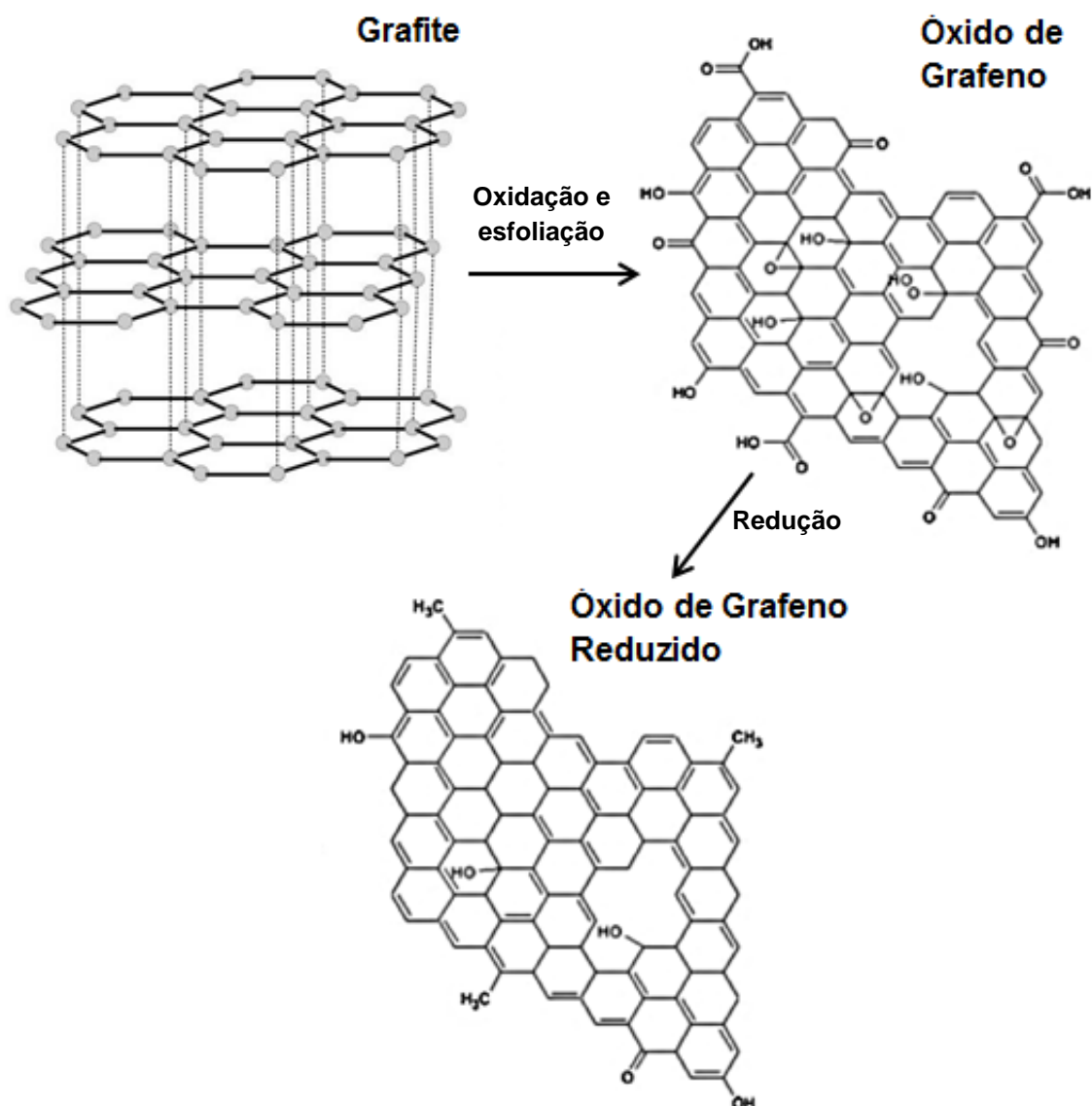
**Figura 8** – Estrutura do grafeno (ALZAHRANI 2011).

Esse material exibe propriedades interessantes, tais como alta resistência mecânica, leveza e alta condutividade de calor e eletricidade, possuindo assim muitas aplicações, tais como dispositivos de cristal líquido, em equipamentos de microeletrônica, para a fabricação de células solares, sensores e biossensores (HUANG, H. Y. *et al.*, 2015).

Este nanomaterial pode ser obtido de diversas maneiras, como esfoliação mecânica de folhas de grafite, crescimento epitaxial e redução química, térmica ou eletroquímica do óxido de grafite (OGra) (DREYER *et al.*, 2010).

O OGra é facilmente obtido a partir do grafite por meio da metodologia de Hummers, apresentando a vantagem de poder ser disperso em água devido à presença de grupos hidroxila, carbonila e carboxila nas extremidades e grupos epóxido no plano basal. Quando as folhas de OGra são esfoliadas, formando uma única camada, temos o Óxido de Grafeno (OG) (Figura 9). No entanto, o OG conduz pouca corrente elétrica devido à interrupção da nuvem  $\pi$  de elétrons. Dessa forma, é necessária uma redução desses grupos, principalmente o epóxido, que pode se dar por métodos térmicos, químicos (que incluem o uso de agentes redutores como a hidrazina) e eletroquímicos (PARK *et al.*, 2011). A redução eletroquímica apresenta vantagens, como sua rapidez, eficiência, custo reduzido e a possibilidade de geração de camadas de material reduzido diretamente sobre a superfície a ser modificada, além de ser menos agressiva ao meio ambiente, uma vez que não requer reagentes químicos nocivos e não gera produtos contaminantes. O material produzido é

comumente chamado de óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente (OGRE) (MOHAN *et al.*, 2015).



**Figura 9** – Estruturas químicas do grafite, óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente (adaptado de MOHAN *et al.*, 2015).

O OGRE apresenta ótima biocompatibilidade quando utilizado em dispositivos de biossensoriamento, facilitando a transferência eletrônica entre o material biológico e o substrato, além de aumentar a área superficial do eletrodo, o que viabiliza a utilização de pequenas quantidades de amostra, reduzindo o custo. Dessa forma, nanocompósitos formados por OGRE e polímeros condutores são atraentes para a confecção de biossensores (DA SILVA; MADURRO; MADURRO, 2017).

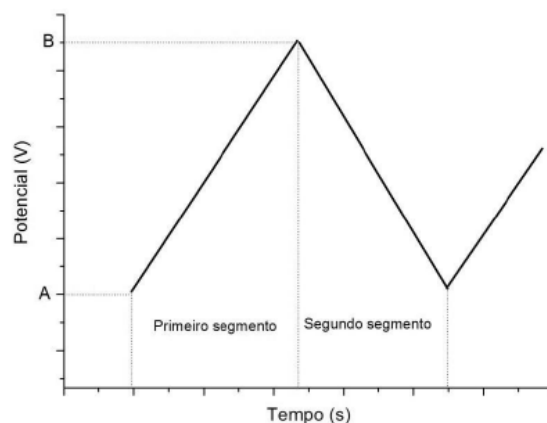
## **1.5. Técnicas Eletroquímicas**

Dentre os métodos eletroanalíticos disponíveis, destacam-se os métodos interfaciais dinâmicos, que investigam fenômenos na interface entre a superfície dos eletrodos e a fina camada de solução adjacente a essa superfície, na presença de corrente elétrica na célula eletroquímica. Dentre os métodos interfaciais dinâmicos, que são geralmente sensíveis, existem aqueles em que o potencial da célula eletroquímica é controlado enquanto medidas de outras variáveis são feitas. Um exemplo é a voltametria, em que é medida a corrente em função do potencial elétrico (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

Na voltametria, é possível variar o sinal de excitação de potencial aplicado a um eletrodo de trabalho, variando também a resposta de corrente produzida. Cada sinal de excitação relaciona-se a uma forma de onda característica, sendo originadas técnicas como a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).

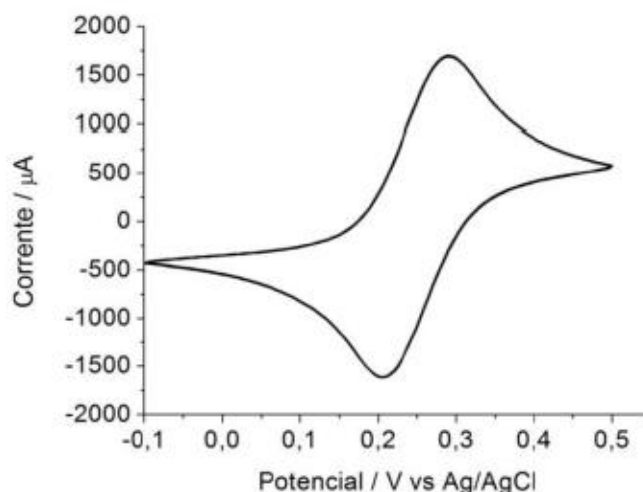
### **1.5.1. Voltametria Cíclica**

A voltametria cíclica (VC) varre linearmente o potencial de um eletrodo de trabalho (WANG, J., 2006), usando uma forma de onda como mostra a Figura 10. Desse modo, o potencial é variado linearmente de A até B. Em seguida, quando o extremo B é atingido, a direção é invertida e o potencial é novamente variado até o valor inicial A. O ciclo de varreduras tem uma velocidade específica e pode ser repetido (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).



**Figura 10** - Forma de onda característica da VC, com potencial elétrico em função do tempo. Cada ciclo é composto por dois segmentos: um que varia o potencial de A a B e outro que vai de B a A (RODOVALHO 2014).

O gráfico resultante, de corrente em função do potencial, é chamado voltamograma cíclico. Assumindo que a forma reduzida de um dado analito está presente na solução inicialmente, o primeiro meio-ciclo será obtido a partir de uma varredura em direção a potenciais mais positivos. Durante essa varredura, será atingido um potencial característico do processo redox, em que uma corrente anódica começa a aumentar, até atingir um pico, e depois decair. Ao término da varredura, ocorrerá uma inversão, de modo que o segundo meio-ciclo será em direção a potenciais mais negativos. As moléculas que foram oxidadas no primeiro meio-ciclo serão reduzidas no segundo e o perfil da resposta será similar à do primeiro meio ciclo, se o processo for reversível (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007). A Figura 11 mostra um exemplo típico de voltamograma cíclico de um par redox bem conhecido (ferro/ferricianeto de potássio), com um pico de oxidação próximo ao potencial 0,3 V e um pico de redução próximo ao potencial 0,2 V. O formato do voltamograma, incluindo o potencial em que aparecem os picos de corrente anódica e catódica, bem como a área e altura desses picos, frequentemente são os alvos da interpretação dos experimentos (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015).

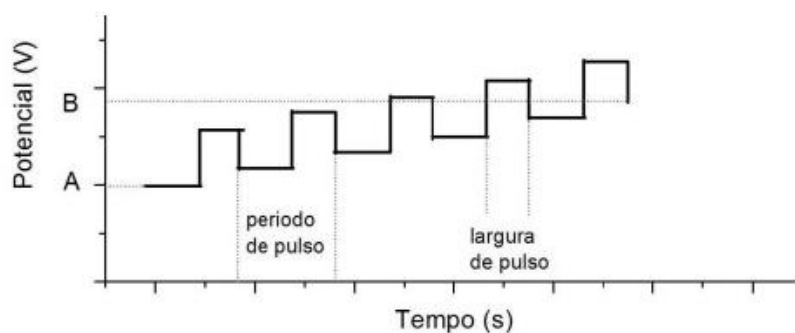


**Figura 11** - Exemplo de voltamograma cíclico, com um pico de oxidação próximo 0,3 V e um de redução próximo a 0,2 V (RODOVALHO 2014).

A VC tem sido abundantemente utilizada em estudos de mecanismos de reações, de processos de adsorção e aplicações quantitativas (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015).

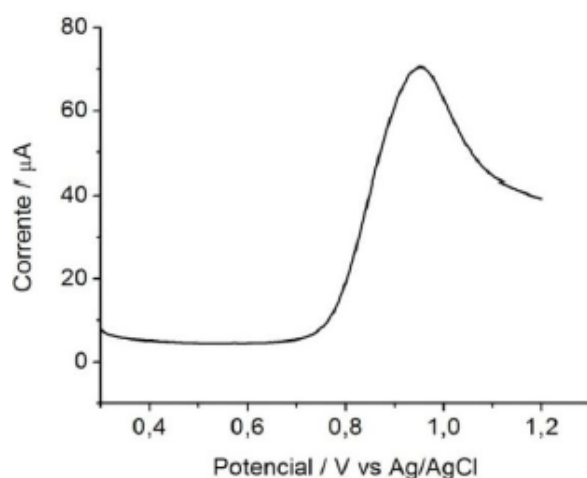
### 1.5.2. Voltametria de Pulso Diferencial

A voltametria de pulso foi desenvolvida com o objetivo de superar as limitações da tradicional voltametria de varredura linear (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007). Uma das grandes vantagens de seu desenvolvimento é a diminuição dos limites de detecção das técnicas voltamétricas (CHILLAWAR; TADI; MOTGHARE, 2015). A ideia por trás da voltametria de pulso é realizar a medida de corrente em um momento em que é grande a diferença entre corrente faradaica (desejada) e a corrente não-faradaica (interferente) (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007). Assim, os potenciais são aplicados na forma de pulsos e a corrente é medida algum tempo após a aplicação, quando a corrente não-faradaica tiver decaído (WANG, J., 2006). A Figura 12 esquematiza graficamente a variação de potencial de acordo com o tempo.



**Figura 12** - Forma de onda característica da voltametria de pulso diferencial (VPD). As leituras das correntes são feitas antes e depois de cada pulso e a diferença entre elas é registrada em função do potencial (RODOVALHO 2014).

No caso da VPD, as medidas de corrente são feitas alternadamente: uma anterior ao pulso e outra no fim do pulso. A diferença de corrente é gravada como uma função do potencial de excitação aplicado, que aumenta linearmente. Assim, o resultado é uma curva diferencial, consistindo um pico cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito (Figura 13). A principal vantagem da técnica é a sua grande sensibilidade (SKOOG, HOLLER e CROUCH, 2007).



**Figura 13** - Exemplo de voltamograma de pulso diferencial (RODOVALHO 2014).

O potencial do pico pode ser utilizado para identificar espécies, inclusive aquelas com potencial redox similar, devido à boa resolução da técnica (OZEL; HAYAT; ANDREESCU, 2015).

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento de um genossensor para a detecção eletroquímica do DNA genômico da bactéria *Alicyclobacillus acidoterrestris*, baseado em um eletrodo de grafite modificado com o nanocompósito polimérico OGRE/poli(3-HBA).

### 2.2. Objetivos específicos

- ✓ Síntese e caracterização do óxido de grafeno;
- ✓ Redução eletroquímica e caracterização do óxido de grafeno;
- ✓ Polimerização eletroquímica do ácido 3-hidroxibenzóico sobre eletrodos modificados ou não com OGRE;
- ✓ Caracterização do EG/OGRE/poli(3-HBA) e comparação com o EG/poli(3-HBA);
- ✓ Imobilização de uma sonda de oligonucleotídeo específica para *A. acidoterrestris* na superfície do EG/OGRE/poli(3-HBA);
- ✓ Detecção do alvo complementar sobre o eletrodo modificado por voltametria de pulso diferencial, de forma direta e indireta;
- ✓ Obtenção de um lisado celular de *A. acidoterrestris*;
- ✓ Detecção do DNA genômico da bactéria *A. acidoterrestris* presente no lisado celular, na superfície do bioeletrodo.
- ✓ Diferenciação do controle positivo (*A. acidoterrestris*) de um controle negativo.
- ✓ Detecção em amostras reais de suco de laranja;
- ✓ Determinação dos parâmetros analíticos do genossensor;
- ✓ Determinação da estabilidade do nanocompósito e do bioeletrodo.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e ultra pura (resistividade de 18,2 MΩ cm, Gehaka), sendo aquelas utilizadas para fins eletroquímicos desoxigenadas com gás nitrogênio ultrapuro previamente ao uso, por tempo proporcional ao volume (1 min mL<sup>-1</sup>). Os experimentos, quando não indicada a temperatura, foram realizados em temperatura ambiente (25±1 °C). A concentração das soluções está indicada após sua menção durante o texto. Os reagentes utilizados foram de padrão analítico e estão listados abaixo em ordem alfabética:

- 2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazinil)-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroclorato hidrato (Hoechst 33258, 99%, Sigma Aldrich);
- Ácido 3-hidroxibenzóico (99%, Acros Organics);
- Ácido cítrico (99%, Synth);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, 99%, Vetec);
- Ácido perclórico (37%, Merck);
- Ácido sulfúrico (98%, Synth);
- Citrato de sódio (99%, Synth);
- Cloreto de potássio (99%, Neon);
- Cloreto de sódio (99%, Synth);
- Dodecil Sulfato de Sódio (95%, Vetec);
- Ferricianeto de potássio (99%, Vetec);
- Ferrocianeto de potássio (99%, Reagen);
- Fosfato de sódio dibásico (99%, Synth);
- Fosfato de sódio monobásico (99%, Synth);
- Pó de grafite (99,99%, Sigma Aldrich);
- Nitrato de sódio (99%, Synth);
- Permanganato de potássio (95%, Synth);
- Peróxido de hidrogênio (29%, Synth);
- Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (99%, Life Technologies).

### 3.2. Amostras biológicas

Neste estudo foram utilizadas três sequências de DNA (oligonucleotídeos), listadas a seguir:

- Oligonucleotídeo ALIC1 (5'-CTGTGTTGATGTTGTTGGCG-3', liofilizado, Invitrogen);
- Oligonucleotídeo ALIC2 (5'-CGCCAACAACATCAACACAG-3', liofilizado, Invitrogen);
- Oligonucleotídeo poli(GA) (5'-GGGGGGGGGAAAAAAAAA-3', liofilizado, Alpha DNA).

O oligonucleotídeo ALIC1 e seu complementar, ALIC2, são sequências específicas para *A. acidoterrestris* (GenBank: DD330996.1). Todos os oligonucleotídeos foram diluídos em solução tampão citrato de sódio salino (citrato de sódio 0,03 mol L<sup>-1</sup>, NaCl 0,3 mol L<sup>-1</sup>, ajustado com ácido cítrico, pH 7,0) obtendo a concentração de 1x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. Uma solução de bloqueio foi preparada com albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich 96%) a 0,5% (m/v) em uma solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4). Como controle negativo, foi utilizada solução de DNA genômico de *Escherichia coli*, o qual foi purificado utilizando-se o extrator ABBOTT m2000sp, sendo utilizada água isenta de DNAase como solvente.

### 3.3. Cultivo e obtenção do lisado celular de *A. acidoterrestris*

Parte do conteúdo de uma ampola contendo a bactéria *A. acidoterrestris* liofilizada (obtida pela Fundação André Toselo) foi solubilizado em 100 mL de meio líquido de cultura para *Bacillus acidocaldarius* (BAM), e o mesmo foi incubado em estufa a 40 °C durante 48 h. Após o crescimento bacteriano, o meio foi centrifugado a 5.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de solução tampão Tris-EDTA (Tris-HCl 1x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, EDTA 1x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0), centrifugado novamente a 5000 rpm por 10 min, e o precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de solução tampão Tris-EDTA. Foram adicionados 50 µL de uma solução aquosa de dodecil sulfato de

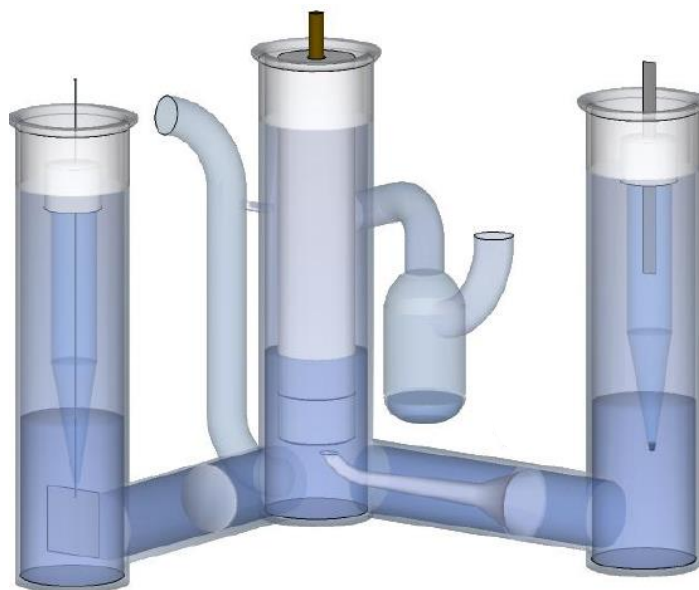
sódio (SDS, 10%), seguido de incubação por 30 min a 65 °C. O SDS tem por função romper a membrana bacteriana e expor seu DNA genômico, uma vez que se trata de uma substância anfipática, desestabilizando a membrana celular. O lisado foi centrifugado (11.000 rpm, 15 min), o sobrenadante foi descartado, o precipitado foi solubilizado em 100 µL de solução tampão Tris-EDTA e estocado a -8 °C até o momento do uso. Essa solução foi denominada controle positivo, e a concentração de DNA na mesma foi determinada utilizando um espectrofotômetro da marca BioDrop®, no qual a absorbância das amostras foi mensurada em 260 nm, comprimento de onda na qual as bases nitrogenadas do DNA respondem.

### **3.4. Amostras de suco de laranja**

Uma amostra de suco de laranja concentrado (65 °Brix) foi obtida na Empresa Brasileira de Bebidas e Alimentos® (EBBA), localizada em Araguari-MG. Este suco concentrado foi diluído em solução tampão fosfato de sódio a 5% (v/v) (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) e autoclavado para assegurar a sua esterilidade. Uma vez que o suco de laranja deve estar totalmente livre de *A. acidoterrestris*, optou-se por fazer uma diluição 1:1 do lisado no suco de laranja estéril, para verificar se os componentes do mesmo iriam interferir na detecção. Para isso, foram adicionados 7,5 µL da solução de lisado celular de *A. acidoterrestris* em 7,5 µL de solução do suco de laranja diluído. Esta solução de suco de laranja artificialmente contaminada foi utilizada como amostra positiva para a detecção eletroquímica.

### **3.5. Medidas Eletroquímicas**

Os testes eletroquímicos foram realizados em uma célula de três compartimentos (Figura 14) com capacidade para 25 mL de solução. Os eletrodos utilizados foram: eletrodo de trabalho de grafite, eletrodo de referência de Ag/AgCl e KCl (3 mol L<sup>-1</sup>) e eletrodo auxiliar de platina (área geométrica de 2 cm<sup>2</sup>). Em todos os experimentos foi utilizado um potenciostato da marca CH Instruments, modelo 760C.



**Figura 14** - Esquema da célula eletroquímica de 3 compartimentos utilizada neste estudo. Da esquerda para a direita, em cada compartimento: eletrodo auxiliar, eletrodo de trabalho (conectado na base de latão e envolto em teflon) e eletrodo de referência (RODOVALHO, 2014).

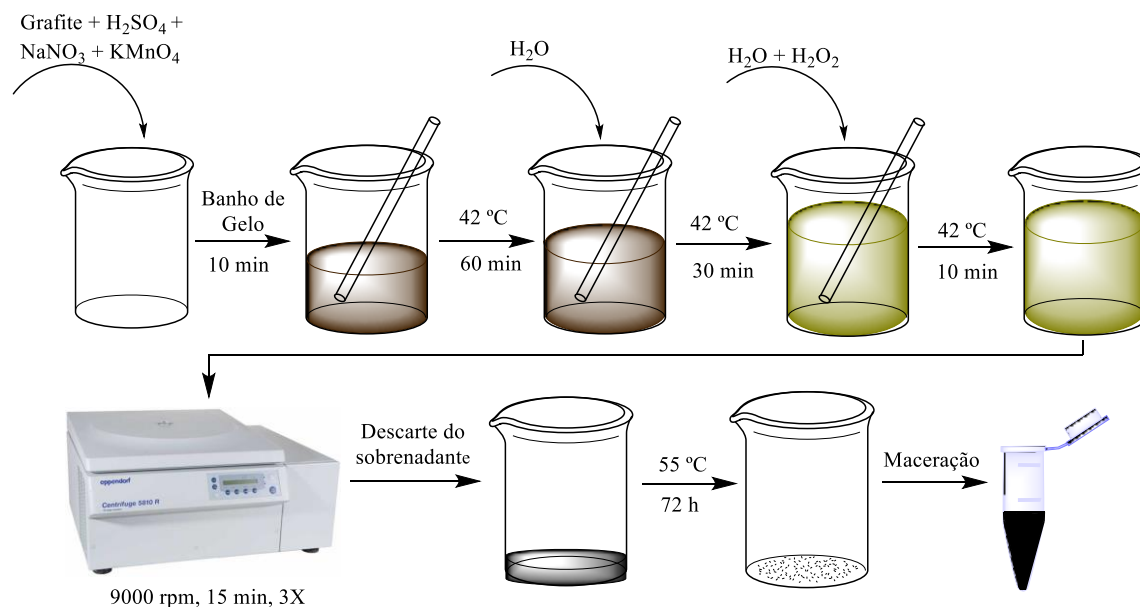
Foram utilizados discos de grafite (99,9995% de pureza, Alfa Aesar) de 6 mm de diâmetro como eletrodos de trabalho, colados sobre latão com cola de prata e envoltos por uma base de Teflon®. Os espaços entre a base e o sistema grafite/latão foram preenchidos com cola epóxi. Em seguida, um polimento do eletrodo foi realizado em lixas d'água com granulação de 400 cm<sup>-2</sup> e 1500 cm<sup>-2</sup>, para nivelar a superfície do grafite. Posteriormente, utilizou-se uma suspensão aquosa de alumina 0,3 µm sobre feltro para um polimento mais fino. Para a remoção da alumina, os eletrodos foram tratados em ultrassom por 5 min em água deionizada.

Após o polimento, o eletrodo de grafite foi submetido a uma voltametria cíclica com potencial elétrico entre 0 a 1,2 V (vs. Ag/AgCl) e  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$  em solução de ácido perclórico 0,5 mol L<sup>-1</sup>, visando uma padronização e controle da qualidade dos eletrodos, uniformizando-os para as etapas subsequentes.

### 3.6. Síntese do Óxido de Grafite

O OGr foi produzido utilizando-se o método descrito por Hummers com algumas modificações, de acordo com o esquema da Figura 15. Para tal, os

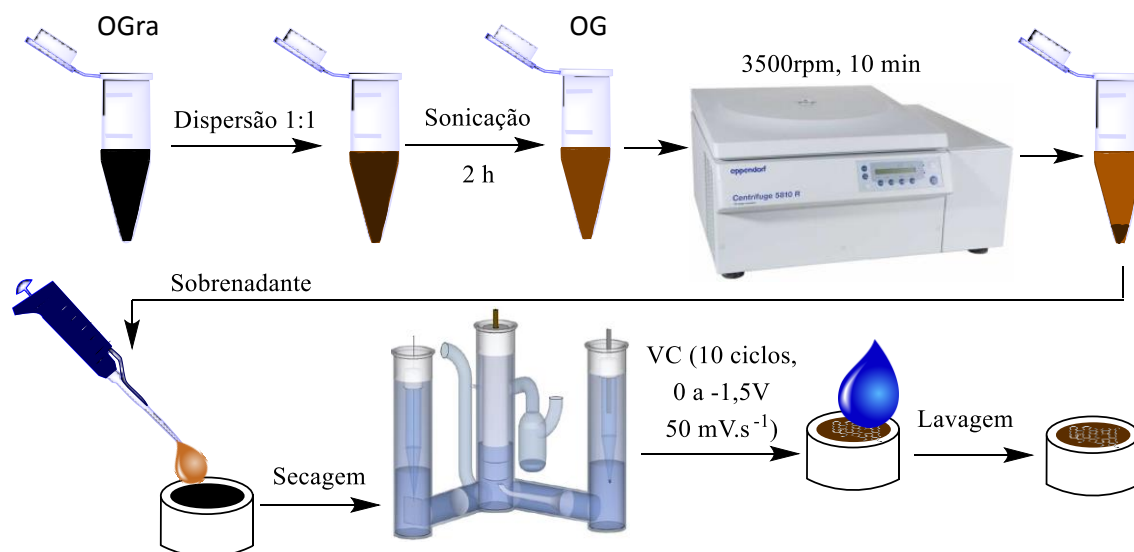
reagentes e vidrarias foram levados a uma capela e utilizou-se máscara, uma vez que durante o processo há a liberação de vapores potencialmente tóxicos. Misturou-se 2 g de grafite em 50 mL de ácido sulfúrico (98%). Em seguida foram adicionados 2 g de nitrato de sódio e 6 g de permanganato de potássio. Essa mistura ficou em banho de gelo por 10 min, para evitar o aquecimento excessivo devido à reação exotérmica. Em seguida, sob agitação constante, a mistura foi mantida em banho-maria a 42 °C por 60 min. Decorrido este período, foram cuidadosamente adicionados 95 mL de água e mantido sob agitação constante por mais 30 min. Ao fim dos 30 min, foram adicionados 285 mL de água e 20 mL de peróxido de hidrogênio (29%) e mantido sob agitação por mais 10 min. A solução resultante foi centrifugada por 15 min a 9.000 rpm por três vezes, descartando-se o sobrenadante e utilizando-se água deionizada nas duas últimas centrifugações. O material obtido foi seco em estufa a 55 °C por 72 horas, macerado em almofariz e acondicionado em microtubos até o momento da utilização.



**Figura 15** – Representação esquemática da metodologia empregada na síntese do OGrA (autoria própria).

### 3.6. Obtenção do OGRE

A obtenção do OGRE foi feita como descrito na Figura 16. OGr foi disperso em água deionizada em uma razão de 1:1 (mg:mL), seguido de sonicação por 2 horas, visando a esfoliação de suas folhas, obtendo-se o OG. A dispersão foi centrifugada por 10 min a 3.500 rpm e 30  $\mu$ L do sobrenadante foram gotejados sobre a superfície do eletrodo de grafite, e o mesmo foi mantido a 50 °C para a secagem da solução. Após secagem, o eletrodo de trabalho foi conectado à célula de três compartimentos contendo uma solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0). A redução eletroquímica foi conduzida por voltametria cíclica numa faixa de potencial de 0 a -1,5 V (vs. Ag/AgCl) e  $v = 50$  mV s<sup>-1</sup>, mediante 10 ciclos de potencial, obtendo o OGRE adsorvido no eletrodo de grafite. Em sequência, o eletrodo foi lavado com em água deionizada e seco com gás nitrogênio ultrapuro.



**Figura 16** – Representação esquemática da metodologia empregada na redução do OG (autoria própria).

### **3.7. Caracterização do OG e do OGRE**

#### **3.7.1. Análise elementar**

A Análise Elementar CHN é uma técnica para determinação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra. Seu funcionamento é baseado no método de Pregl-Dumas (PATTERSON, 1973). Neste método as amostras são sujeitas à combustão em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases resultantes dessa combustão são quantificados em um detector TCD (detector de condutividade térmica). Para isto, o pó de grafite e o óxido de grafite foram levados a um analisador da marca PerkinElmer modelo 2400 Series II CHNS/O.

#### **3.7.2. Espectroscopia no Infravermelho**

A espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR) é baseada nas vibrações dos átomos numa molécula, sendo que um espectro no infravermelho é obtido pela passagem de radiação infravermelha em uma amostra e da determinação da fração de radiação incidente que é absorvida em cada comprimento de onda. Ao absorver essa radiação, as moléculas são excitadas a estados de energia maiores e cada frequência (energia) de absorção presente num espectro no infravermelho corresponde a uma frequência de vibração de uma ligação química da amostra. O espectro no infravermelho aparece como uma série de bandas, em que as posições das bandas podem ser apresentadas em comprimento de onda ( $\mu\text{m}$ ) ou número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e as intensidades das bandas em porcentagem de transmitância (%T) ou absorbância (A). Dessa forma, é possível inferir a composição e os tipos de ligação estão presentes no composto (BARBOSA, 2007).

Amostras do pó de grafite e de OGr foram armazenadas em dessecador para retirada da umidade previamente às medidas. Os espectros no infravermelho foram obtidos em um Espectrofotômetro Shimadzu utilizando pastilha de brometo de potássio. Já os espectros no infravermelho do EG, EG/OG e EG/OGRE foram obtidos em um Espectrofotômetro Two PerkinElmer no modo *ATR* (*Attenuated Total Reflectance*) que analisou a superfície dos

eletrodos por meio do contato dos mesmos com um cristal de seleneto de zinco. Previamente às medidas, os eletrodos foram secos em gás nitrogênio ultrapuro para a retirada de umidade.

### **3.7.3. Caracterização com sonda aniônica**

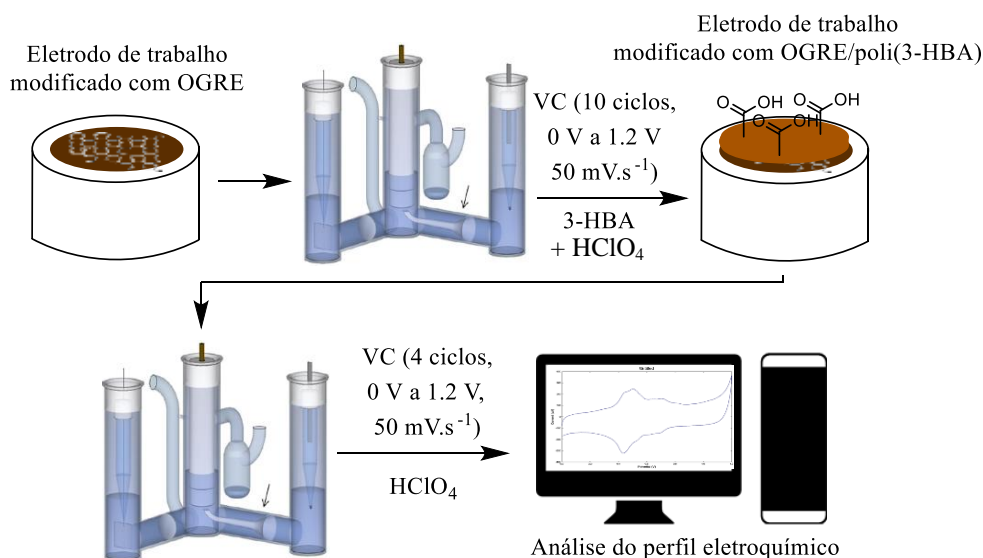
O EG, EG/OG e EG/OGRE foram caracterizados utilizando uma sonda aniônica de ferro/ferricianeto de potássio ( $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$ , 5 mmol L<sup>-1</sup>, contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl). Para tal, foi aplicado um ciclo de voltametria cíclica com o potencial variando de -0,3 a 0,7 V (vs. Ag/AgCl), 50 mV s<sup>-1</sup>.

### **3.7.4. Análises morfológicas**

A fim de verificar as diferenças morfológicas entre o OGr e o pó de grafite, foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (microscópio modelo EVO/MA10, Zeiss) e de microscopia de força atômica (microscópio modelo SPM 9600, Shimadzu), sendo que esta última foi utilizada para avaliar o perfil e espessura das folhas de OGr produzidas. Para isso, 5 µL de soluções 1:1 (m/v) de pó de grafite e óxido de grafeno foram gotejadas sobre uma superfície de mica recém-clivada, secas com gás nitrogênio e levadas ao microscópio.

## **3.8. Eletropolimerização do 3-HBA**

O esquema da Figura 17 representa a eletropolimerização do 3-HBA sobre o EG/OGRE. O eletrodo foi conectado à célula de três compartimentos, sendo submetido a uma VC de 10 ciclos de potencial (0 a 1,2 V vs. Ag/AgCl,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ) em solução monomérica de 3-HBA (2,5 mmol L<sup>-1</sup> em HClO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>). Após a eletropolimerização foram aplicados 4 ciclos de potencial apenas em solução de eletrólito suporte (HClO<sub>4</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>), visando a remoção de monômero residual na superfície do eletrodo e a obtenção do perfil eletroquímico do material formado. Foi obtido também o perfil do eletrodo modificado apenas com poli(3-HBA).



**Figura 17** – Representação esquemática da metodologia empregada na eletropolimerização do 3-HBA (autoria própria).

### 3.9. Caracterização dos eletrodos modificados com filme polimérico

#### 3.9.1. Caracterização eletroquímica

O EG, EG/poli(3-HBA) e EG/OGRE/poli(3-HBA) foram caracterizados utilizando a sonda aniônica de ferro/ferricianeto de potássio, ( $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ , 5 mmol L<sup>-1</sup>, contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl), para tal, foi aplicado um ciclo de voltametria cíclica com o potencial variando de -0,3 a +0,7 V vs. Ag/AgCl,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 3.9.2. Análises morfológicas

O EG, EG/poli(3-HBA) e EG/OGRE/poli(3-HBA) foram caracterizados por microscopia de força atômica e microscopia eletrônica de varredura, visando verificar diferenças na morfologia dos mesmos. As análises de AFM foram feitas no modo dinâmico. Previamente às análises de MEV, os eletrodos foram metalizados com uma fina camada de ouro.

### 3.9.3. Estabilidade do nanocompósito

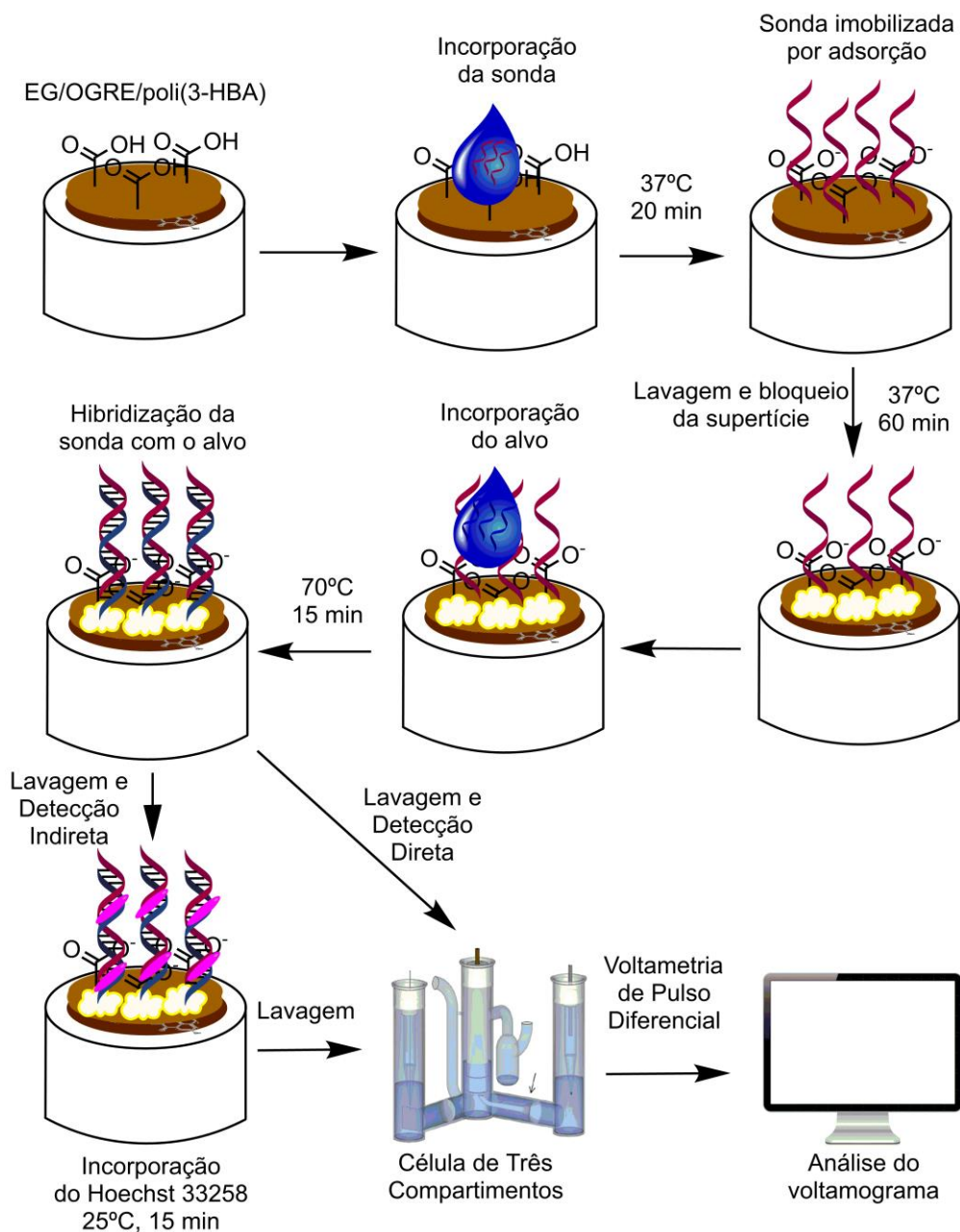
A estabilidade do nanocompósito polimérico foi avaliada estocando-se o EG/OGRE/poli(3-HBA) em uma temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$  e em atmosfera de nitrogênio, visando a avaliação da carga envolvida no processo de oxidação do filme polimérico, por um período de 180 dias, sendo efetuadas análises por voltametria cíclica de 15 em 15 dias (0 a  $+1,2\text{ V}$  vs. Ag/AgCl,  $v = 50\text{ mV s}^{-1}$  em  $\text{HClO}_4\text{ }0,5\text{ mol L}^{-1}$ ).

### 3.9.4. Detecção de oligonucleotídeos imobilizados

Para averiguar a melhora que o nanocompósito representa na imobilização de oligonucleotídeos, em comparação com o eletrodo de grafite e o eletrodo modificado apenas com poli(3-HBA), uma sonda constituída de repetições de guanina e adenina [poli (GA), 5'-GGGGGGGGAAAAAAA-3'] foi imobilizada nas superfícies dos eletrodos por adsorção e detectada por voltametria de pulso diferencial. Para isso, foram gotejados  $15\text{ }\mu\text{L}$  da solução de poli(GA) sobre os eletrodos de trabalho, sendo mantidos em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 min para promover a adsorção do oligonucleotídeo na superfície do eletrodo. Após essa etapa, o eletrodo passou por uma lavagem com  $50\text{ }\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de sódio ( $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4) por três vezes, com o intuito de remover as sondas que não foram completamente adsorvidas. Os eletrodos foram então secos com gás nitrogênio ultrapuro e conectados na célula de três compartimentos. Os picos de oxidação dos resíduos das bases nitrogenadas 8-oxiguanina, guanina e adenina foram monitorados por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial ( $+0,5$  a  $+1,3\text{ V}$  vs. Ag/AgCl,  $v = 20\text{ mV s}^{-1}$ , amplitude  $50\text{ mV}$ , solução tampão fosfato de sódio  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4). A 8-oxiguanina é resultante da oxidação da base nitrogenada guanina, que pode estar presente na amostra dependendo das condições de armazenamento do oligonucleotídeo.

### 3.10. Construção do bioeletrodo e detecção do alvo complementar

A Figura 18 mostra um esquema representativo da metodologia de construção do bioeletrodo e da detecção do alvo complementar.



**Figura 18** - Representação esquemática da metodologia empregada na construção do bioeletrodo e na detecção do alvo complementar (autoria própria).

Sobre os eletrodos de trabalho foram gotejados 15  $\mu\text{L}$  da solução de sonda ALIC1, sendo mantidos em estufa a 37 °C por 20 min para promover a adsorção do oligonucleotídeo na superfície modificada. Após essa etapa, o

eletrodo passou por uma lavagem com 50  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4) por três vezes, com o intuito de retirar as sondas que não foram completamente adsorvidas. Esse processo de lavagem foi o mesmo para as etapas subsequentes. Em seguida, foram gotejados 30  $\mu\text{L}$  de solução de albumina de soro bovino (BSA) sobre os eletrodos, e os mesmos foram incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 60 min. A albumina de soro bovino age como bloqueadora de superfície, impedindo que o alvo a ser adicionado também seja adsorvido na superfície livre do eletrodo. Após o bloqueio, o eletrodo foi novamente lavado para a retirada da BSA em excesso, seco em gás nitrogênio, e 15  $\mu\text{L}$  do oligonucleotídeo alvo (ALIC2) foram gotejados na superfície do eletrodo. O mesmo foi mantido em estufa a  $70^\circ\text{C}$  por 15 min para a hibridização das fitas complementares de oligonucleotídeos. Essa temperatura foi escolhida por ser a temperatura de anelamento da sequência utilizada.

O pico de oxidação do resíduo da base nitrogenada guanina foi monitorado por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial (+0,8 a +1,2 V vs. Ag/AgCl,  $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude 50 mV, solução tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), de forma a detectar diretamente a hibridização entre a sonda e o alvo. Para a detecção indireta, após a secagem do bioeletrodo incorporado com o alvo, foram gotejados sobre o mesmo 15  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de Hoechst 33258 ( $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) e, o eletrodo foi incubado em temperatura ambiente por 15 min, seguido de lavagem e secagem. O pico de oxidação do Hoechst 33258 foi monitorado por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial (+0,3 a +0,7 V vs. Ag/AgCl,  $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude 50 mV, solução tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4 ). O intercalante Hoechst 33258 é adsorvido na superfície do eletrodo, porém possui uma maior afinidade pela dupla fita de DNA, permanecendo em maior quantidade sobre a superfície após a lavagem.

### **3.11. Detecção do DNA genômico de *A. acidoterrestris* presente no lisado celular**

Previamente à detecção eletroquímica, as soluções controle foram incubadas em estufa a  $98^\circ\text{C}$  por 3 min imediatamente antes de serem

utilizadas, visando a desnaturação das fitas de DNA e a obtenção do DNA simples fita (ssDNA), de modo que o material genômico bacteriano esteja disponível para interagir com a sonda na superfície do eletrodo. Concomitantemente, o bioeletrodo com a sonda incorporada foi mantido em estufa a 70 °C, para evitar uma diminuição brusca de temperatura das soluções previamente aquecidas. Em seguida, foram gotejados 15 µL da solução de lisado celular, suco de laranja contaminado, ou da solução de controle negativo, em diferentes eletrodos, para a comparação da resposta eletroquímica. Os eletrodos foram incubados em estufa a 70 °C por 15 min para a hibridização das fitas complementares de oligonucleotídeos. Após esse tempo, a superfície dos eletrodos foi lavada com solução tampão fosfato de sódio e seca com gás nitrogênio ultrapuro. Foram adicionados 15 µL de solução aquosa de Hoechst 33258 ( $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) ao eletrodo e o mesmo foi incubado em temperatura ambiente por 15 min, seguido de lavagem e secagem. O pico de oxidação do Hoechst 33258 foi monitorado por meio da técnica de voltametria de pulso diferencial (+0,3 a +0,7 V vs. Ag/AgCl,  $v = 20$  mV s<sup>-1</sup>, amplitude 50 mV, solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4 ).

### 3.12. Construção da curva de calibração

Para a construção da curva de calibração do biossensor, o lisado celular de *A. acidoterrestris* foi diluído em solução tampão Tris-EDTA nas seguintes diluições: 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000. Uma amostra sem diluição também foi utilizada. A detecção das diluições no bioeletrodo seguiu as etapas exemplificadas no item 3.11. A corrente de pico da oxidação do Hoechst 33258 referente a cada diluição foi utilizada para construção da curva de calibração do bioeletrodo. Utilizando o software Origin® 8, uma curva de calibração foi obtida, relacionando a corrente de pico com o logaritmo da concentração do DNA genômico de *A. acidoterrestris*. Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do bioeletrodo, as seguintes equações foram utilizadas:

$$LD = \frac{3 \cdot \sigma}{S} \quad (Eq. 1) \quad LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \quad (Eq. 2)$$

nas quais  $\sigma$  é o desvio padrão do branco e S o coeficiente angular da reta da curva de calibração.

### **3.13. Avaliação da estabilidade do bioeletrodo**

Para analisar a estabilidade do bioeletrodo, estocou-se os eletrodos modificados com a sonda imobilizada e bloqueados com BSA em uma temperatura de 8 °C e ao abrigo de luz, durante 42 dias, e os eletrodos foram avaliados em intervalos de 7 dias, de acordo com a metodologia do item 3.11. A carga resultante da oxidação do Hoechst 33258 foi utilizada como parâmetro de avaliação da estabilidade do bioeletrodo, sendo a mesma acompanhada durante os dias de experimento.

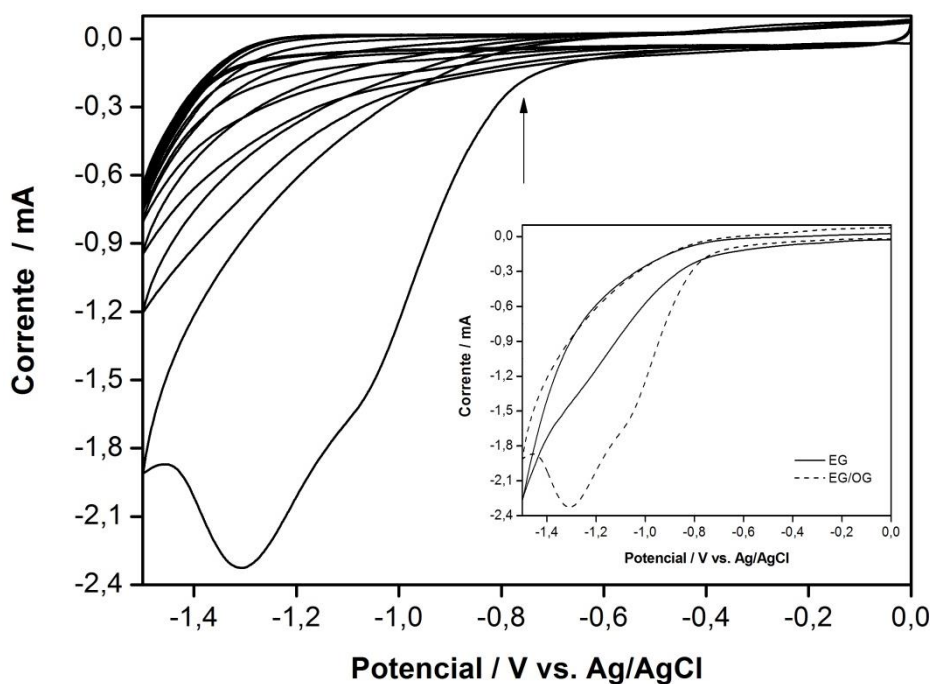
### **3.14. Estatística e tratamento dos dados**

Todos os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em triplicata e os resultados numéricos foram apresentados, sempre que possível, no formato de média aritmética  $\pm$  desvio-padrão. Apenas desvios-padrão inferiores a 10% da média foram considerados aceitáveis. Quando aplicável, os voltamogramas finais foram subtraídos de suas respectivas linhas de base (voltamogramas obtidos nas mesmas condições, em eletrólito suporte). Os picos foram corrigidos pela subtração de uma linha reta tangente à base, alinhados verticalmente e suas características (área e altura) foram calculadas pela ferramenta *Peak Analyzer*, incluída no software Origin® 8. Os valores de corrente de pico ( $I_p$ ) foram obtidos pela altura calculada nos gráficos de corrente por potencial elétrico, e a carga (Q) foi obtida pela área sobre a curva calculada nos gráficos de corrente por tempo. Os voltamogramas, espectros e histogramas foram construídos por meio do software Origin® 8. As microscopias de força atômica foram representadas e analisadas por meio do software Gwyddion® 2.45.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Obtenção do óxido de grafeno reduzido

A Figura 19 apresenta o perfil da redução eletroquímica do óxido de grafeno sobre a superfície do eletrodo de grafite.



**Figura 19** – Voltamograma cíclico do EG/OG em solução de tampão fosfato (0,1 mol L<sup>-1</sup>, 10 ciclos de potencial,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ). No inserto, o primeiro ciclo de potencial de redução, sendo (—) EG e (----) EG/OG. A seta indica o comportamento da corrente ao longo dos ciclos de potencial.

Pode-se observar que o voltamograma referente apenas ao EG não apresenta picos de redução ou de oxidação, já o EG/OG apresenta um pico de redução significativo em -1,3 V, referente à redução dos grupos funcionais do OG (CHNG; PUMERA, 2011). A segunda varredura de potencial não apresenta pico notável, indicando que houve uma reação irreversível e uma diminuição da quantidade dos grupos funcionais durante a primeira varredura de redução. Segundo Chng e Pumera, os grupos hidroxila não são capazes de serem reduzidos eletroquimicamente. Já os grupos epóxido e aldeído são reduzidos na faixa de potencial entre -0,9 a -1,5 V (vs. Ag/AgCl) em meio neutro. Nesse sentido, acredita-se que grande parte dos grupos epóxido do óxido de grafeno foram reduzidos.

## 4.2. Caracterização do OG e do OGRE

### 4.2.1. Análise Elementar

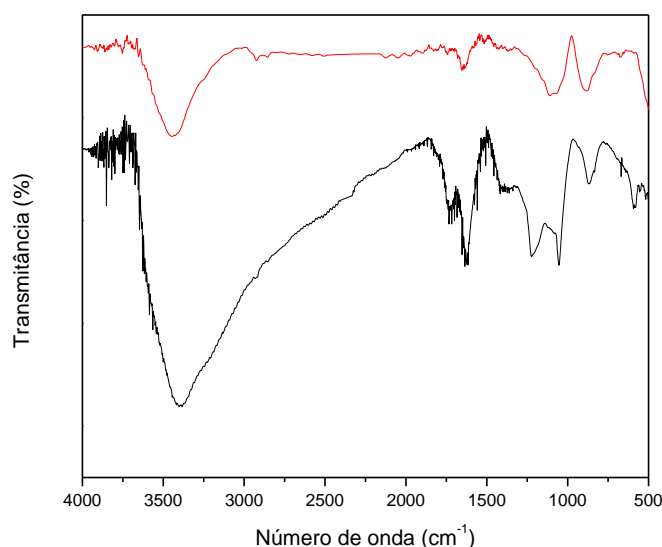
A Tabela 2 apresenta os dados obtidos na análise elementar do pó de grafite e do óxido de grafite. Após a oxidação, observa-se que o percentual de carbono caiu em mais que a metade, e consequentemente o percentual de oxigênio, praticamente inexistente, aumentou. Esses resultados indicam que a oxidação do grafite foi efetiva.

**Tabela 2** – Percentual dos elementos obtidos através da análise elementar do pó de grafite e do óxido de grafite

Composto	%C	%H	%N	%O (por subtração)
Grafite	99,80	0,12	0,05	0,03
Óxido de Grafite	41,80	2,39	0,02	55,79

### 4.2.2. Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros obtidos em pastilha de KBr para o grafite e o OGr evidenciam diferenças significativas após o processo de oxidação, como mostra a Figura 20.



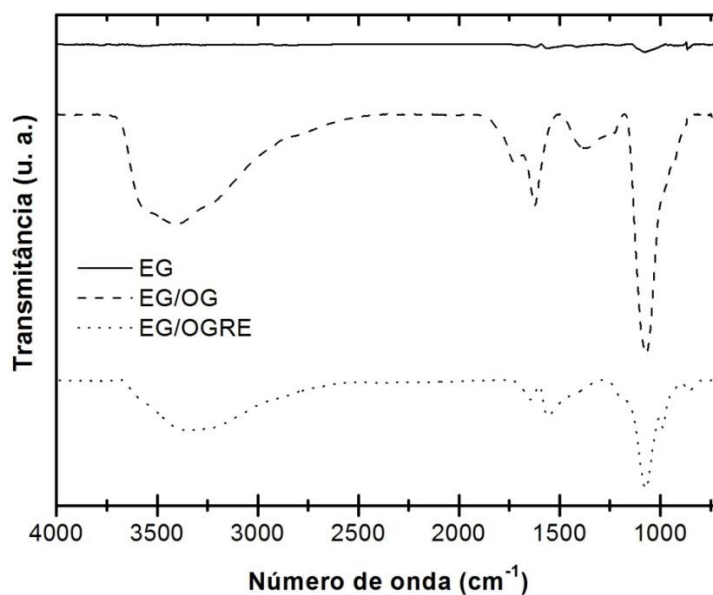
**Figura 20** – Espectros no infravermelho do grafite (—) e do OGr (—).

O espectro FT-IR do grafite mostra uma banda a  $3438\text{ cm}^{-1}$  referente à deformação axial  $\text{-OH}$  e outra a  $1640\text{ cm}^{-1}$  associada à vibração  $\text{-C=C-}$ . Amostras incorporadas em pastilha de KBr geralmente apresentam bandas próximas a  $3438$  e  $1040\text{ cm}^{-1}$  devido à umidade do ar. A banda referente à hidroxila ( $3438\text{ cm}^{-1}$ ) pode estar relacionada à oxidação do grafite com o ar atmosférico ou umidade na amostra (JIN *et al.* 2013). O espectro de FT-IR do óxido de grafite apresenta os picos de absorção a  $1720\text{ cm}^{-1}$  referente à carbonila e  $1620\text{ cm}^{-1}$  de vibração  $\text{-C=C-}$ . Outros picos aparecem a  $1210\text{ cm}^{-1}$  e  $1056\text{ cm}^{-1}$ , referentes à vibração de alcóxidos e epóxidos, respectivamente. Adicionalmente, a banda da hidroxila a  $3400\text{ cm}^{-1}$  é mais intensa e larga, sugerindo a presença de hidroxila de grupos carboxílicos. Esses resultados indicam que houve a oxidação efetiva do grafite. As atribuições aos picos e bandas do grafite e do óxido de grafite estão resumidas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Posição dos picos e bandas de absorção obtida por FT-IR referente ao grafite e ao OGr.

Posição da banda ou pico	Processo atribuído
<b>GRAFITE</b>	
$3438\text{ cm}^{-1}$	$\text{-O-H}$ (hidroxila)
$1640\text{ cm}^{-1}$	$\text{-C=C-}$
<b>ÓXIDO DE GRAFITE</b>	
$3400\text{ cm}^{-1} - 1800\text{ cm}^{-1}$	$\text{-O-H}$ (hidroxila de grupos carboxílicos)
$1720\text{ cm}^{-1}$	$\text{-C=O}$ de carbonila
$1620\text{ cm}^{-1}$	$\text{-C=C-}$
$1210\text{ cm}^{-1}$	C-O-C de alcóxidos
$1056\text{ cm}^{-1}$	$\text{-C-O}$ de epóxidos

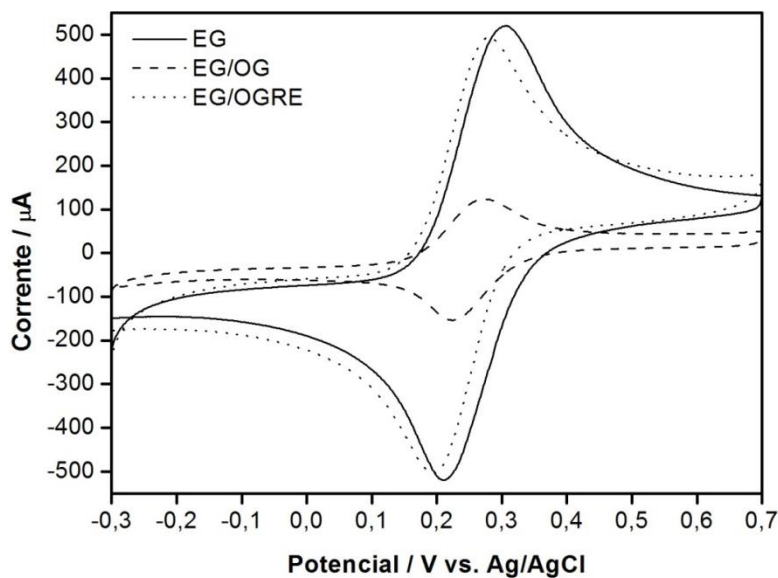
Já os espectros obtidos pelo método *ATR* nos EG, EG/OG e EG/OGRE estão expostos na Figura 21. Pode-se observar diferenças significativas dos espectros após o processo de redução eletroquímica. Os espectros sugerem que houve redução dos grupos carboxilas e epóxidos, uma vez que, houve uma diminuição das bandas de absorção.



**Figura 21** – Espectros no infravermelho do EG (—), EG/OG (-----) e EG/OGRE (.....).

#### 4.2.3. Caracterização com sonda aniônica

O par redox ferro/ferricianeto de potássio é muito utilizado para verificar as propriedades eletrônicas de superfícies eletroativas, devido a sua sensibilidade às cargas da superfície, comportando-se como uma sonda aniônica. A Figura 22 mostra o perfil eletroquímico do EG, EG/OG e EG/OGRE nessa sonda.

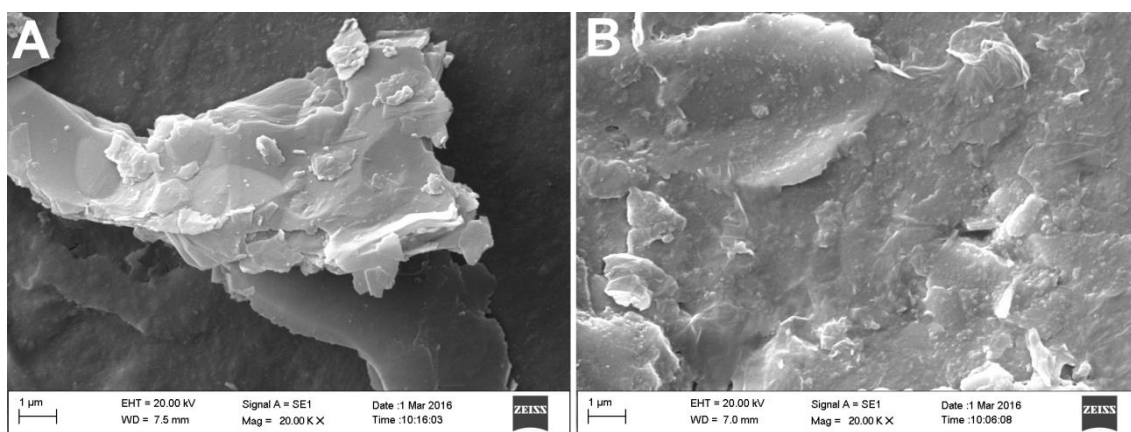


**Figura 22** - Voltamogramas cíclicos em solução aquosa de sonda aniônica ( $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$  5 mmol L<sup>-1</sup> e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de KCl, 50 mV s<sup>-1</sup>. (—) EG, (-----) EG/OG e (.....) EG/OGRE.

Pode-se observar que na presença do OG houve um decaimento das correntes de pico de aproximadamente cinco vezes em relação ao perfil da sonda no EG. Isso se deve ao fato da estrutura do OG apresentar propriedades isolantes, devido à interrupção da  $\pi$  nuvem de elétrons e a presença de grupos funcionais (carboxilato em meio neutro) que promovem a repulsão eletrônica do par redox (LIU *et al.*, 2013). Depois da redução do óxido de grafeno, os valores de corrente aumentam significativamente, indicando que houve aumento da condutividade do material, evidenciando que o OGRE apresenta melhores propriedades eletrônicas do que o OG.

#### 4.2.4. Análises Morfológicas

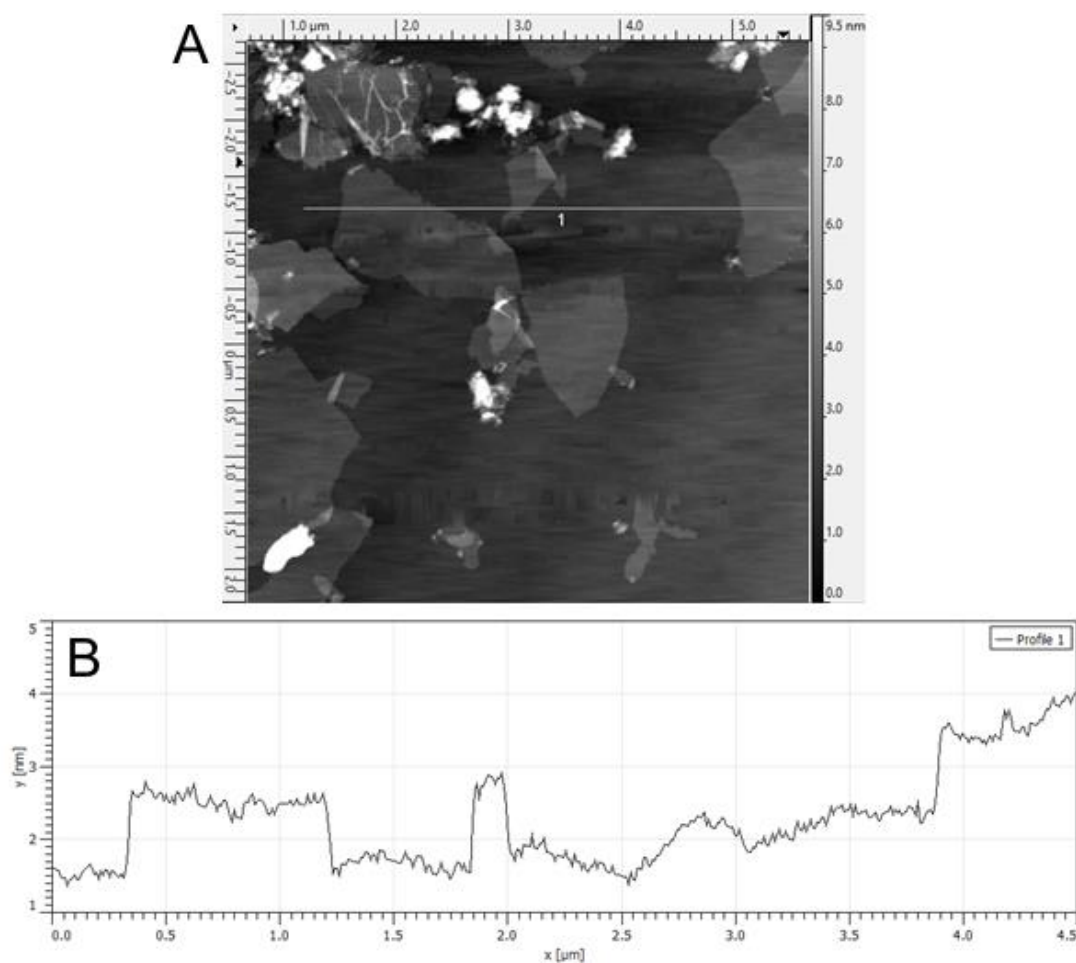
A Figura 23 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura obtidas das superfícies de mica recém-clivadas, na presença do grafite e do óxido de grafeno. Observa-se que o grafite apresenta-se como estruturas esparsas e compactas sobre a mica, porém após a oxidação, as camadas de carbono estão mais bem distribuídas sobre a superfície da mica. É possível dizer então que a oxidação e a esfoliação das folhas de óxido de grafeno foram efetivas.



**Figura 23** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do **(A)** grafite e **(B)** OG sobre placas de mica recém-clivadas.

Já a Figura 24 mostra a imagem de microscopia de força atômica das folhas de óxido de grafeno e seu perfil topográfico. Podemos observar as folhas de OG isoladas na superfície da mica. A espessura média das folhas mostrou-

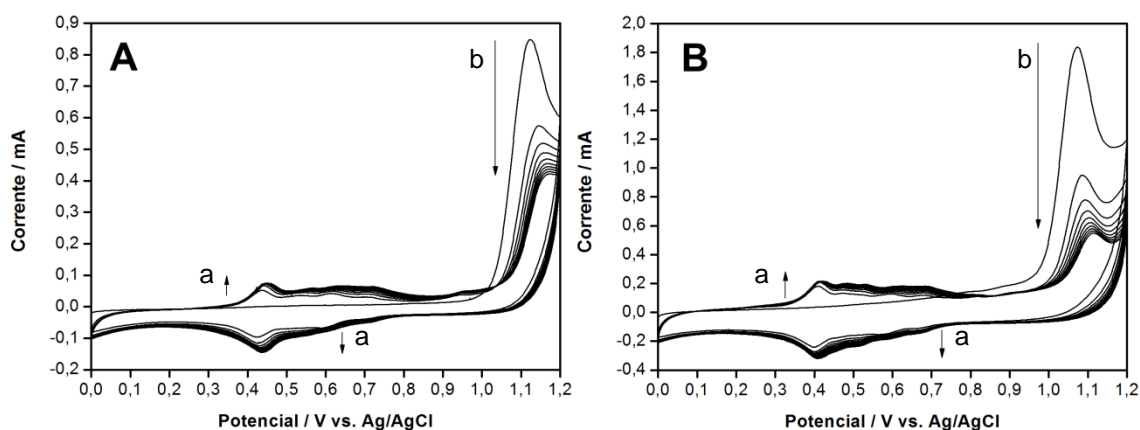
se ser 1,3 nm, que é semelhante a outro estudo (WANG, D. *et al.*, 2010). A espessura teórica de uma única camada de grafeno é de aproximadamente 0,35 nm (GUPTA, 2006). No entanto, espera-se que as folhas de óxido de grafeno sejam mais espessas devido à presença de grupos funcionais contendo oxigênio (ácido carboxílico, carbonila, epóxido e hidroxila) ligeiramente acima e abaixo do plano original de grafeno.



**Figura 24 – (A)** Imagem de microscopia de força atômica das folhas de OG sobre uma placa de mica recém-clivada. **(B)** Perfil das folhas de OG.

### 4.3. Eletropolimerização do 3-HBA

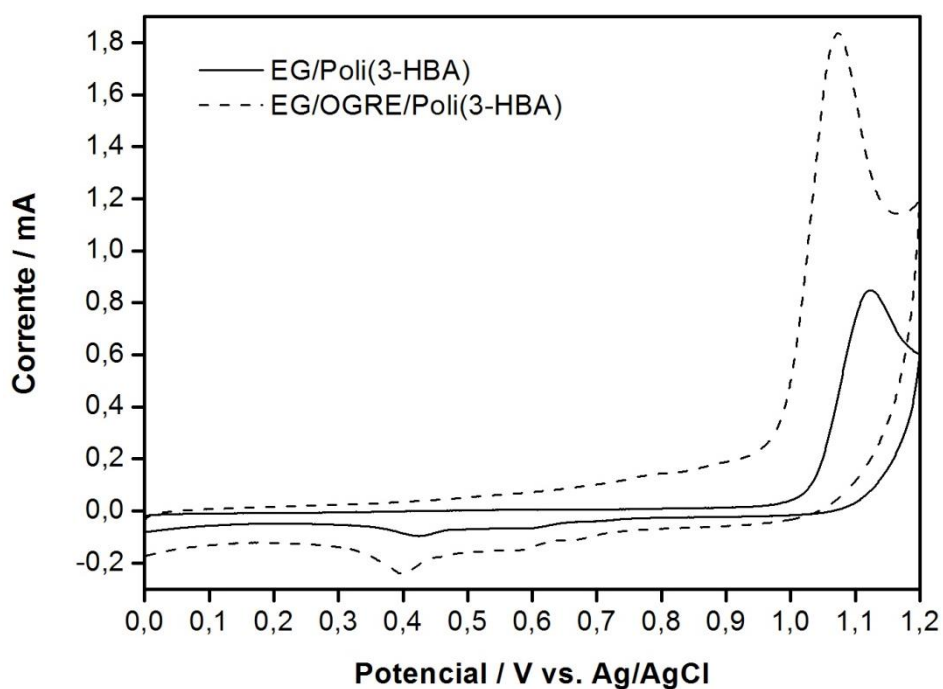
A Figura 25 mostra os voltamogramas resultantes da eletropolimerização do 3-HBA no EG e no EG/OGRE.



**Figura 25** - Voltamogramas cíclicos da eletropolimerização do 3-HBA ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{HClO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 10 ciclos de potencial,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ). Em (A) EG e (B) EG/OGRE. As setas indicam o comportamento da corrente ao longo dos ciclos.

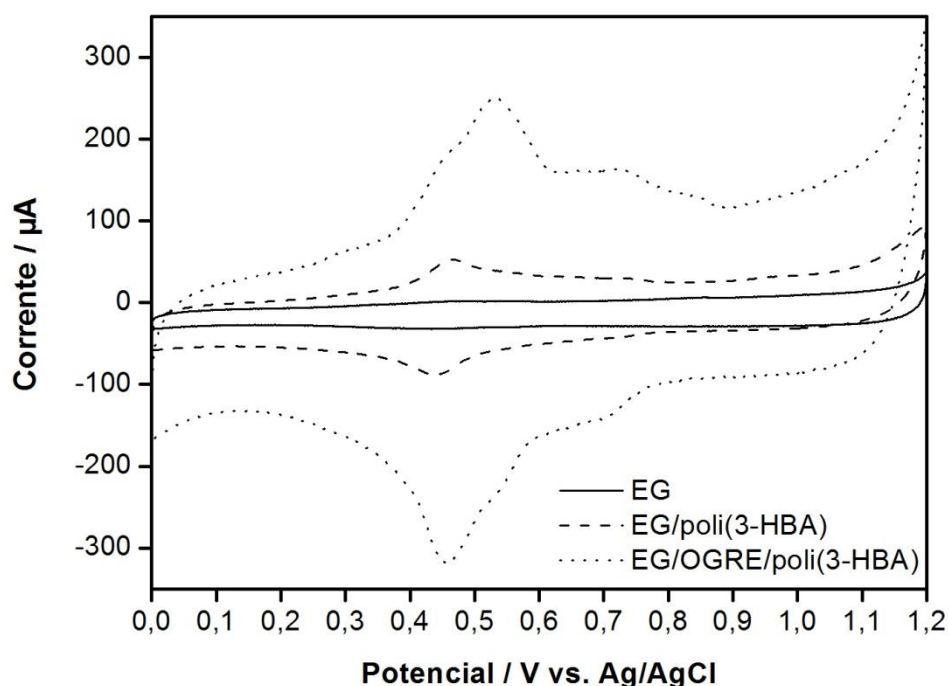
Em ambos os voltamogramas cíclicos, os picos de oxidação e redução do polímero (setas indicadas por “a”) apresentam valores de corrente cada vez maiores com as sucessivas varreduras, confirmando a cobertura da superfície do eletrodo de grafite por um material polimérico eletroativo. Em contrapartida, os picos de oxidação do monômero (setas indicadas por “b”) possuem valores de corrente cada vez menores, o que representa seu consumo.

O eletrodo modificado com OGRE apresenta corrente de pico de oxidação do monômero 2,2 vezes maior do que o eletrodo sem modificação. Além disso, o potencial de oxidação do monômero no eletrodo sem modificação ocorre em  $1,12 \text{ V}$ , já para o eletrodo modificado com OGRE ocorre em  $1,06 \text{ V}$ . Essa diferença de  $60 \text{ mV}$  indica que o nanomaterial facilita a transferência de elétrons no processo de oxidação do monômero. Isto é evidenciado na Figura 26, que compara o primeiro ciclo de eletropolimerização do monômero na presença e na ausência do OGRE. Estes resultados indicam que o OGRE apresenta boas propriedades eletrocatalíticas.



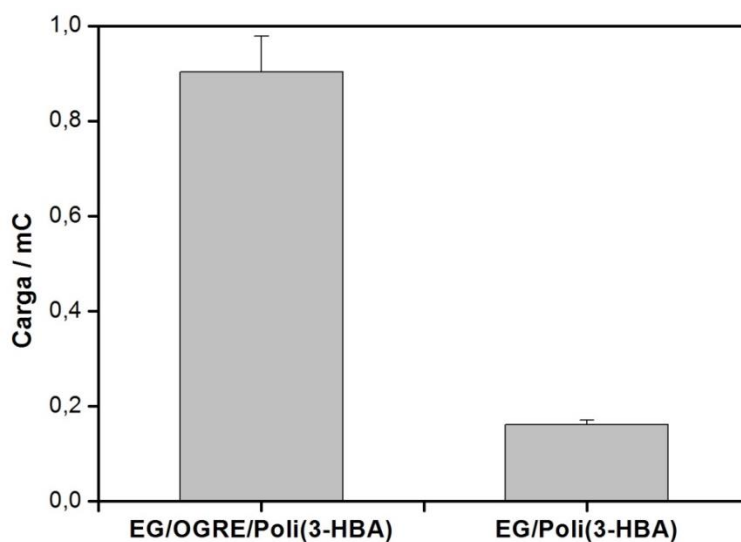
**Figura 26** - Voltamogramas cíclicos do primeiro ciclo de potencial em solução monomérica de 3-HBA ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{HClO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 1 ciclo de potencial,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ). Em (—) EG, e (-----) EG/OGRE.

Visando comparar a quantidade de poli(3-HBA) formado na presença e ausência do nanomaterial nos eletrodos, foi verificado o perfil voltamétrico do EG, EG/poli(3-HBA) e EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução do eletrólito suporte sem a presença do monômero, como mostra a Figura 27.



**Figura 27** - Voltamogramas cíclicos em solução de eletrólito suporte ( $\text{HClO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , 1 ciclo de potencial,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ). Em (—) EG, (-----) EG/poli(3-HBA) e (.....) EG/OGRE/poli(3-HBA).

Pode-se constatar que na presença do OGRE, os picos de oxidação e redução resultantes da eletrodeposição do poli(3-HBA) apresentaram um aumento significativo dos valores de corrente, quando comparados à ausência do nanomaterial. Esse aumento ocorre principalmente nos potenciais onde houve a formação do material polimérico (entre  $+0,3 \text{ V}$  e  $+0,9 \text{ V}$ ) no qual pode-se observar alguns picos de oxidação e de redução convoluídos. Dessa forma, podemos sugerir que o nanomaterial ocasiona um aumento significativo da área superficial do eletrodo. A Figura 28 mostra o gráfico de carga obtido por meio da integração do pico de oxidação do poli(3-HBA) dos voltamogramas da Figura 27. Pode-se observar uma diferença significativa entre o nanocompósito polimérico e o 3-HBA, uma vez que a quantidade de carga para o nanocompósito é cerca de 4,5 vezes maior.

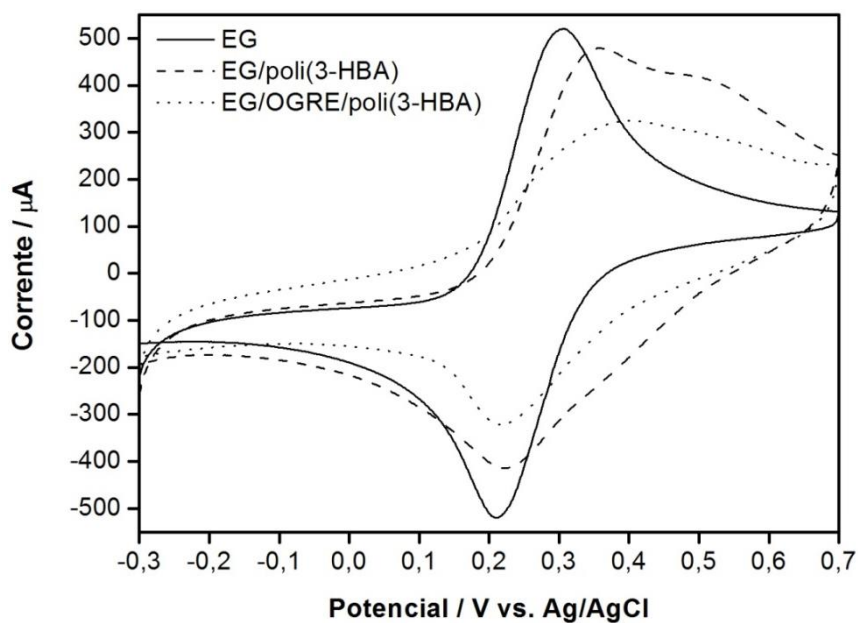


**Figura 28** – Histograma mostrando a carga envolvida no processo de oxidação do EG/OGRE/poli(3-HBA) e do EG/poli(3-HBA)

#### 4.4. Caracterização dos eletrodos modificados com filme polimérico

##### 4.4.1. Caracterização Eletroquímica

A Figura 29 apresenta os voltamogramas resultantes da caracterização dos eletrodos modificados com o poli(3-HBA) na presença da sonda aniônica.

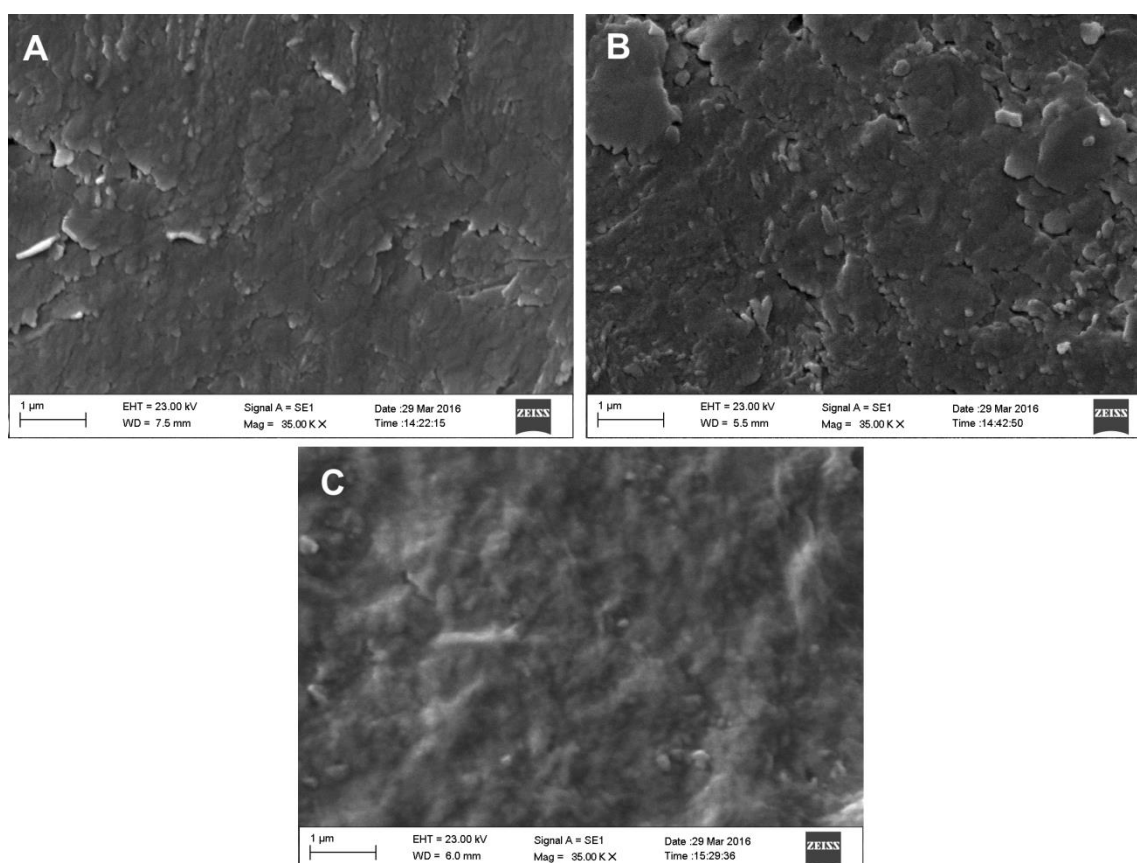


**Figura 29** - Voltamogramas cíclicos em solução aquosa de sonda aniônica ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  5 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  de KCl, 1 ciclo de potencial,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ). Em (—) EG, (-----) EG/poli(3-HBA) e (.....) EG/OGRE/poli(3-HBA).

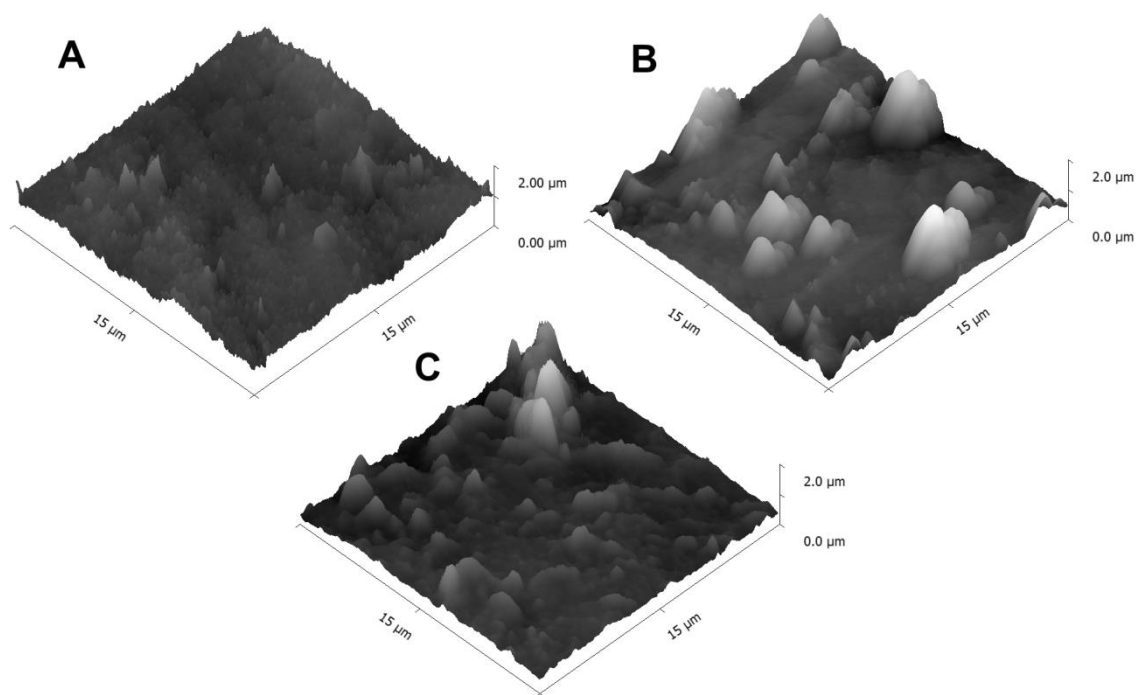
Observa-se que, na presença do EG/poli(3-HBA), há uma queda da corrente em relação ao perfil da sonda no EG. Isso ocorre devido a estrutura do poli(3-HBA) apresentar grupos carboxila livres, que no meio neutro trabalhado estão desprotonados (carboxilato), que promovem uma repulsão da sonda aniônica ferro/ferricianeto (FERREIRA *et al.*, 2011). Como foi discutido anteriormente, o OGRE promove um aumento na quantidade de poli(3-HBA) sobre o eletrodo, resultando também num aumento da quantidade de grupos funcionais. Sendo assim a repulsão é mais pronunciada, promovendo a diminuição dos valores de corrente observados na Figura 29.

#### 4.4.2. Análises morfológicas

A Figura 30 mostra as microscopias eletrônicas de varredura do EG, EG/poli(3-HBA) e do EG/OGRE/poli(3-HBA), enquanto que a Figura 31 mostra as microscopias de força atômica dos mesmos.



**Figura 30** – Microscopias eletrônicas de varredura do EG (A), EG/poli(3-HBA) (B) e EG/OGRE/poli(3-HBA).

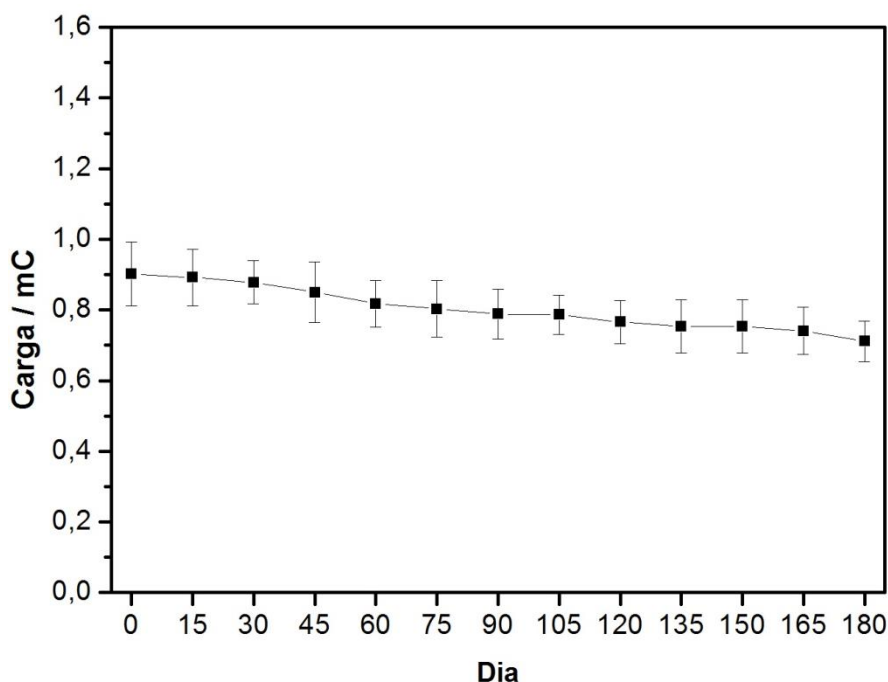


**Figura 31** – Microscopias de força atômica do EG (A), EG/poli(3-HBA) (B) e EG/OGRE/poli(3-HBA).

Podemos observar que o EG mostrou uma superfície rugosa típica, tanto nas imagens MEV como no AFM ( $R_q = 29,8 \text{ nm}$ ). A presença do filme polimérico no EG/poli(3-HBA) levou ao aumento de rugosidade ( $R_q = 39,3 \text{ nm}$ ), sendo possível observar a formação de grandes estruturas globulares, correspondente ao material eletropolimerizado. No entanto, o EG/OGRE/poli(3-HBA) mostrou uma superfície menos rugosa ( $R_q = 32,9 \text{ nm}$ ), provavelmente devido a uma eletrodeposição mais homogênea do polímero. Este resultado permite dizer que o OGRE foi uma matriz mais adequada para a deposição do material polimérico.

#### 4.4.3. Estabilidade do nanocompósito

A Figura 32 apresenta o gráfico referente à estabilidade do nanocompósito, no qual foi avaliada a carga elétrica obtida por meio da integração dos picos de oxidação dos voltamogramas cíclicos dos eletrodos estocados. Podemos notar que em 180 dias o nanocompósito manteve 78% de sua eletroatividade, sendo atrativo para a construção de dispositivos que demandam tempo de estocagem.

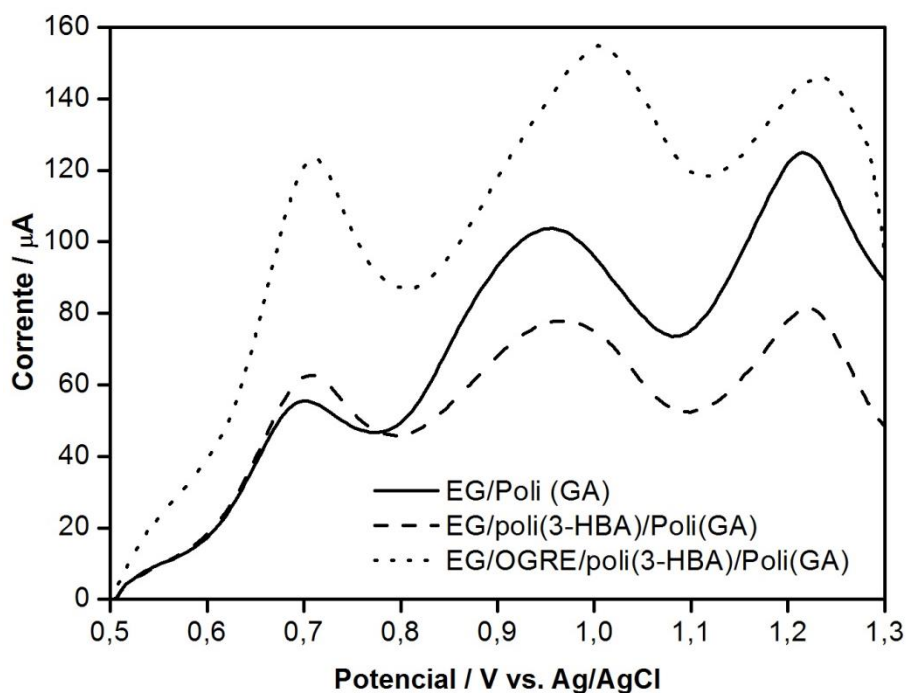


**Figura 32** – Gráfico relacionando a carga do processo de oxidação do nanocompósito com os dias de estocagem.

#### 4.4.4. Detecção de oligonucleotídeos imobilizados

A Figura 33 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial para a imobilização da sonda poli(GA) sobre o EG, EG/poli(3-HBA) e EG/OGRE/poli(3-HBA), em solução tampão fosfato de sódio (pH = 7,4).

Na faixa de potencial investigada três picos de oxidação foram identificados: +0,71, +0,95 e +1,24 V, tratando-se dos picos de oxidação dos resíduos de 8-oxiguanina, guanina e adenina, respectivamente (OLIVEIRA-BRETT *et al.*, 2004). A Tabela 4 mostra os valores de corrente de pico de oxidação de cada base nitrogenada nas diferentes plataformas, mostrando que os valores de corrente para a oxidação da 8-oxiguanina e da guanina foram maiores no EG/OGRE/poli(3-HBA) do que para o EG e EG/poli(3-HBA). Portanto, a presença combinada do nanomaterial e poli(3-HBA) forneceu um suporte mais adequado para a oxidação das bases nitrogenadas que oxidam em menores potenciais, o que indica uma melhora da imobilização dos oligonucleotídeos. Sendo assim, optou-se por monitorar o pico de oxidação da guanina para a detecção direta.



**Figura 33** – Voltamogramas de pulso diferencial dos eletrodos, com a sonda poli(GA) incorporada, em solução de tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} = 7,4$ ,  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude  $50 \text{ mV}$ ). Em (—) EG, (-----) EG/poli(3-HBA) e (.....) EG/OGRE/poli(3-HBA).

**Tabela 4** – Valores de corrente de pico de oxidação das bases nitrogenadas do DNA nas diferentes plataformas. Em negrito os maiores valores de corrente.

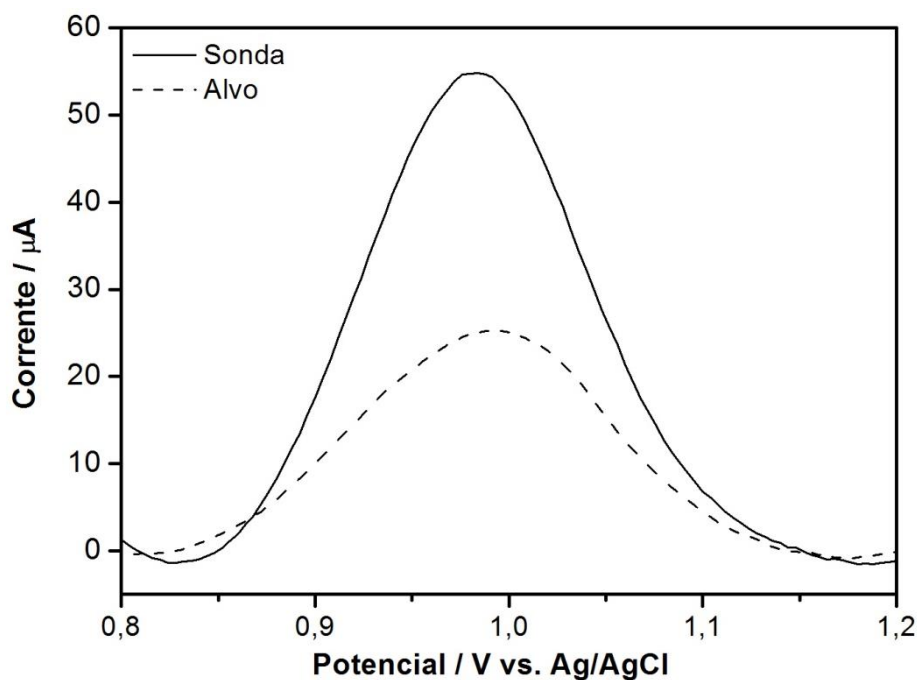
Plataforma/Base Nitrogenada	8-Oxiguanina	Guanina	Adenina
EG	$31 \pm 2,4 \text{ } \mu\text{A}$	$29 \pm 1,9 \text{ } \mu\text{A}$	$31 \pm 1,5 \text{ } \mu\text{A}$
EG/poli(3-HBA)	$23 \pm 1,8 \text{ } \mu\text{A}$	$41 \pm 2,6 \text{ } \mu\text{A}$	<b><math>42 \pm 3,6 \text{ } \mu\text{A}</math></b>
EG/OGRE/poli(3-HBA)	<b><math>64 \pm 3,8 \text{ } \mu\text{A}</math></b>	<b><math>50 \pm 3,1 \text{ } \mu\text{A}</math></b>	$30 \pm 2,7 \text{ } \mu\text{A}$

## 4.5. Detecção do alvo complementar

### 4.5.1. Detecção Direta

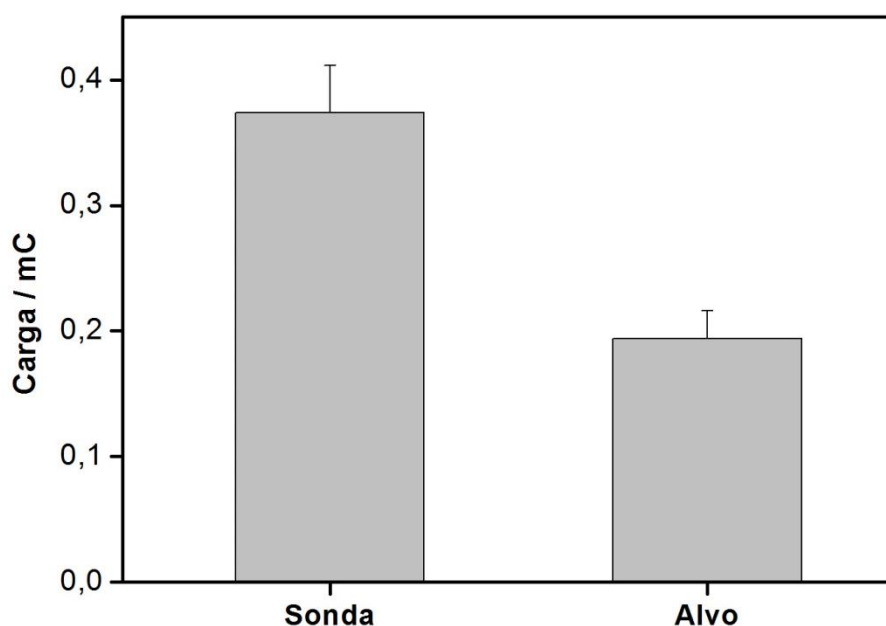
A Figura 34 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ,  $\text{pH} 7,4$ ), referentes à detecção direta do oligonucleotídeo específico para *A. acidoterrestreis*. Foi observada uma diminuição nos valores de corrente do pico de oxidação de aproximadamente 2 vezes após a incubação com o alvo, na região correspondente à oxidação do resíduo da base nitrogenada guanina

(+1,0 V). Esta diminuição caracteriza o processo de hibridização dos oligonucleotídeos complementares, uma vez que a formação das ligações de hidrogênio da dupla hélice dificulta a oxidação dos resíduos de bases nitrogenadas presentes nos oligonucleotídeos, resultando em uma diminuição dos valores de corrente. Além disso, a dupla fita de DNA é mais rígida que a simples fita, fazendo com que a última se mantenha mais próxima do eletrodo, o que facilita ainda mais sua oxidação. (SILVA. *et al.*, 2008).



**Figura 34** – Voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4,  $\nu = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude 50 mV), Em (—) apenas na presença da sonda ALIC1 e em (-----) sonda hibridizada com o alvo ALIC2.

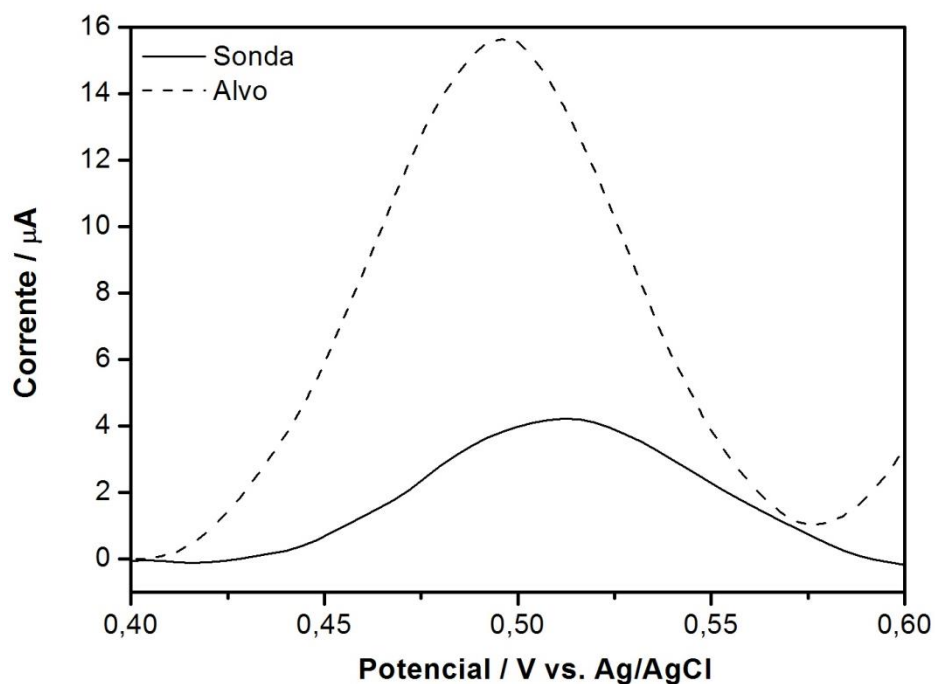
A Figura 35 mostra o gráfico de carga obtido através da integração do gráfico da Figura 34, no qual também fica evidente a diferença de carga entre a sonda e o alvo, demonstrando a detecção do último.



**Figura 35** – Histogramas mostrando a carga envolvida no processo de oxidação do resíduo da base nitrogenada guanina, referente aos voltamogramas da Figura 34.

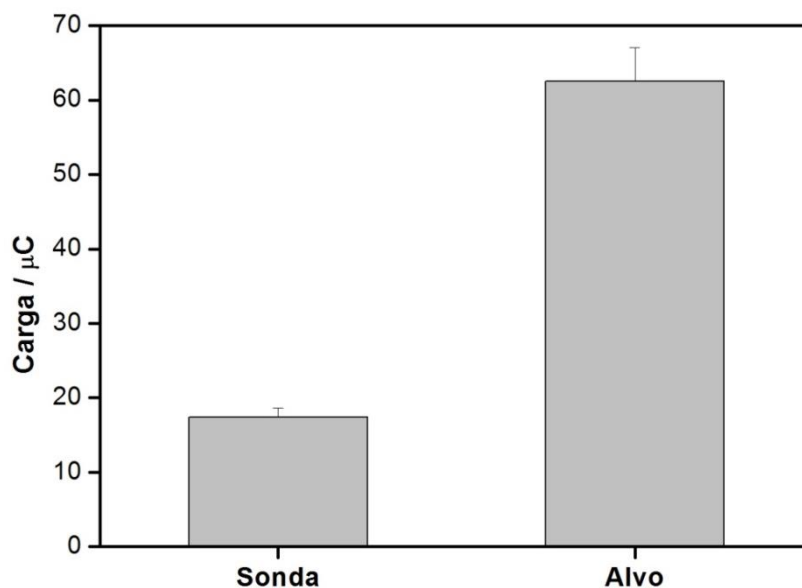
#### 4.5.2. Detecção Indireta

A Figura 36 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), referentes à detecção indireta do oligonucleotídeo específico para *A. acidoterrestris*, na presença do intercalante Hoechst 33258. Foi observado um aumento nos valores de corrente de pico de 3,6 vezes na região correspondente à oxidação do indicador Hoechst 33258, após a incubação com o alvo, em comparação com a sonda. Como o indicador utilizado possui afinidade pela dupla fita de DNA, o mesmo ficou retido no eletrodo em maiores quantidades mesmo após a lavagem, evidenciando a hibridização e detectando assim a fita complementar. Foi observado um pequeno pico de oxidação na presença apenas da sonda. Isso pode ser devido ao fato do intercalante ficar adsorvido na superfície do eletrodo em pequenas quantidades devido à interações fracas com o nanomaterial.



**Figura 36** – Voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio na presença do intercalante Hoechst 33258 ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4,  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude  $50 \text{ mV}$ ). Em (—) apenas na presença da sonda ALIC1 e em (-----) sonda hibridizada com o alvo ALIC2.

A Figura 37 mostra o gráfico de carga obtido por meio da integração do gráfico da Figura 36, no qual também fica evidente a diferença de carga entre a sonda e o alvo, comprovando a detecção do último.



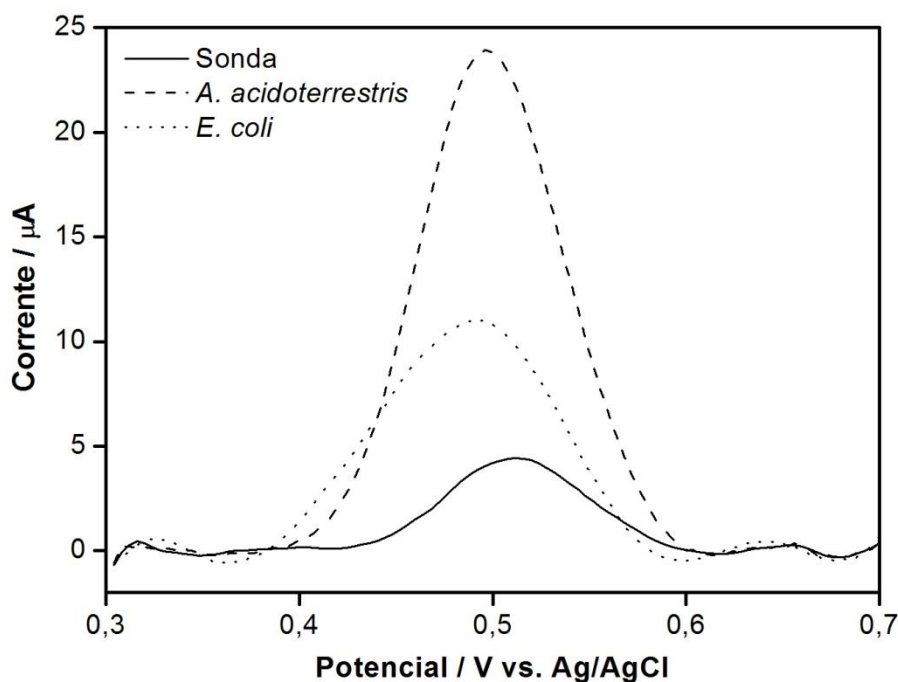
**Figura 37** – Histogramas mostrando a carga envolvida no processo de oxidação do Hoechst 33258, referente aos voltamogramas da Figura 36.

A principal vantagem da detecção indireta em relação à direta é a possibilidade de detecção do alvo complementar em potenciais mais catódicos, evitando a oxidação de possíveis interferentes (componentes presentes no lisado celular ou no suco de laranja). Além disso, a diferença de corrente e de carga entre a sonda e o alvo foi maior quando usado o intercalante Hoechst 33258, comparado com a detecção direta. Dessa forma, para a detecção do DNA genômico e para a construção da curva de calibração foi utilizada a detecção indireta.

## **4.6. Detecção do DNA genômico presente no lisado celular**

### **4.6.1. Detecção em solução tampão**

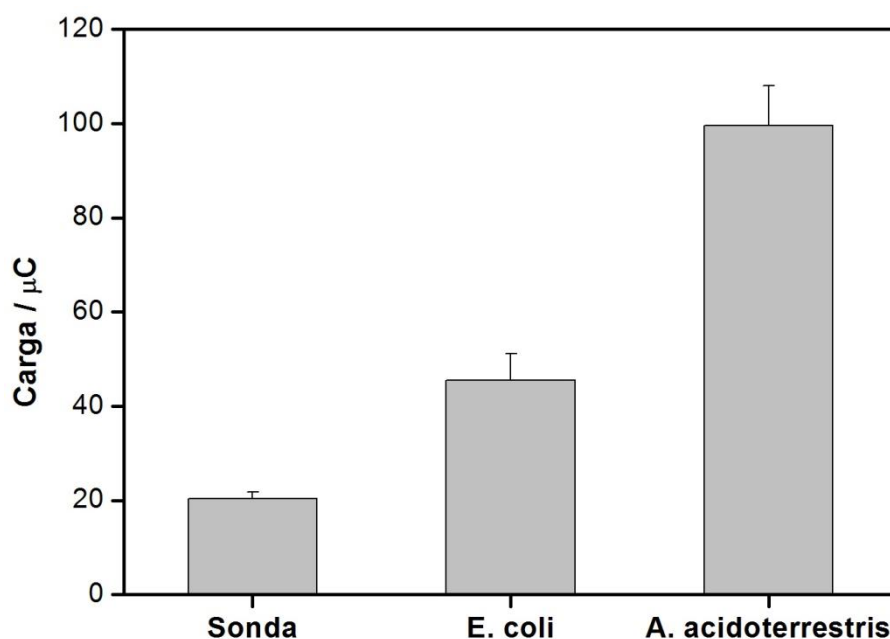
A Figura 38 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4) referentes à detecção indireta do DNA genômico presente no lisado celular de *A. acidoterrestris* e da detecção do DNA genômico de *E. coli*, na presença do intercalante Hoechst 33258. Após a incubação do bioeletrodo com o lisado celular de *A. acidoterrestris*, foi observado um aumento no valor de corrente de pico de 5,5 vezes na região correspondente à oxidação do indicador Hoechst 33258, em comparação com a sonda. Como o indicador utilizado possui afinidade pela dupla fita de DNA, o mesmo atuou como intercalante da mesma sobre a superfície do eletrodo, mesmo após a lavagem, evidenciando a hibridização e detectando o material genético da bactéria. O bioeletrodo também foi capaz de discernir espécies diferentes, uma vez que a corrente de pico de oxidação do intercalante na presença do controle negativo (DNA genômico de *E. coli*) foi em média metade do que com o controle positivo, evidenciando a seletividade do bioeletrodo. O aumento de corrente mesmo na presença do controle negativo pode ser explicado devido à uma possível adsorção de fragmentos de dsDNA à superfície do eletrodo, incorporando o intercalante e dessa forma apresentando o pico de oxidação observado.



**Figura 38** – Voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio na presença do intercalante Hoechst 33258 ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4,  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude  $50 \text{ mV}$ ). Em (—) sonda, (-----) lisado celular de *A. acidoterrestris* e (.....) DNA genômico de *E. coli*.

É possível visualizar que o pico de oxidação do Hoechst 33258 se manteve proeminente e sem grande deslocamento de potencial, sugerindo que a presença dos diversos componentes celulares no lisado não interfere na detecção do DNA genômico. Este fato é de grande apoio para assegurar uma maior simplicidade no processo de detecção, uma vez que este não requisitou uma purificação do DNA genômico da bactéria *A. acidoterrestris*.

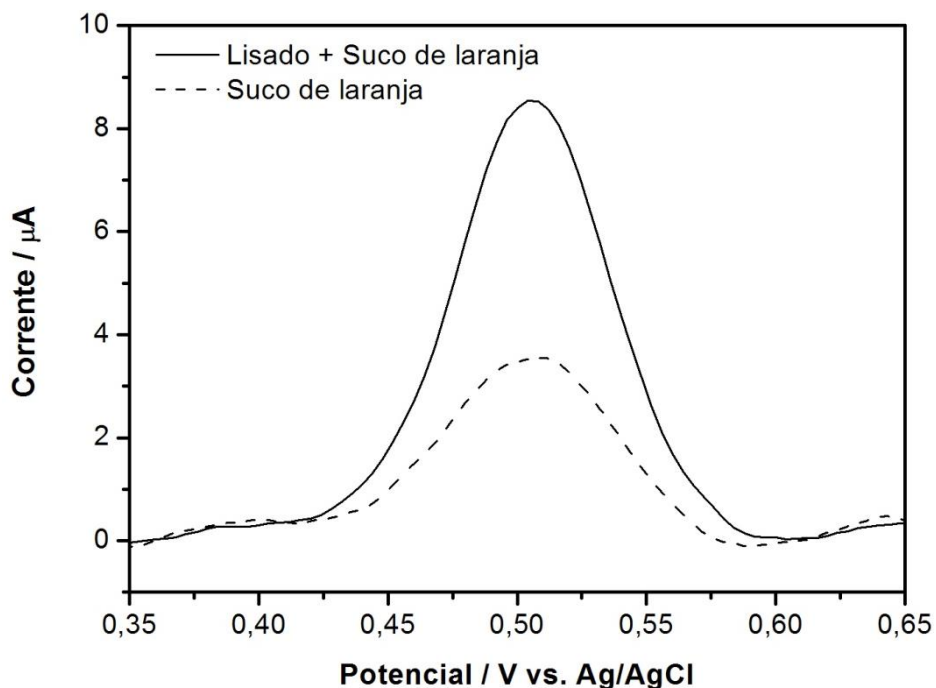
A Figura 39 mostra o gráfico de carga elétrica, obtido por meio da integração do gráfico da Figura 38, no qual também fica evidente a diferença de carga entre a sonda, o alvo e o controle negativo, confirmando a seletividade do bioeletrodo.



**Figura 39** – Histogramas mostrando a carga envolvida no processo de oxidação do Hoechst 33258, referente aos voltamogramas da Figura 38.

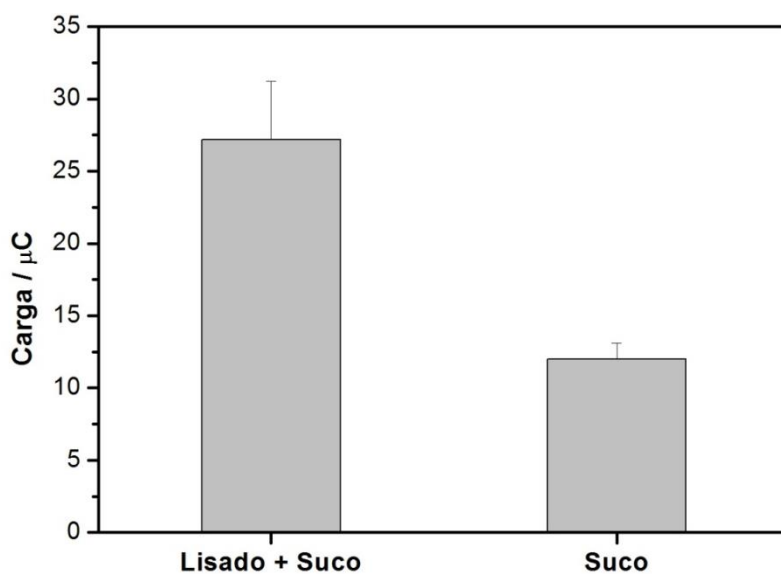
#### 4.6.2. Detecção em suco de laranja

A Figura 40 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), referentes à detecção indireta do DNA genômico presente no suco de laranja artificialmente contaminado com o lisado celular de *A. acidoterrestris*. Nota-se um pico de oxidação do intercalante Hoechst 33258 mais proeminente na presença do lisado celular da bactéria *A. acidoterrestris*, sendo que ele foi em média 2,5 vezes maior do que na presença apenas do suco de laranja estéril. Dessa forma, o bioeletrodo foi capaz de detectar o DNA genômico da bactéria presente no suco, não sendo observada interferência dos componentes da amostra. Houve, no entanto, um decaimento na corrente em comparação à detecção apenas do lisado presente em solução tampão. Isto provavelmente se deve ao fato do lisado celular ter sido diluído no suco de laranja, diminuindo a concentração do DNA genômico presente na amostra.



**Figura 40** – Voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio na presença do intercalante Hoechst 33258 ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4,  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude 50 mV). Em (—) suco de laranja contaminado com o lisado celular e (-----) suco de laranja estéril.

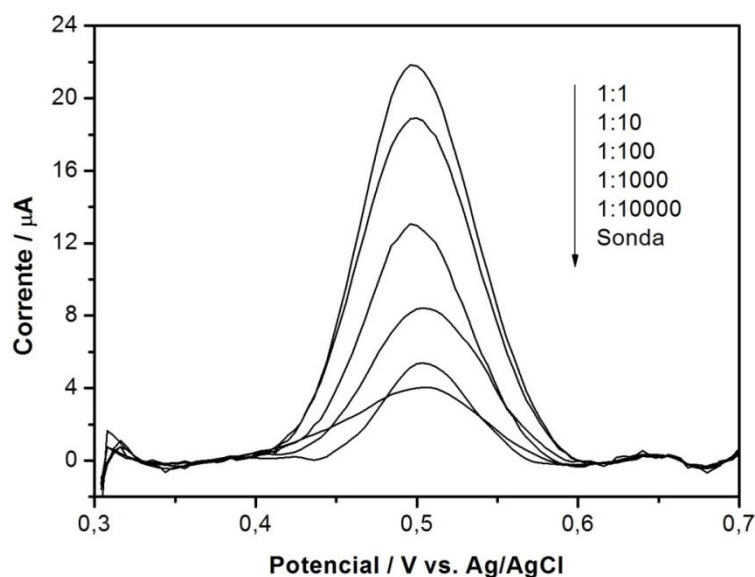
A Figura 41 apresenta o gráfico de carga obtido por meio da integração do gráfico da Figura 40, no qual fica evidente a diferença de carga entre a presença do DNA genômico e sua ausência, comprovando sua detecção em amostra real.



**Figura 41** – Histogramas mostrando a carga envolvida no processo de oxidação do Hoechst 33258, referente aos voltamogramas da Figura 40.

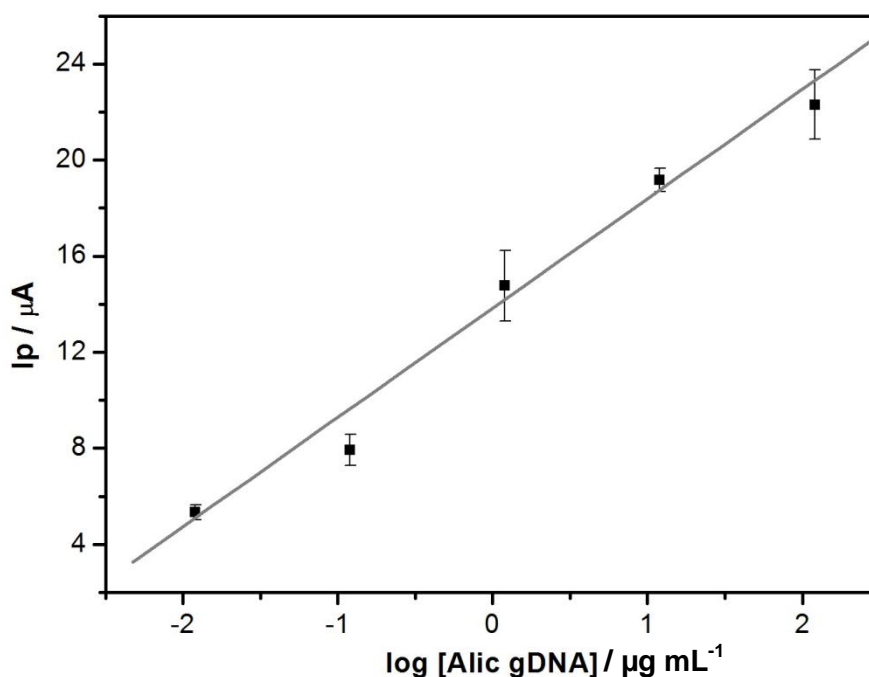
#### 4.7. Curva de calibração

A Figura 42 apresenta os voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4), referentes à detecção indireta do DNA genômico presente no lisado celular de *A. acidoterrestris* em diferentes diluições.



**Figura 42** – Voltamogramas de pulso diferencial do EG/OGRE/poli(3-HBA) em solução tampão fosfato de sódio na presença do intercalante Hoechst 33258 ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4,  $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$ , amplitude  $50 \text{ mV}$ ), na presença de diferentes diluições do lisado celular.

Através de análises de espectroscopia do DNA genômico presente no lisado celular, realizados no espectrofotômetro BioDrop, foi obtida uma concentração de DNA de  $120 \text{ µg mL}^{-1}$  na solução sem diluição, o que possibilitou a obtenção de uma curva de calibração do bioeletrodo na qual a corrente do pico de oxidação do indicador Hoechst 33258 está correlacionada com o logaritmo da concentração do DNA genômico presente nas diluições do lisado celular de *A. acidoterrestris*, apresentado na Figura 43, sendo que as concentrações foram obtidas a partir da divisão da concentração da solução mãe pelas sucessivas diluições.



**Figura 43** – Curva de calibração do bioeletrodo, correlacionando a corrente de pico de oxidação do Hoechst 33258 com o logaritmo da concentração do DNA genômico de *A. acidoterrestris* presente no lisado celular.

Pode-se observar que houve uma diminuição da corrente de pico de oxidação com as subseqüentes diluições da amostra do lisado celular de *A. acidoterrestris*, mostrando que o bioeletrodo responde às variações de concentração, com um coeficiente  $r = 0,993$  e equação da reta  $i_p (\mu A) = 4,55149 \mu A/\mu g.mL^{-1} \times \log[gDNA] \mu g.mL^{-1} + 13,84065 \mu A$ , sendo os limites de detecção e quantificação  $174,38 ng.mL^{-1}$  e  $581,29 ng.mL^{-1}$ , respectivamente. Segue os valores e cálculos:

Desvio Padrão do Branco ( $\sigma$ ) = **0,264575  $\mu A$**

Coeficiente angular da reta (S) = **4,55129  $\mu A/\mu g.mL^{-1}$**

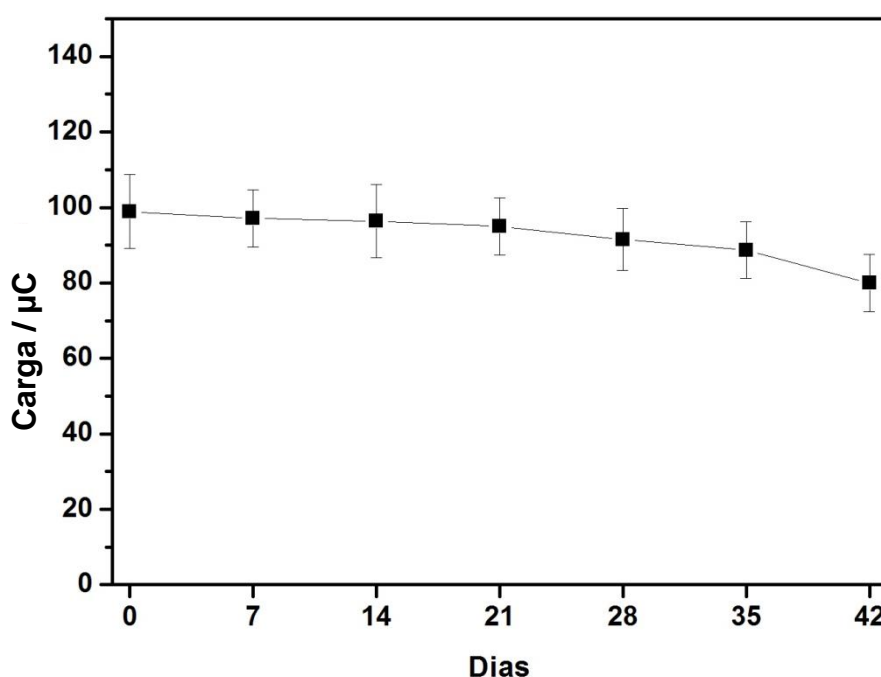
LD =  $(3 \cdot \sigma)/S = (3 \cdot 0,264575 \mu A)/4,55149 \mu A/\mu g.mL^{-1} =$  **0,17438  $\mu g.mL^{-1}$**

LQ =  $(10 \cdot \sigma)/S = (10 \cdot 0,264575 \mu A)/4,55149 \mu A/\mu g.mL^{-1} =$  **0,58129  $\mu g.mL^{-1}$**

#### 4.8. Estabilidade do bioeletrodo

A Figura 44 apresenta o gráfico referente à estabilidade do bioeletrodo. Podemos notar que em 42 dias o bioeletrodo manteve 80% de sua

eletroatividade, sendo que nos primeiros 21 dias a carga manteve-se praticamente constante, decaindo nos dias subsequentes. Contudo, considerando o tempo total (42 dias) e as condições de armazenamento (8°C, a seco, ar atmosférico), bem como a utilização de biomoléculas tais como o DNA e a BSA, sendo a última passível de desnaturação, o biossensor apresentou uma boa resposta. Ao final do quadragésimo-segundo dia, o biossensor ainda foi capaz de reconhecer o alvo em amostras do lisado celular, sugerindo que pode ser adequado para utilização após um período de armazenamento.



**Figura 44** - Gráfico relacionando a carga do processo de oxidação do Hoechst 33258 com os dias de estocagem do bioeletrodo.

## 5. Conclusões

A síntese do OG ocorreu como esperado, e a redução eletroquímica foi efetiva na remoção parcial dos grupos funcionais do nanomaterial, resultando no OGRE. Ficou evidente nas medidas eletroquímicas que o EG/OGRE/poli(3-HBA) apresentou um aumento de resposta de corrente, concluindo-se que o nanomaterial promoveu uma maior formação de filme polimérico quando comparado com o EG sem modificação. Essa maior formação de polímero na superfície do eletrodo contribuiu na melhora da imobilização de oligonucleotídeos.

A sonda ALIC1 foi imobilizada com sucesso na superfície do eletrodo, e o alvo ALIC2 foi detectado de forma direta e indireta, sendo esta última mais eficaz. Dessa maneira, o intercalante Hoechst 33258 foi utilizado com êxito para detecção do DNA genômico da bactéria *A. acidoterrestris* em um lisado celular, sendo que a detecção não foi influenciada pelos componentes do meio. Com esse sistema foi construída uma curva de calibração, com limites de detecção e quantificação na casa de nanogramas por mililitro. Além disso, foi verificado que as análises do genossensor não sofreram interferência na presença do suco de laranja, a amostra real na qual a bactéria está presente, estando apto para uso durante a cadeia produtora do suco. Visto a ausência da descrição de outros bioeletrodos para detecção eletroquímica do DNA genômico de *A. acidoterrestris* na literatura científica, o presente bioeletrodo apresenta-se como a primeira plataforma adequada para atuar como biossensor eletroquímico para detecção de *A. acidoterrestris*.

O desenvolvimento desta plataforma baseada em óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente e poli(ácido 3-hidroxibenzóico) é uma contribuição valiosa para os trabalhos já desenvolvidos com filmes poliméricos pelo nosso grupo de pesquisa, podendo ter outras aplicações para detecção de outros analitos. O estudo de novos nanomateriais e plataformas sensíveis é imprescindível no desenvolvimento de novos biossensores, uma vez que as análises são realizadas com quantidades muito reduzidas de amostras biológicas, ampliando ainda mais as possibilidades de aplicação desses dispositivos que vêm revolucionando a biotecnologia.

## Referências

ALVES-BALVEDI, R. P.; CAETANO, L. P.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genossensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 85, p. 226-31, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.05.016>

ALZAHIRANI, A. Z. Structural and Electronic Properties of Graphene upon Molecular Adsorption: DFT Comparative Analysis. In: GONG, J. **Graphene Simulation**, Cidade: Rijeka, Croácia. Editora: In tech, p. 24-25. ISBN 9789533075563, 2011

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho**: na caracterização de compostos orgânicos, Cidade: Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Editora UFV, p. 27-28, ISBN 9788572692809, 2007

BREUSEGEM, S. Y.; LOONTIENS, F. G.; REGENFUSS, P.; CLEGG, R. M. Kinetics of binding of Hoechst dyes to DNA studied by stopped-flow fluorescence techniques. **Methods in Enzymology**, v. 340, p. 212-33, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)40424-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)40424-1)

BUMBUDSANPHAROKKE, N.; KO, S. Nano-Food Packaging: An Overview of Market, Migration Research, and Safety Regulations. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 5, p. R910-R923, 2015. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12861>

BUSTO, N.; CANO, B.; TEJIDO, R.; BIVER, T.; LEAL, J. M.; VENTURINI, M.; SECCO, F.; GARCIA, B. Aggregation features and fluorescence of Hoechst 33258. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 13, p. 4575-81, 2015. <https://doi.org/10.1021/jp512306c>

CAI, R.; YUAN, Y.; WANG, Z.; GUO, C.; LIU, B.; PAN, C.; LIU, L.; YUE, T. Effects of preservatives on Alicyclobacillus acidoterrestris growth and guaiacol

production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 214, p. 145-150, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.013>

CASTRO, A. C. H.; FRANCA, E. G.; DE PAULA, L. F.; SOARES, M. M. C. N.; GOULART, L. R.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Applied Surface Science**, v. 314, p. 273-279, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.084>

CERNY, G.; HENNLICH, W.; PORALLA, K. Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganisms. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 179, n. 3, p. 224-7, 1984.

CHANG, S. S.; PARK, S. H.; KANG, D. H. Development of novel agar media for isolating guaiacol producing *Alicyclobacillus* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 1-6, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.015>

CHILLAWAR, R. R.; TADI, K. K.; MOTGHARE, R. V. Voltammetric techniques at chemically modified electrodes. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 399-418, 2015. <https://doi.org/10.1134/S1061934815040152>

CHNG, E. L.; PUMERA, M. Solid-state electrochemistry of graphene oxides: absolute quantification of reducible groups using voltammetry. **Chemistry – An Asian Journal**, v. 6, n. 11, p. 2899-901, 2011. <https://doi.org/10.1002/asia.201100464>

CITRUSBR (Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos). Disponível em: <http://www.citrusbr.com/analisesetorial/?as=04>. Acesso em: 01/06/2017

CROWLEY, C.; BIRCHALL, M.; SEIFALIAN, A. M. Trachea transplantation: from laboratory to patient. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 4, p. 357-367, 2015. <https://doi.org/10.1002/term.1847>

DA SILVA, J. V.; MADURRO, A. G. B.; MADURRO, J. M. Modified electrode with reduced graphene oxide/poly(3-hydroxyphenylacetic acid): a new platform for oligonucleotide hybridization. **Journal of Solid State Electrochemistry**, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3601-8>

DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 228-40, 2010. <https://doi.org/10.1039/B917103G>

EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R.; FUNES-HUACCA, M. E.; ALBERICE, J. V.; CARRILHO, E.; SPINOLA MACHADO, S. A.; AVACA, L. A. Sequence-specific electrochemical detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* DNA using electroconductive polymer-modified fluorine tin oxide electrodes. **Analyst**, v. 134, n. 2, p. 314-9, 2009. <https://doi.org/10.1039/B809080G>

FEBBRAIO, F.; MERONE, L.; CETRANGOLO, G. P.; ROSSI, M.; NUCCI, R.; MANCO, G. Thermostable Esterase 2 from *Alicyclobacillus acidocaldarius* as Biosensor for the Detection of Organophosphate Pesticides. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 5, p. 1530-1536, 2011. <https://doi.org/10.1021/ac102025z>

FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Microbial mutagenic effects of the DNA minor groove binder pibenzimol (Hoechst 33258) and a series of mustard analogues. **Mutation Research**, v. 329, n. 1, p. 19-27, 1995. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00013-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00013-9)

FERREIRA, D. C.; RODRIGUES, L. P.; MADURRO, J. M.; MADURRO, A. G. B.; DE OLIVEIRA, R. T. S.; ABRAHAO, O. Graphite Electrodes Modified with poly(3-hydroxybenzoic acid) for Oligonucleotides Sensors. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 9, n. 11, p. 6246-6257, 2014.

FERREIRA, L. F.; SOUZA, L. M.; FRANCO, D. L.; CASTRO, A. C. H.; OLIVEIRA, A. A.; BOODTS, J. F. C.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid.

**Materials Chemistry and Physics**, v. 129, n. 1-2, p. 46-52, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.03.053>

FRANCO, D. L.; AFONSO, A. S.; VIEIRA, S. N.; FERREIRA, L. F.; GONÇALVES, R. A.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 107, n. 2-3, p. 404-409, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.08.006>

GONG, Q. J.; YANG, H. Y.; DONG, Y. Y.; ZHANG, W. C. A sensitive impedimetric DNA biosensor for the determination of the HIV gene based on electrochemically reduced graphene oxide. **Analytical Methods**, v. 7, n. 6, p. 2554-2562, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5AY00111K>

GUPTA, A. C., G.; JOSHI, P.; TADIGADAPA, S.; EKLUND, P.C. Raman Scattering from High-Frequency Phonons in Supported n-Graphene Layer Films. **Nano Letters**, v. 6, n. 12, p. 7, 2006. <https://doi.org/10.1021/nl061420a>

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction. **Materials Science and Engineering: C**, v. 61, p. 1002-17, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.020>

HOROZOVA, E.; DODEVSKA, T.; DIMCHEVA, N. Modified graphites: application to the development of enzyme-based amperometric biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 2, p. 260-4, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2008.09.003>

HUANG, H. Y.; BAI, W. Q.; DONG, C. X.; GUO, R.; LIU, Z. H. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for human papillomavirus DNA detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 68, p. 442-446, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.01.039>

HUANG, X. C.; YUAN, Y. H.; GUO, C. F.; GEKAS, V.; YUE, T. L. Alicyclobacillus in the Fruit Juice Industry: Spoilage, Detection, and Prevention/Control. **Food Reviews International**, v. 31, n. 2, p. 91-124, 2015. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.974266>

HUNNIGER, T.; FELBINGER, C.; WESSELS, H.; MAST, S.; HOFFMANN, A.; SCHEFER, A.; MARTLBAUER, E.; PASCHKE-KRATZIN, A.; FISCHER, M. Food Targeting: A Real-Time PCR Assay Targeting 16S rDNA for Direct Quantification of Alicyclobacillus spp. Spores after Aptamer-Based Enrichment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 17, p. 4291-4296, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00874>

HUNNIGER, T.; FISCHER, C.; WESSELS, H.; HOFFMANN, A.; PASCHKE-KRATZIN, A.; HAASE, I.; FISCHER, M. Food Sensing: Selection and Characterization of DNA Aptamers to Alicyclobacillus Spores for Trapping and Detection from Orange Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 2189-2197, 2015. <https://doi.org/10.1021/jf505996m>

IDUMAH, C. I.; HASSAN, A.; AFFAM, A. C. A review of recent developments in flammability of polymer nanocomposites. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 31, n. 2, p. 149-177, 2015. <https://doi.org/10.1515/revce-2014-0038>

IZADI, Z.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; ENSAFI, A. A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for Bacillus cereus detection in milk and infant formula. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 80, p. 582-9, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.02.032>

JIN, Y.; JIA, M.; ZHANG, M.; WEN, Q. Preparation of stable aqueous dispersion of graphene nanosheets and their electrochemical capacitive properties, **Applied Surface Science**, v. 265, p. 787-793, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.10.130>

KOBAYASHI, M.; KUSAKAWA, T.; SAITO, M.; KAJI, S.; OOMURA, M.; IWABUCHI, S.; MORITA, Y.; HASAN, Q.; TAMIYA, E. Electrochemical DNA

quantification based on aggregation induced by Hoechst 33258. **Electrochemistry Communications**, v. 6, n. 4, p. 337-343, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2004.01.012>

LEE, S. B.; LEE, S. M.; PARK, N. I.; LEE, S.; CHUNG, D. W. Preparation and characterization of conducting polymer nanocomposite with partially reduced graphene oxide. **Synthetic Metals**, v. 201, p. 61-66, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2015.01.021>

LIU, A. L.; ZHONG, G. X.; CHEN, J. Y.; WENG, S. H.; HUANG, H. N.; CHEN, W.; LIN, L. Q.; LEI, Y.; FU, F. H.; SUN, Z. L.; LIN, X. H.; LIN, J. H.; YANG, S. Y. A sandwich-type DNA biosensor based on electrochemical co-reduction synthesis of graphene-three dimensional nanostructure gold nanocomposite films. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 50-8, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.049>

MAST, S.; DIETRICH, R.; DIDIER, A.; MARTLBAUER, E. Development of a Polyclonal Antibody-Based Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Spores of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Various Fruit Juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 497-504, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03841>

MERINO, S.; MARTIN, C.; KOSTARELOS, K.; PRATO, M.; VAZQUEZ, E. Nanocomposite Hydrogels: 3D Polymer-Nanoparticle Synergies for On-Demand Drug Delivery. **ACS Nano**, v. 9, n. 5, p. 4686-4697, 2015. <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b01433>

MOHAN, V. B.; BROWN, R.; JAYARAMAN, K.; BHATTACHARYYA, D. Characterisation of reduced graphene oxide: Effects of reduction variables on electrical conductivity. **Materials Science and Engineering: B**, v. 193, p. 49-60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2014.11.002>

MOSES, P. R.; WIER, P.; MURRAY, R. W.; Chemically Modified Tin Oxide Electrode, **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882-1886, 1975  
<https://doi.org/10.1021/ac60362a043>

MURRAY, R. W.; EWING, A. G.; DURST, R. A. Chemically Modified Electrodes: Molecular Design for Electroanalysis. **Analytical Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 379-390, 1987.

NAMBIAR, S.; YEOW, J. T. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1825-32, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.046>

NASIR, A.; KAUSAR, A.; YOUNUS, A. Polymer/Graphite Nanocomposites: Physical Features, Fabrication and Current Relevance. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 7, p. 750-770, 2015.  
<https://doi.org/10.1080/03602559.2014.979503>

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A. P.; SILVA, L. A.; DICULESCU, V. C. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 2, p. 321-329, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.021>

OZEL, R. E.; HAYAT, A.; ANDREESCU, S. Recent Developments in Electrochemical Sensors for the Detection of Neurotransmitters for Applications in Biomedicine. **Analytical Letters**, v. 48, n. 7, p. 1044-1069, 2015.  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2014.976867>

PARK, S.; AN, J.; POTTS, J. R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S.; RUOFF, R. S. Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide. **Carbon**, v. 49, n. 9, p. 3019-3023, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.02.071>

PATTERSON, R. K. Automated Pregl- Dumas Technique for Determining Total Carbon, Hydrogen, and Nitrogen in Atmospheric Aerosols. **Analytical Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 5, 1973. <https://doi.org/10.1021/ac60325a050>

PEREIRA, A. C., SANTOS, A. S., KUBOTA L. T. Tendências em Modificações de Eletrodos Amperométricos para Aplicações Eletroanalíticas, **Química Nova**, v. 25, n. 6, p. 1012-1021, 2002

Protein Data Bank. Disponível em:  
<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=264D>. Acesso em:  
02/06/2017

RAMACHANDRAN, R.; MANI, V.; CHEN, S. M.; KUMAR, G. G.; GOVINDASAMY, M. Recent Developments in Electrode materials and Methods for Pesticide Analysis - An overview. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, n. 1, p. 859-869, 2015.

RAPP, B. E.; GRUHL, F. J.; LANGE, K. Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 6, p. 2403-12, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3906-2>

RATH, T.; KUNDU, P. P. Reduced graphene oxide paper based nanocomposite materials for flexible supercapacitors. **RSC Advances**, v. 5, n. 34, p. 26666-26674, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5RA00563A>

RODOVALHO, V. R. **Desenvolvimento de bioeletrodos para detecção da Proteína C Reativa e do gene MYCN**, Universidade Federal de Uberlândia - Monografia defendida no curso de Bacharelado em Biotecnologia, Cidade: Uberlândia, 64 fls, 2014.

SANVICENS, N.; MANNELLI, I.; SALVADOR, J. P.; VALERA, E.; MARCO, M. P. Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 541-553, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.006>

SILVA, F. B.; VIEIRA, S. N.; GOULART, L. R.; FILHO; BOODTS, J. F.; BRITO-MADURRO, A. G.; MADURRO, J. M. Electrochemical Investigation of oligonucleotide-DNA hybridization on poly(4-methoxyphenethylamine).

**International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1173-88, 2008.  
<https://doi.org/10.3390/ijms9071173>

SILVA, F. V.; TAN, E. K.; FARID, M. Bacterial spore inactivation at 45-65 degrees C using high pressure processing: study of Alicyclobacillus acidoterrestris in orange juice. **Food Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 206-11, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.019>

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6<sup>a</sup> Ed., Cidade: Belmont, Califórnia, EUA. Editora: Thomson Brooks/Cole,. p. 1039-1041. ISBN: 495012017, 2007

SOHRABI, N.; VALIZADEH, A.; FARKHANI, S. M.; AKBARZADEH, A. Basics of DNA biosensors and cancer diagnosis. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 654-63, 2016.  
<https://doi.org/10.3109/21691401.2014.976707>

SUBRAMANI, A.; JACANGELO, J. G. Emerging desalination technologies for water treatment: A critical review. **Water Research**, v. 75, p. 164-187, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.02.032>

TURNER, A. P. Biosensors: sense and sensibility. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 8, p. 3184-96, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35528d>

WANG, D.; LI, Y.; HASIN, P.; WU, Y. Preparation, characterization, and electrocatalytic performance of graphene-methylene blue thin films. **Nano Research**, v. 4, n. 1, p. 124-130, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12274-010-0069-6>

WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics** v. 21, n. 10, p. 1887-92, 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2005.10.027>

WANG, K.; SUN, Z.; FENG, M.; LIU, A.; YANG, S.; CHEN, Y.; LIN, X. Design of a sandwich-mode amperometric biosensor for detection of PML/RARalpha fusion gene using locked nucleic acids on gold electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2870-6, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.11.030>

WANG, Q.; ZHANG, B.; LIN, X.; WENG, W. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosan–mutiwallled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 156, n. 2, p. 599-605, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.02.004>

WITTHUHN, C. R.; SMIT, Y.; CAMERON, M.; VENTER, P. Guaiacol production by Alicyclobacillus and comparison of two guaiacol detection methods. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 700-704, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.050>

YANG, J.; ZHOU, Y.; SUN, L.; ZHAO, N.; ZANG, C.; CHENG, X. Synthesis, characterization and optical property of graphene oxide films. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 12, p. 5056-5060, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.01.105>

ZHAO, H. M.; LI, Z. Q.; LEE, N. Y.; KIM, J. S.; LEE, E. C. Electrochemical DNA detection using Hoechst dyes in microfluidic chips. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 6, p. 1493-1496, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2012.04.023>