



Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Química

Pós-Graduação em Química

**Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção da
hanseníase**

Mestrando: André Santiago Afonso

Orientadora: Profa. Dra. Ana Graci Brito-Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia
Fevereiro de 2008

André Santiago Afonso

Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção da hanseníase.

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química

Orientador. Ana Graci Brito-Madurro.

**Uberlândia – MG
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

A257d Afonso, André Santiago, 1981-
Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção
da hanseníase / André Santiago Afonso. - 2008.
103 f. : il.

Orientador: Ana Graci Brito-Madurro.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

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

CDU: 54



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

ALUNO(A): ANDRÉ SANTIAGO AFONSO

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5061402

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Desenvolvimento de sensor bioeletroquímico para detecção de Hanseníase”

ORIENTADOR:

PROF^a DRA. ANA GRACI BRITO MADURRO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro da Biblioteca, no Campus Santa Mônica, no dia 22 de fevereiro de 2008, às 14:30 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof^a Dra. Ana Graci Brito Madurro

(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Carlos Alberto Oliveira

(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Zeki Naal

(USP)

Ana Graci Brito Madurro
Carlos Alberto de Oliveira
Zeki Naal

Uberlândia, 22 de fevereiro de 2008.

Àqueles que me deram a vida.
Joaquim e Sonia.

Agradecimentos

Por mais uma etapa de um sonho concluído, quero agradecer ao meu Deus pela benção, pelo ânimo de todas as manhãs, por me fazer acreditar que eu posso chegar no meu desejado sonho. Pela vida maravilhosa e por me dar uma família que sempre me apoiou, me dando amor, carinho, coragem e valores incontestáveis.

Agradecer ao meu pai, Joaquim, símbolo de dedicação e perseverança, por proporcionar esse sonho realidade, sem ele não poderia ter dedicado todo o meu tempo exclusivamente a esse trabalho. À minha mãe, Sonia, por ser mãezona, e de sua natureza evocar aquilo que tem de mais mágico, o amor.

À minha irmã, Andréa, sempre esteve disposta em ouvir, as alegrias, conquistas, desejos, sonhos, dificuldades, tristezas e magoas. Vocês ajudaram a construir este valoroso trabalho.

Parceria, companheirismo e paciência. Você me ensinou não só o amor. Deyse obrigado.

Agradeço aos professores Ana Graci Brito-Madurro e João Marcos Madurro, que confiaram no meu trabalho, e pelo crescimento profissional.

A CAPES, FAPEMIG e CNPq por financiarem este trabalho.

Enfim, a todos do laboratório de filmes poliméricos e aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho. Muito Obrigado.

“Para ser grande, sê inteiro...nada de ti aumento ou exclua. Sê todo em cada coisa...põe o máximo que és, no mínimo que fazes. Assim, a lua inteira em cada lago brilha porque alta vive”

Fernando Pessoa.

Lista de abreviaturas e siglas:

4-AF: 4-aminofenol
A: adenina
A: ampère
AM: azul de metileno
ATP: adenosina trifosfato
BL: dimorfa virchowiana
BN: bases nitrogenadas
BT: dimorfa tuberculóide
C: citosina
C: coulombs
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: deoxinucleotídeos trifosfatos
E: emeraldina
E_a: potencial anódico
E_c: potencial catódico
ECS: eletrodo de calomelano saturado
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: enzima imunoensaio
f: frequência
FTIR: infravermelho transformada de Fourier
G: guanina
GTP: guanosina trifosfato
HT: hanseníase tuberculóide.
HV: hanseníase virchowiana.
i_a: corrente anódica
LB: azul de leucometileno
LE: leucoemeraldina
LL: polar lepromatus
MB: multibacilar

MFA: microscopia de força atômica

OMS: Organização Mundial da Saúde

p(4AF): poli 4-aminofenol

PB: paucibacilar

pb: pares de bases

PCR: Reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogênio iônico

PN: pernigranilina

Q: capacitância

R: resistência

RLEP3: Fragmentos lepra específicos - Sequência repetitiva do genoma.

*ds*DNA: double strand DNA (dupla fita DNA)

*ss*DNA: single strand DNA (simples fita DNA)

SSC: tampão citrato de sódio

T: timina

TE: tris edta

TT: polar tuberculóide

V: volts

VC: voltametria cíclica

VPD: voltametria de pulso diferencial

W: linhas de Warburg

WHO: world Health Organization

YSI: Yellow Spring Instruments

Z' : resistência

Z'' : reatância

Sumário:

Introdução	1
Hanseníase	2
Biossensores	10
Aspectos Gerais	10
Biossensor de DNA	14
Filmes poliméricos aplicados a biossensores	18
Filmes condutores e não condutores	20
Filmes formados com 4-aminofenol (4-AF)	23
Técnicas eletroquímicas	25
Voltametria cíclica e pulso diferencial	25
Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	25
Microbalança de Cristal de Quartzo	26
Objetivos	27
Objetivo geral	27
Objetivos específicos	27
Parte experimental	27
Metodologia	31
Pré-tratamento dos eletrodos	31
Prepara das soluções utilizadas	31
Voltametria cíclica e Voltametria de pulso diferencial	32
Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo (MECQ)	33
Determinação da massa depositada de poli(4-aminofenol)	33
Estabilidade térmica do poli(4-aminofenol)	34
Espectroscopia de infravermelho	34
Espectroscopia de impedância eletroquímica	35
Microscopia de força atômica	35
Dosagem do DNA	35
Análise molecular de gene específico para hanseníase	35
Imobilização e detecção de bases nitrogenadas	36

Imobilização e detecção de RLEP3	37
Imobilização da simples fita do DNA	37
Hibridização do alvo complementar e não complementar do DNA.....	37
Tempo de vida do biossensor	38
Resumo do procedimento utilizado na construção do biossensor	39
Resultados e discussão	40
Estudos de formação de poli(4-aminofenol)	40
Determinação da massa de poli(4-aminofenol)	44
Determinação da massa do poli(4aminofenol) utilizando MECQ	44
Estabilidade térmica de poli(4-aminofenol)	47
Estudos de espectroscopia de infravermelho do poli(4-aminofenol)	49
Imobilização e detecção de bases nitrogenadas.....	51
Imobilização e detecção de produtos de PCR	54
Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	57
Análises de microscopia de força atômica	60
Detecção de produtos de PCR utilizando-se indicadores	61
Detecção de produtos de PCR utilizando ferrocenocarboxaldeído	61
Detecção de produtos de PCR utilizando-se azul de metileno como indicador	66
Tempo de vida do biossensor	70
Conclusões.....	71
Referências Bibliográficas.....	73

Listas de Figuras:

Figura 1. Mortalidade proporcional por causas definidas, segundo as regiões	2
Figura 2. Aparência de uma pessoa com hanseníase.....	3
Figura 3. Classificação Ridley e Jopling baseada na resposta imunológica do hospedeiro. TT polar tuberculóide, BT: dimorfa tuberculóide, BB: dimorfa ou borderline, BL: dimorfa virchowiana, LL: polar lepromatus ou virchowiana	5
Figura 4. Número de casos detectados mundialmente referentes ao período de 2001 a 2006.....	7
Figura 5. Taxa de prevalência no Brasil, referente ao ano de 2004	9
Figura 6. Esquema das gerações dos biossensores. 1: primeira geração; 2: segunda geração e 3: terceira geração. M: mediador reduzido. M [‡] : mediador oxidado.	11
Figura 7. Configuração de um glicosímetro da YSI.....	12
Figura 8. Terceira geração de biossensores.....	14
Figura 9: Detecção específica de uma sequência de DNA usando um biossensor.	15
Figura 10. Biossensor eletroquímico de DNA baseado na reação redox entre Co(bpy) ₃ ³⁺ e resíduos de guanina.	16
Figura 11. Diferença entre intervalos de bandas	21

Figura 12. Estruturas do processo de oxidação eletroquímico e processo químico do 4-AF.	24
Figura 13. Proposta para acoplamento 1-4 via nitrogênio.	24
Figura 14. Materiais utilizados para estudos eletroquímicos A: eletrodo de grafite e barra de grafite B: cela de três compartimentos com respectivos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência.	29
Figura 15. Equipamentos utilizados para os experimentos eletroquímicos e para limpeza dos eletrodos.	29
Figura 16. Equipamentos utilizados para os experimentos de infravermelho e para análise morfológica dos eletrodos modificados.	31
Figura 17. Voltamograma cíclico de um eletrodo de carbono grafite em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, 100 mV.s^{-1} .	40
Figura 18. (A) Eletropolimerização de 4-aminofenol $2,5 \times 10^{-3}$ em HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ sobre eletrodo de grafite.	41
Figura 19. Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$.	42
Figura 20. Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite sem filme e modificado com poli(4-aminofenol), 100 varreduras em solução aquosa de HClO_4 $0,5 \text{ mol/L}^{-1}$, 50 mV.s^{-1} .	43
Figura 21. Diferentes estados redox para poli(metilanilina) (LE) Leucomeraldina, (E) emeraldina e (PN) pernigranilina	43

Figura 22: (A) perfil i/E para 10 ciclos da eletropolimerização de $2,5\text{mmol.L}^{-1}$ de 4-aminofenol em $0,2\text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 , 50mV/s . (B) perfil dm/E para 10 ciclos da eletropolimerização de $2,5\text{mM}$ de 4-aminofenol em $0,2\text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 45

Figura 23: *Plot* da massa versus o número de ciclos no fim de cada ciclo. 46

Figura 24. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) (A) submetido à temperatura de 98°C (B) apenas ciclagens de potencial em HClO_4 $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ a temperatura ambiente..... 47

Figura 25. Valores de carga dos picos de oxidação nos voltamogramas cíclicos do filme com ou sem tratamento térmico em solução de HClO_4 48

Figura 26. Espectro de infra-vermelho do (A) poli(4-aminofenol) preparado em solução de HClO_4 , pH 0,5 e (B) 4-aminofenol. 50

Figura 27. Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol), 100 varreduras, com as bases nitrogenadas isoladas. Guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4 (A) ou tampão acetato pH 4,5 (B), incremento de $0,01\text{mV}$, período do pulso 0.2s , velocidade de varredura 5mVs^{-1} . As setas indicam presença de dímeros ou impurezas. 52

Figura 28. Bases purínicas (A) guanina e (B) adenina. O círculo representa região de menor potencial de oxidação 53

Figura 29. Voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação da mistura de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4, (A) e acetato pH 4,5 (B). 53

Figura 30. Voltametria de pulso diferencial de eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) contendo dsDNA, 78pb em: (A) tampão fosfato, pH 7,4 ou (B) tampão acetato, pH 4,5. 55

Figura 31. Mecanismo de oxidação das bases purínicas 56

Figura 32. Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos pontos de oxidação e redução. 57

Figura 33. Diagramas de Nyquist (A) ou admitância (B) para eletrodo de grafite modificado $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$ com: (○) poli(4-aminofenol), (□) poli(4-aminofenol) contendo ssDNA, (■) poli(4-aminofenol) contendo dsDNA.....58

Figura 34: Circuito equivalente. R_s : resistência da solução, R_{tc} : resistência a transferência de Carga, R_f : resistência do filme, Q_{dc} : capacitância da dupla camada eletretica, Q_f : capacitância do filme: Z_{W1} : resitencia ao transporte de íons da duplca camada elétrica: Z_{W2} : resistência ao transporte de íons dentro do filme. 58

Figura 35. Imagens de MFA de eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) sem DNA: (a) e (b), ou contendo DNA: antes da hibridação, ssDNA (c), após a hibridação com o alvo complementar, dsDNA (d).....60

Figura 36. Representação das interações iônicas entre o polímero e a molécula de DNA, R_1 = guanina, adenina, timina ou citosina, R_2 = ribose, R_3 = grupo fosfato. 62

Figura 37. Voltametria linear para eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) contendo $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ssDNA (a) e após hibridação com o alvo complementar, dsDNA (b) de ferrocenocarboxaldeído $6,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fostato pH 7,4 $0,1 \text{ mol/L}$. 10 mVs^{-1} 63

Figura 38. Representação entre ligações de hidrogênio entre ferrocenocarboxaldeído e ssDNA. 64

Figura 39. Tempo de hibridização do biossensor com o alvo complementar a 42°C. A análise foi feita por voltametria cíclica, 10mVs⁻¹, monitorando-se o pico de oxidação do 650 µmol.L⁻¹ de ferrocenocarboxaldeído. 65

Figura 40. Resposta de corrente em função de diferentes concentrações do alvo complementar (3,93 x 10⁻⁸; 3,93 x 10⁻⁹; 3,93 x 10⁻¹⁰; 3,93 x 10⁻¹¹ mol.L⁻¹) monitorando-se o pico de oxidação do ferrocenocarboxaldeído. A concentração da sonda imobilizada na superfície do biossensor foi 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹. 65

Figura 41. Detecção com azul de metileno 6,5 x 10⁻⁴ mol.L⁻¹. (A) voltametria cíclica. (B) voltametria de pulso diferencial. Sonda imobilizada (ss DNA) 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹; alvo complementar (sd DNA) 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹ em tampão fosfato pH 7,4 0,1 mol/L. Tempo de hibridização 15 minutos. Vc 10 mVs⁻¹ e VPD 5mV.s⁻¹. 66

Figura 42. Esquema de redução do azul de metileno em azul de leucometileno em substratos sólidos. 67

Figura 43. Voltamograma de pulso diferencial de azul de metileno como indicador redox em tampão fosfato, pH 7,4, em eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol). hibridizado com diferentes concentrações do alvo complementar: (a) 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹, (b) 3,93 x 10⁻⁹ mol.L⁻¹, (c) 3,93 x 10⁻¹⁰ mol.L⁻¹, (d) 3,93 x 10⁻¹¹ mol.L⁻¹ (e) 3,93 x 10⁻¹² mol.L⁻¹ ou (f) não hibridizado (ssDNA 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹). 68

Figura 44. Porcentagem de corrente em relação a simples fita em função de diferentes concentrações do alvo complementar (3,93 x 10⁻⁸, 3,93 x 10⁻⁹, 3,93 x 10⁻¹⁰, 3,93 x 10⁻¹¹ mol.L⁻¹, 3,93 x 10⁻¹² mol.L⁻¹) monitorando-se o pico de oxidação do azul de metileno. 69

Figura 45. Voltamograma de pulso diferencial de azul de metileno como indicador redox em tampão fosfato, pH 7,4 em eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) antes da hibridação (A), após a hibridação com: alvo não complementar (B) ou alvo complementar (C). 5mVs⁻¹, 0,01mV, 0,2ms. 70

Figura 46. Resposta de corrente em função do tempo monitorando-se o pico de oxidação do azul de metileno. As concentrações utilizadas para o indicador, ssDNA imobilizado sobre a superfície do eletrodo e analito alvo foram 6,5 x 10⁻⁴ molL⁻¹, 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹ e 3,93 x 10⁻⁸ mol.L⁻¹, respectivamente. 71

Lista de Tabelas:

Tabela 1. Diagnóstico da hanseníase. BT: dimorfa tuberculoíde; BL: dimorfa virchowiana; PB: paucibacilar; MB: multibacilar.....	4
Tabela 2. Taxas de prevalência e detecção nos quatro países mais endêmicos do planeta.	8
Tabela 3. Procedimento para imobilização de biomoléculas. Processos químicos e físicos.	13
Tabela 4. Valores de massa do polímero, carga e rendimento eletroquímico para 4-aminofenol sobre a superfície de grafite.....	44
Tabela 5. Valores de potencial e corrente das respectivas bases nitrogenadas isoladas.	52
Tabela 6. Valores de potencial e corrente de oxidação de uma mistura das bases nitrogenadas imobilizadas sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol).	54
Tabela 7: Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagramas de Nyquist.	59

Resumo: A hanseníase é uma doença crônica granulomatosa e dermatológica, proveniente de infecção causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. É objeto de intervenção do estado, pois quando não tratada causa incapacidade na população economicamente ativa. O Brasil continua sendo um dos quatro países endêmicos responsáveis por 34% de todos os casos registrados no início de 2007. O diagnóstico da doença só pode ser feito depois do aparecimento dos sintomas da doença. Medidas profiláticas são possíveis quando se utilizam técnicas como ELISA e PCR, que podem ser realizados apenas em laboratórios especializados, não atendendo as necessidades dos países endêmicos. Tais problemas podem ser contornados utilizando ferramentas de baixo custo, simples manuseio e sensíveis como biossensores. Neste trabalho, a matriz de poli(4-aminofenol) foi utilizada para imobilização e detecção de produto de PCR específico para bacilo de Hansen. A modificação da superfície com o filme foi confirmada observando as diferenças eletroquímicas do eletrodo sem modificação frente ao par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e eletrólito suporte. A caracterização da matriz polimérica foi conduzida por meio de FTIR, espectroscopia de impedância eletroquímica, microbalança eletroquímica de cristal de quartzo e estudos de estabilidade térmica. Dados de FTIR indicam possível polimerização via ligações C-N-C. A estabilidade do filme a 98°C foi avaliada e o mesmo manteve 60% de suas propriedades eletroativas após vinte minutos de tratamento térmico, sendo, portanto, adequado para a metodologia utilizada, neste trabalho, para imobilização de biomoléculas. A detecção de bases nitrogenadas sobre a nova matriz foi possível em valores de pH 4,5 e 7,4. O eletrólito, tampão fosfato em pH 7,4 foi o mais adequado para detecção das bases nitrogenadas e por sua vez, para produtos de PCR. Este eletrólito foi utilizado para imobilização do produto de PCR desnaturado (RLEP3) contendo 78pb e específico para o bacilo de Hansen. A imobilização deste fragmento de DNA foi confirmada monitorando os picos de oxidação da guanosina monofosfato e adenosina monofosfato e também por meio de estudos de espectroscopia de impedância eletroquímica. Indicadores de hibridização, ferrocenocarboxaldeído e azul de metileno, foram utilizados para diferenciar alvos complementares ou não complementares. Com a ocorrência da hibridação, foi observada redução nos valores de sinal de corrente, para ambos indicadores, monitorando-se o sinal do indicador. O menor limite de detecção, 10^{-10} mol.L⁻¹, do alvo complementar, foi atingido utilizando azul de metileno como indicador.

Quando a sonda foi submetida ao alvo não complementar, não foi observada mudança nos valores de corrente da sonda imobilizada. Após trinta dias de preparação, o biossensor manteve 60% de suas propriedades eletroquímicas. Estes estudos demonstraram a viabilidade de construção de um biossensor eletroquímico utilizando indicadores eletroativos de baixo custo, que pode ser usado em amostras reais com DNA do bacilo de Hansen.

Pela primeira vez, foi demonstrada a produção de eletrodos modificados com poli(4-aminofenol) como matriz para imobilização e detecção de produto de PCR específico para detecção da hanseníase.

Abstract: Leprosy is a chronic, granulomatous and dermatological disease, from infection caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*. It is object of intervention of the state, because when untreated cause disability in the economically active population. Brazil remains one of the four endemic countries responsible for 34% of all cases registered at the beginning of 2007. The disease diagnosis can only be done after the onset of disease symptoms. Prophylactic measures are possible when using techniques such as ELISA and PCR, which can be performed only in specialized laboratories, not considering the needs of the endemic countries. Such problems can be circumvented by using tools of low cost, simple and sensitive handling as biosensors.

In this work, poly(4-aminophenol) matrix, was used for immobilization and detection of specific PCR product for Hansen bacillus. The surface modification with the film was confirmed observing the electrochemical differences of the electrode without modification front at redox pair $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ and supported electrolyte. The characterization of the polymeric matrix was carried out by FTIR, electrochemical impedance spectroscopy, electrochemical quartz crystal microbalance and studies of thermal stability. The FTIR data indicate polymerization possible by C-N-C bonds. The stability of the film at 98 ° C was measured and even showed 60% of its electroactive properties after twenty minutes of heat treatment. being, therefore, adequate for the used methodology, in this work, for biomolecules immobilization. The detection of nitrogenated bases on the new matrix was possible in pH 4.5 and 7.4.

The eletrolite, phosphate buffer in pH 7.4, was the most adequate to nitrogenated bases detection and in turn, for PCR products. This electrolyte was used for immobilization of the denaturated PCR product (RLEP3), contained 78pb, and specific for the Hansen bacillus.

The DNA fragment immobilization was confirmed monitoring the oxidation peaks of guanosine monophosphate and adenosine monophosphate and also by means of electrochemical impedance spectroscopy studies. Hybridization indicator, ferrocenecarboxyaldehyde and methylene blue, had been used to differentiate complementary or not complementary target. With the hibridization occurrence, a reduction in the current signal values was observed, for both indicators, monitoring the indicator. The small detection limit, $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$, of the complementary target, was reached using methylene blue as indicator.

When the probe was submitted to not complementary target, it was not observed change in the current values of immobilized probe. At the end of thirty days the biosensor kept 60% of their electrochemical properties. These studies demonstrated the viability of constructing of an electrochemical biosensor using eletroactive indicators of low-cost, which can be used in real samples with the DNA of Hansen bacillus.

For the first time, in the open literature, it was demonstred the modified electrodes production with poly(4-aminophenol) as matrix to immobilization and detection of specific PCRproduct to leprosy detection.

1. Introdução

Doenças infecciosas e parasitárias contribuem para o aumento da morbidade humana e são responsáveis por uma grande proporção de mortes do planeta, sobretudo nos países menos desenvolvidos (SAKER *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, o perfil de mortalidade da população brasileira foi substancialmente alterado, sendo um traço marcante do declínio no peso relativo das doenças infecciosas e parasitárias, as quais foram responsáveis por quase metade de todos os óbitos ocorridos nas capitais dos estados brasileiros, na primeira metade do século XX. As doenças infecciosas determinaram 35,9% do total de mortes em 1950, 25,9% em 1960, 15,7% em 1970, 11,4% em 1981 e apenas 6,0% em 1989 (WALDMAN *et al.*, 1999).

Apesar dessa evolução favorável, o Brasil ainda apresentou, na segunda metade da década de 80, coeficiente de mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias em torno de 33,0 por 100.000 habitantes, próximo das taxas encontradas na Colômbia e Suriname. Estas taxas estão acima das verificadas em países como o Chile (19,2/100.000 habitantes), Costa Rica (11,8/100.000 habitantes) e Cuba (9,1/100.000 habitantes) (WALDMAN *et al.*, 1999).

Nos últimos vinte anos do século XX, as doenças infecciosas e parasitárias ressurgiram no Brasil, anteriormente controladas ou extintas, devido ao aumento da pobreza, falta de higiene e má alimentação da população, ocupando um papel relevante entre as causas de morte e favorecendo o estabelecimento de um novo quadro de morbimortalidade no país (CAMPELO *et al.*, 2005). Segundo o Ministério da saúde, 46.067 pessoas chegaram ao óbito por doenças infecciosas e parasitárias em 2004, o que equivale a 5,3% do total das mortes no país. Na região sudeste o percentual chega a 5% das mortes registradas (SAÚDE BRASIL, 2006). Estes dados estão representados na figura 1.

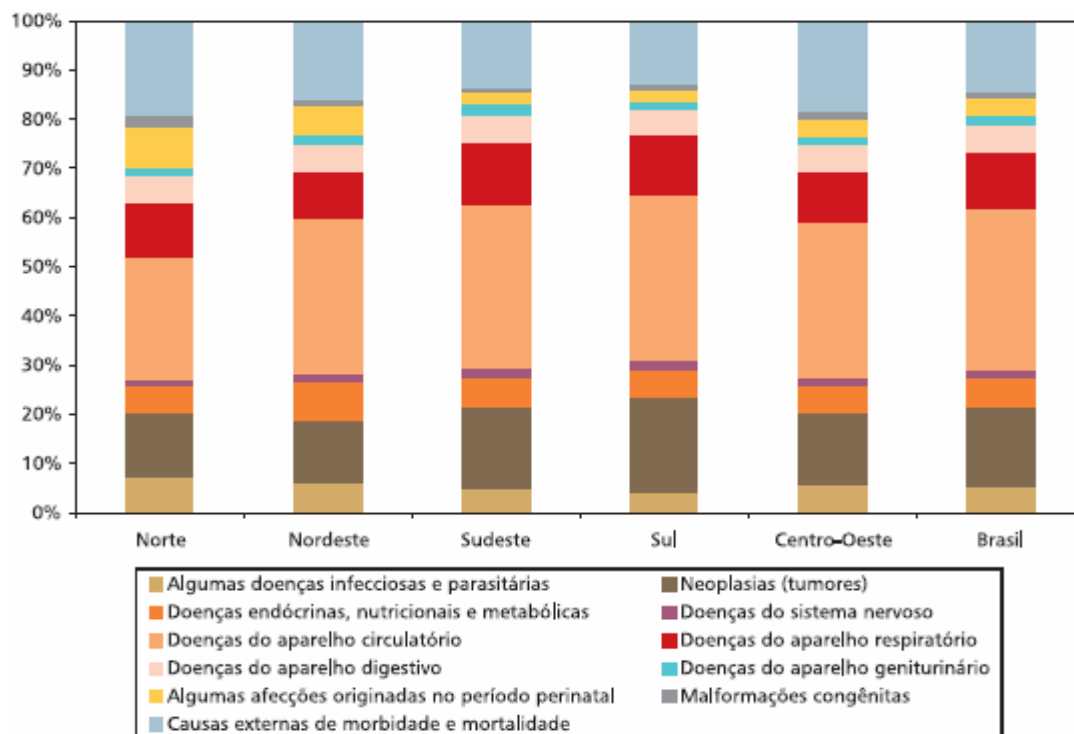


Figura 1. Mortalidade proporcional por causas definidas, segundo as regiões – Brasil 2004.

Doenças infecciosas e parasitárias tais como hanseníase, chagas, dengue, tuberculose, leishmaniose e outras, têm expressivo impacto social, já que estão diretamente associados à pobreza e à qualidade de vida (PAES *et al.*, 1999) e são agravadas por políticas que resultam em desemprego, baixos salários, péssimas condições alimentares e de moradia (DORNELES, 2005).

1.1. Hanseníase

A hanseníase é uma doença crônica granulomatosa proveniente de infecção causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (WARWICK and DIANA, 2004), figura 2. É uma das mais antigas doenças que acometem o homem, sendo que as referências mais remotas datam de 600 a.C., procedentes da Índia, que juntamente com a África podem ser consideradas o berço desta doença (DORNELES, 2005).

Esse bacilo tem a capacidade de infectar grande número de indivíduos, mas poucos adoecem pela sua baixa patogenicidade, propriedade que não é função apenas de suas características intrínsecas, mas que depende, sobretudo, de sua relação com o hospedeiro e

grau de endemidade do meio. O domicílio é apontado como importante espaço de transmissão da doença, embora ainda exista grande lacuna de conhecimento quanto aos prováveis fatores de risco implicados, especialmente aqueles relacionados ao ambiente social. Apesar de baixa patogenicidade, o poder imunogênico do *M. leprae* é responsável pelo alto potencial do parasita, intracelular obrigatório, que apresenta afinidade por células cutâneas de potencial incapacitante da hanseníase, o que permite afirmar que este bacilo é de alta infectividade (FOSS, 1997).



Figura 2. Aparência de uma pessoa com hanseníase (STEPHEN and DIANA, 2007).

O tratamento para pacientes com hanseníase é baseado no sistema de multidrogas que deve ser ministrado de acordo com a classificação da doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a classificação de todos os pacientes (tabela 1) deve ser baseada na estimativa de bacilos na pele lesionada, índice baciloscópico. Este é determinado pela contagem dos ácidos graxos do bacilo e no sistema Ridley e Jopling (figura 3) que se baseia na resposta imunológica do hospedeiro o qual compreende dois polos, a tuberculóide e a virchowiana (SAMUEL, 2004).

A hanseníase tuberculóide (HT) está relacionada com a exacerbação da resposta imune celular e a hanseníase virchowiana (HV) é a forma de alta susceptibilidade que se caracteriza por deficiência de resposta imune celular, excessiva multiplicação bacilar e disseminação da infecção para vísceras e tecido nervoso. Esta última é a forma de maior importância epidemiológica, pois os bacilos estão maciçamente presentes nas lesões

cutâneas, na proporção de 10^{10} bacilos/g tecido, propiciando a transmissão da doença por contato físico (SAMUEL, 2004, STEPHEN and DIANA, 2007).

Tabela 1. Diagnóstico da hanseníase (WHO, 2007)

CARACTERÍSTICAS			
Clínica	Baciloscopia	Forma Clínica	Classificação Operacional para a rede básica
Áreas de hipo ou anestesia, parestesias, manchas hipo-crômicas e, ou eritematohipocrômicas, com ou sem diminuição da sudorese e rarefação de pêlos.	Negativa	Indeterminada (BT ou BL)	PB Até 5 lesões de pele
Placas eritematosas, eritematohipocrômicas, bem definidas, hipo ou anestésicas, comprometimento de nervo.	Negativa	Tuberculoíde	
Lesões pré-foveolares (eritematosas, planas com o centro claro). Lesões foveolares (eritematopigmentares, de tonalidade ferruginosa ou pardacenta). Apresenta alterações de sensibilidade.	Positiva (bacilos e globias ou com raros bacilos) ou Negativa	Borderline ou dimorfa	MB Mais que 5 lesões de pele
Eritema e infiltração difusas, placas eritematosas infiltradas e de bordas mal definidas, tubérculos e nódulos, madarose, lesões das mucosas, com alteração de sensibilidade.	Positiva (bacilos abundantes e globias)	Virchowiana	

BT: dimorfa tuberculoíde; BL: dimorfa virchowiana; PB: paucibacilar; MB: multibacilar.

Entre as formas polares, situam-se as formas instáveis da doença, com amplo espectro de manifestações clínicas. Hanseníase borderline (ou dimorfa) é a forma intermediária, resultante de uma imunidade também intermediária, podendo adquirir características tuberculoíde (BT), virchowiana (BL) ou simplesmente permanecer dimorfa. O número de lesões é maior na bordeline, formando manchas que podem atingir grandes áreas da pele, envolvendo partes da pele sadia. O acometimento dos nervos é mais extenso.

A medida da resposta imunológica pode ser efetuada por meio da reação de Mitsuda (FOSS, 1997), que consiste na inoculação intradérmica de suspensão de bacilos mortos pelo calor, cuja leitura é feita após quatro semanas, resultando em pápula infiltrada (reação positiva) ou ausência de alteração cutânea (reação negativa).

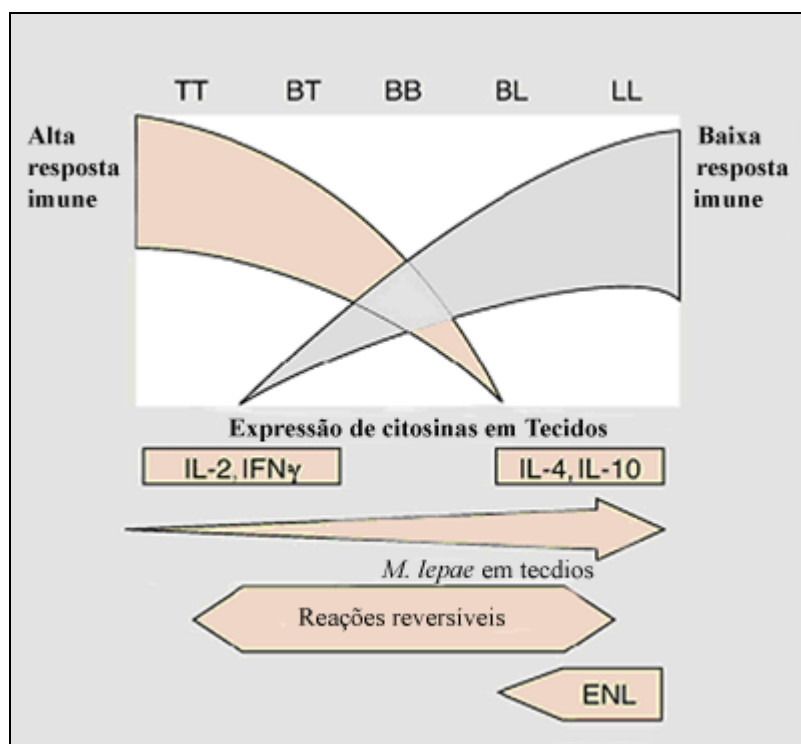


Figura 3. Classificação Ridley e Jopling baseada na resposta imunológica do hospedeiro. TT polar tuberculóide, BT: dimorfa tuberculóide, BB: dimorfa ou borderline, BL: dimorfa virchowiana, LL: polar lepromatoso ou virchowiana (STEPHEN and DIANA, 2007). IL: interleucina; IFN: interferon; ENL: leprose eritema nodoso.

Segundo o resultado da reação de Mitsuda (FOSS, 1997) os pacientes podem ser classificados em suscetíveis ou resistentes à doença, pois a reação é sempre negativa em virchowianos e positiva em tuberculóides.

Os aspectos morfológicos das lesões cutâneas e classificação clínica das quatro formas apresentadas (tabela 1) são utilizados por profissionais especializados e em investigação científica. No campo, para fins terapêuticos, a OMS recomenda que se use a classificação operacional baseada no número de lesões cutâneas (SAMUEL, 2004, STEPHEN and DIANA, 2007).

Em relação às manifestações neurológicas, estas são comuns a todas as formas clínicas. Na hanseníase indeterminada, não há comprometimento de troncos nervosos, expressos clinicamente. Na hanseníase tuberculóide, o comprometimento dos nervos é mais precoce e mais intenso. Na hanseníase virchowiana, ocorrem lesões dermatológicas das mucosas e também lesões viscerais. Portanto hanseníase é doença dermatológica, pois seus primeiros sinais e sintomas manifestam-se na pele, mas, é também infecciosa, imunológica e neurológica (SAMUEL, 2004, STEPHEN and DIANA, 2007). É objeto de intervenção do aparelho do estado, pois quando não é adequadamente tratada pode incapacitar a população na fase etária economicamente ativa (WHO, 2007).

Após a implementação da poliquimioterapia, em 1982, foi observado grande declínio mundial no número de pacientes com lepra, com a cura de mais de dez milhões de pessoas em dez anos. Essa melhoria possibilitou a OMS pactuar compromisso entre os países endêmicos de que a hanseníase seria eliminada como problema da saúde pública até o ano de 2000, prazo estendido até 2010, visto que, para erradicar a doença, é necessário reduzir a taxa de prevalência para menos de 1 caso para cada 10 mil habitantes (SAMUEL, 2004, WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL, 2007).

Atualmente os índices mundiais de detecção continuam em queda como pode ser observado na figura 4. Os casos de prevalência registrados no início de 2007 foram de 224.717 pessoas e o número de pacientes infectados durante o ano de 2006 foi de 259.017 pessoas, acumulando um declínio de 13,4% em relação ao ano de 2005 (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL, 2007).

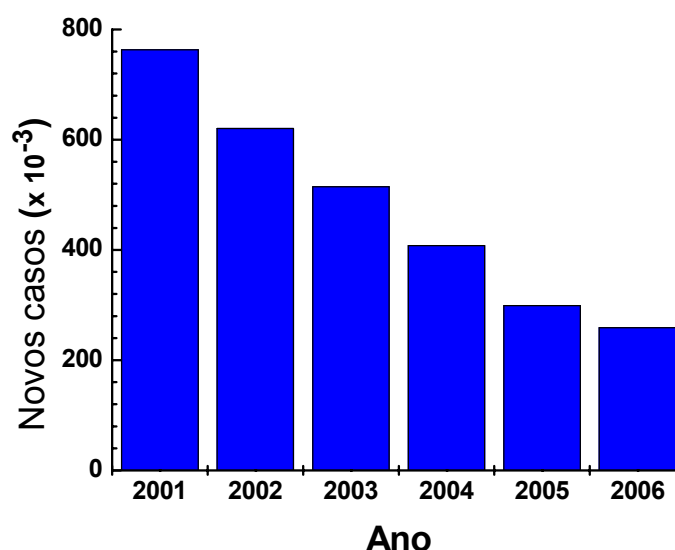


Figura 4. Número de casos detectados mundialmente referentes ao período de 2001 a 2006 (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL, 2007).

Apesar dos números favoráveis no âmbito mundial, o Brasil continua sendo um dos quatro países endêmicos responsáveis por 34% de todos os casos registrados no início de 2007, tabela 2. Nosso país ocupa o segundo lugar no mundo e o primeiro das Américas em números de casos de hanseníase, com 44.436 casos detectados em 2006 (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL, 2007). Esses números levam a uma taxa de 23.53 casos para cada 100.000 habitantes. Os primeiros dados disponíveis do primeiro semestre de 2007 revelam aumento na taxa de prevalência quando comparado com os dois anos anteriores, atingindo valores 3.21 para cada 10.000 (WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL, 2007). Esse aumento pode ser explicado devido à elevada endemicidade do meio, favorecendo o contágio de outras pessoas e assim, a continuidade da prevalência da doença.

Tabela 2. Taxas de prevalência e detecção nos quatro países mais endêmicos do planeta.

Países	Prevalência registrada ^a			Novos casos registrados ^b		
	Início de 2005	Início de 2006	Início de 2007	2004	2005	2006
Brasil	30.693 (1,7)	27.313 (1,5)	60.567 (3,21)	49.384 (26,9)	38.410 (20,6)	44.436 (23,53)
República Democrata do Congo	10.530 (1,9)	9.785 (1,7)	8.261 (1,39)	11.781 (21,1)	10.737 (18,0)	8.257 (13,92)
Moçambique	4.692 (2,4)	4.889 (2,5)	2.594 (1,29)	4.266 (22,0)	5.371 (27,1)	3.637 (18,04)
Nepal	4.699 (1,8)	4.921 (1,8)	3.951 (1,43)	6.958 (26,2)	6.150 (22,7)	4.253 (10,37)

*O número entre parênteses indica em (a) número de prevalência/10.000 habitantes; em (b) casos detectados/100.000 habitantes.

Embora a hanseníase seja prevalente em todo território brasileiro, sua distribuição é desigual, existindo áreas de baixa (<1 caso/10.000 habitantes), média (de 1 a 5 casos/10.000 hab.), alta (de 5 a 10 casos/10.000 hab.), muito alta (de 10 a 15 casos/10.000 hab.) e hiper endemicidade (> 15 casos/10.000 hab.) como pode ser observado na figura 5 (SAÚDE, 2007).

A região Sudeste é uma área de baixa endemicidade, sendo seus coeficientes de prevalência e detecção de 0,93/10.000 e 0,96/10.000, respectivamente (DATASUS, 2007). Contudo os dados epidemiológicos não medem a real extensão do problema, uma vez que foi demonstrado, usando provas sorológicas para determinação de anticorpos específicos, que a infecção pelo *M. leprae* é muito mais freqüente do que o número de casos clínicos conhecidos (LOMBARDI and SUÁREZ, 1997).

A prevalência de casos ativos de hanseníase no Brasil, comparada aos anos anteriores, sofreu forte redução devido aos programas de controle adotados, contudo a incidência decresceu muito lentamente, demonstrando ainda pouco entendimento sobre a epidemiologia desta doença (RAMAPRASAD *et al.*, 1997). Este fato pode ser explicado pela transmissão por pessoas sem nenhum sintoma de hanseníase, porém com a presença do *M. leprae* na mucosa.

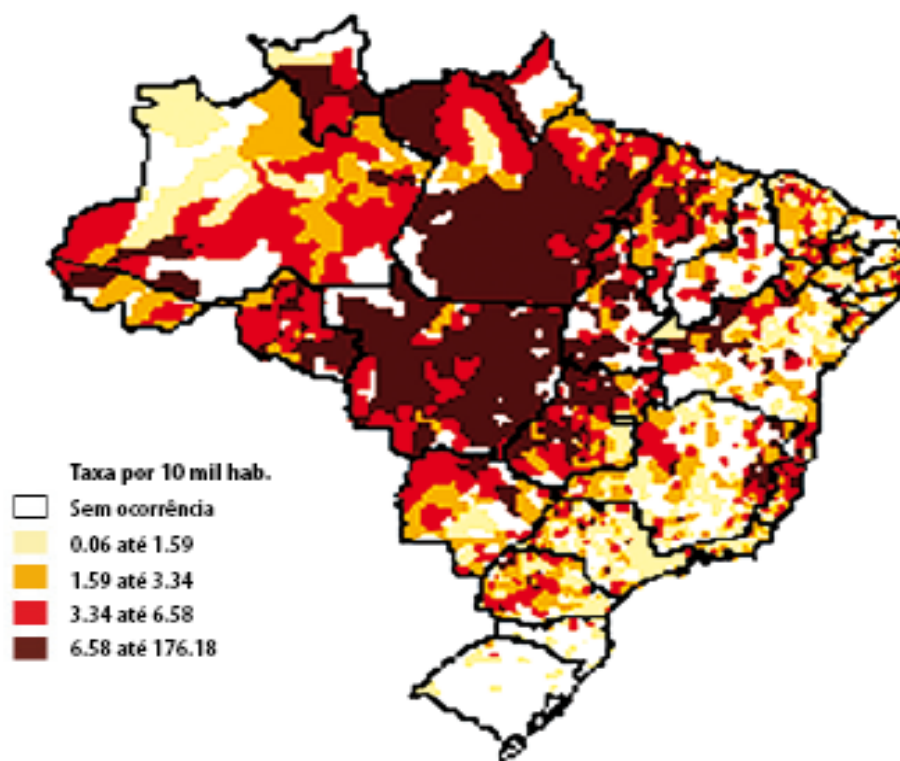


Figura 5. Taxa de prevalência no Brasil, referente ao ano de 2004 (SAÚDE, 2007).

Deste modo, existe um número não definido de pessoas infectadas, assintomáticas e que podem exercer papel ativo na transmissão da doença, prejudicando o seu efetivo controle (TALHARI and NEVES, 1997).

Ferramentas modernas de biologia molecular e imunologia tem se apresentado de grande valor para o diagnóstico da hanseníase e para a pesquisa epidemiológica (VAN BEERS *et al.*, 1996). As técnicas da Reação em cadeia da polimerase (PCR) e enzimaímunoensaio (ELISA) tornam possível detectar com alta sensibilidade e especificidade o bacilo de Hansen em sítios específicos (DE WIT *et al.*, 1991; YOON *et al.*, 1993). Entretanto, o tempo atual destas técnicas demanda tempo, pessoal qualificado, custo elevado e, sobretudo a disseminação das mesmas, em centros periféricos de saúde; local de maior procura populacional (DAVID *et al.*, 2004).

A hanseníase hoje tem cura e esta é tanto mais rápida quanto mais cedo a doença for detectada. O diagnóstico precoce, tratamento regular e acompanhamento da equipe médica poderão impedir o aparecimento das deformidades físicas, modificando a imagem da doença no Brasil e no mundo.

1.2. Biossensores

1.2.1. Aspectos Gerais

A habilidade dos organismos vivos de reconhecer diversos alvos biológicos inspirou vários cientistas a desenvolver novas ferramentas analíticas de detecção, conhecidos como biossensores. Utilizando-se biomoléculas ou receptores de organismos biológicos, esses aparelhos possuem várias características analíticas favoráveis tais como; seletividade, sensibilidade, especificidade, portabilidade, rapidez, baixo custo, capacidade de miniaturização e rápido tempo de detecção. Estas características favorecem a aplicação desses instrumentos no diagnóstico de doenças, monitoramento ambiental, bem como no controle de qualidade dos alimentos e, portanto, uma alternativa as metodologias atuais de análises clínicas (D'ORAZIO, 2003).

De acordo com a literatura (D'ORAZIO, 2003), biossensores são aparelhos analíticos compostos por uma camada de reconhecimento biológico imobilizada sobre um transdutor. A biomolécula, que pode ser uma enzima, anticorpo, sequência de DNA, peptídeo ou microorganismo, fornece ao sistema seletividade pelo analito de interesse, possibilitando dessa forma discriminar a molécula em uma matriz complexa. O sinal do transdutor determina a extensão do bio-reconhecimento e o converte em um sinal (GOODING, 2006) o qual pode ser, eletroquímico, ótico, gravimétrico ou ressonância plasmônica. As técnicas eletroquímicas utilizadas para detecção, podem ser amperometria ou potenciometria. De ambas as técnicas, a amperométrica é a mais atrativa devido a maior sensibilidade (FREIRE *et al.*, 2003b).

Os biossensores podem ser divididos em duas classes: os catalíticos, que utilizam enzimas imobilizadas e os de afinidade, que utilizam anticorpos, DNA ou peptídeos, como moléculas de bio-reconhecimento (GOODING, 2006, D'ORAZIO, 2003).

Freqüentemente, os elementos de reconhecimento requerem compostos intermediários chamados de mediadores para o funcionamento apropriado do biossensor. Tais compostos são transportadores redox equivalentes entre o elemento de reconhecimento e o transdutor, resultando no aumento da seletividade e sensibilidade do biossensor (CASTILLO *et al.*, 2004).

Os biossensores, dependendo do método de imobilização e da natureza do mediador, podem ser classificados em primeira, segunda e terceira geração (figura 6) (CASTILLO *et al.*, 2004, PEREIRA, 2003).

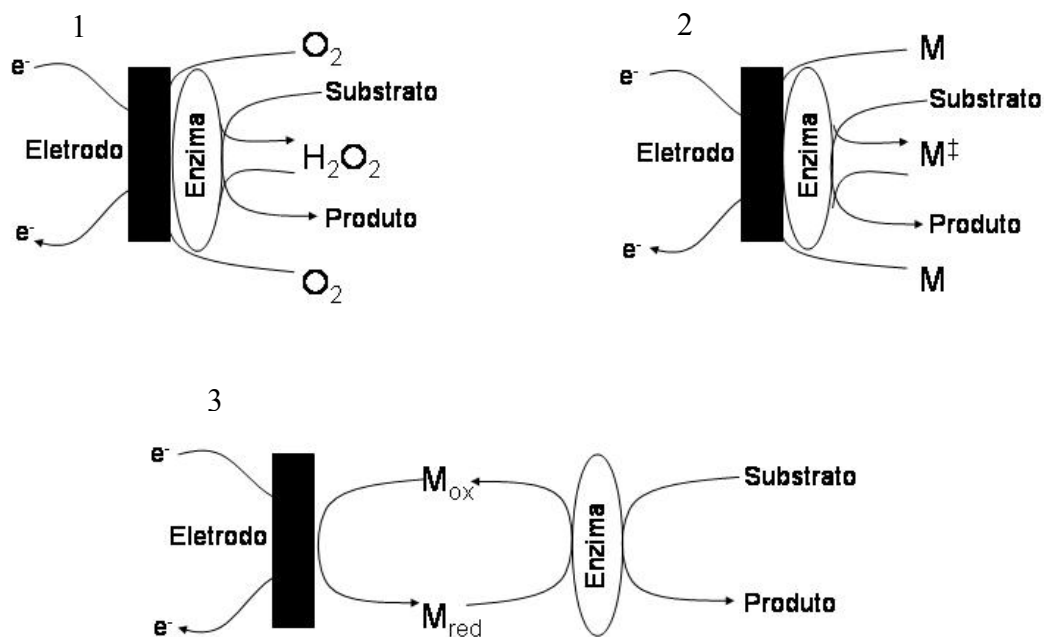
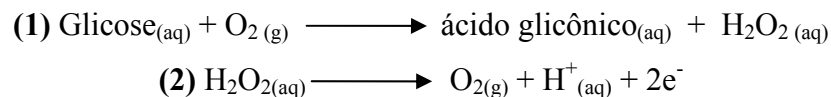


Figura 6. Esquema das gerações dos biossensores. 1: primeira geração; 2: segunda geração e 3: terceira geração. M: mediador reduzido. M⁺: mediador oxidado.

A primeira geração compreende apenas a biomolécula de reconhecimento e o transdutor. O biossensor da “Yellow Spring Instruments” (figura 7) representa bem esta geração.

A enzima é fisicamente imobilizada em um eletrodo sensível ao produto enzimático por duas membranas: uma permeável a gás e outra de diálise, garantindo que apenas a glicose e o co-substrato, gás oxigênio, cheguem até a enzima.

O transdutor monitora a concentração de glicose na amostra por meio da oxidação do peróxido de hidrogênio gerado, segundo as reações 1 e 2, abaixo (CASTILLO *et al.*, 2004)



As principais desvantagens desses sensores são: a necessidade de aplicação de altos potenciais e dependência enzimática do co-substrato, uma vez que, em amostras reais há baixa concentração de O_2 , dificultando a análise de amostra com concentração de glicose acima de 500 mg/dl. O gás oxigênio funciona como mediador redox natural e regenerador do sítio ativo enzimático (D'ORAZIO, 2003).

Na segunda geração, utilizam-se mediadores livremente difundidos na superfície do transdutor. Esta geração foi desenvolvida para minimizar os problemas dos biossensores da primeira geração, substituindo os mediadores naturais (co-substrato) por mediadores artificiais. Estes compostos podem ser moléculas inorgânicas ou organometálicos derivados do Fe^{2+} (ferrocenos), ou complexos de ósmio (Os^{2+}) ou rutênio (Ru^{2+}) (CASTILLO *et al.*, 2004, BRETT *et al.*, 1999). Segundo TURNER *et al.*, 1987 *apud* CASTILLO *et al.*, 2004, um mediador ideal é aquele que possui as formas oxidadas e reduzidas estáveis, rápida taxa de transferência eletrônica entre a biomolécula e o transdutor e janela eletroquímica entre -100 a 0mV vs. ECS, evitando assim, a ação de diversos interferentes.

Em geral, alguns problemas são enfrentados como perda de sinal com os biossensores da segunda geração quando as análises são feitas em amostras complexas, cuja contaminação da amostra (processos de monitoramento em alimentos industriais e aplicações biomédicas) com o mediador artificial deve ser rigorosamente evitada.

Na terceira geração (figura 6-3), o mediador é integrado junto com componente de bio-reconhecimento transferindo os elétrons da biomolécula para o transdutor polarizado em um processo reversível.

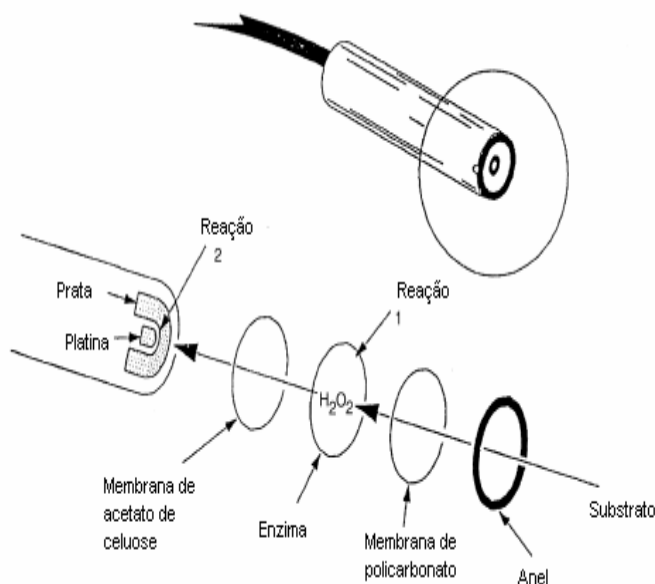


Figura 7. Configuração de um glicosímetro da “Yellow spring instruments” (D'ORAZIO, 2003).

Obviamente que a diferença entre a segunda e terceira geração não é muito significativa. A imobilização dos componentes de reconhecimento sobre a superfície do transdutor representa o fator determinante para o bom funcionamento do biossensor. Usualmente, os métodos utilizados para imobilização de biomoléculas (tabela 3) são também utilizados para imobilizar os mediadores (adsorção, ligação covalente, oclusão, ligação cruzada) que são necessários para assegurar o mecanismo de transferência eletrônica.

Tabela 3. Procedimento para imobilização de biomoléculas. Processos químicos^a e físicos^b.

Técnicas utilizadas para imobilização de biomoléculas		
Método	Vantagens	Desvantagens
Adsorção^b Van der Waals, ligações iônicas e hidrofóbicas.	Procedimento simples, condições brandas, menos dano à biomolécula.	Interações dependentes do pH, solvente e temperatura, baixa estabilidade.
Oclusão^b Membranas de diálise, polímeros.	Procedimento simples, não há problemas com o meio.	Resistência difusional, pode causar desnaturação da biomolécula causando baixa sensibilidade e limite de detecção.
Ligação Cruzada^a Glutaraldeído, bis-diazobenzidina, cloreto cianúrico.	Procedimento simples, ligações químicas fortes.	Dificuldade em controlar a reação, grande quantidade de biomolécula, baixa sensibilidade.
Ligação covalente^a Sobre membranas ou matrizes insolúveis.	Estável complexo matriz e biomolécula. Ligação entre grupos específicos biomolécula e matriz. Ideal para produção em massa e comercialização.	Complicado e elevado tempo de produção. Possibilidade de perda de atividade devido a reações envolvendo grupos essenciais da atividade biológica.

Contudo, essa geração gera algumas controvérsias, pois são encontradas na literatura duas definições: a primeira acima citada e a segunda definida por GORDON *et al.*, 1999 *apud* KUBOTA *et al.*, 2002 (figura 8) como sendo uma transferência direta da biomolécula e o transdutor sem a presença de mediadores artificiais ou naturais.

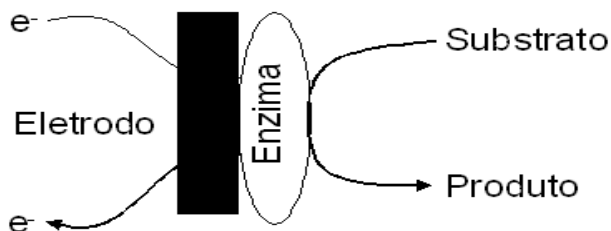


Figura 8. Terceira geração de biossensores proposto por GORDON *et al.*, 1999 *apud* KUBOTA *et al.*, 2002.

De acordo com o autor, essa configuração a torna bastante vantajosa, já que promove uma maior seletividade, à medida que eles operam em potenciais mais próximos ao da própria biomolécula, diminuindo como consequência reações interferentes, assim como dispensando o uso de outros reagentes na seqüência das reações enzimáticas.

1.2.2. Biossensores de DNA

Na última década, o progresso tecnológico no campo da biologia molecular possibilitou a revelação da estrutura genômica de vários organismos, dentre eles o genoma humano. A elucidação dessa estrutura revelou que as mutações do gene são responsáveis por diversas doenças genéticas e virais (KARA *et al.*, 2004). Em vários campos da medicina, como na medicina forense e biologia molecular, o estabelecimento de métodos de detecção e análise de seqüências específicas de DNA tornou-se muito importante (LUCARELLI *et al.*, 2004).

Em geral, a detecção específica de seqüências de DNA são realizadas por eletroforese de fragmentos amplificados por PCR ou por radioisótopos utilizando a seqüência complementar marcada com ^{32}P e fluorescência, monitorando reações enzimáticas acopladas ao DNA. Contudo, esses métodos são problemáticos, pois utilizam a fixação de amostras de DNA e hibridização em membranas de nitrocelulose, procedimento que demanda tempo e manejo laboratorial complicado, pois se trata de reações em ambiente heterogêneo.

Além desse inconveniente, as análises simultâneas de várias amostras são difíceis de serem realizadas, devido ao tempo e o uso de agentes carcinogênicos como o brometo de etídio em géis de DNA e marcadores radioativos, pois, apesar de serem sensíveis são agentes perigosos à saúde e ao ambiente (UMEZAWA, 2007; IHARA *et al.*, 1996).

No intuito de contornar esses problemas, a comunidade científica têm trabalhado no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de DNA, visto que é uma ferramenta para rápida aplicação em análise genética. Esta técnica pode ser utilizada como alternativa ao gel de eletroforese e marcadores radioativos, uma vez que esses sensores são capazes de detectar a presença de genes ou genes mutantes associados a doenças hereditárias ou doenças infecciosas, pois são sensíveis, seletivos e não causam dano ao operador e ao ambiente (UMEZAWA, 2007; PINGANG, 2005).

Basicamente, um biossensor de DNA é constituído de simples fitas (*ssDNA*) imobilizadas na superfície do transdutor, (tabela 3) para reconhecer sua sequência complementar. A dupla fita formada na superfície do eletrodo é conhecida como híbrido (*dsDNA*) e este evento é convertido em sinal analítico pelo transdutor, figura 9 (KERMAN *et al.*, 2003). Os biossensores eletroquímicos possuem alta sensibilidade, são simples e de baixo custo, fornecendo propriedades superiores a outros sensores, quando comparado com outras técnicas analíticas (KERMAN *et al.*, 2003, WANG, 2000).

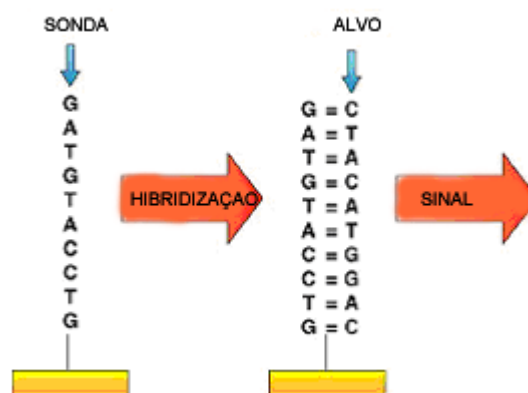


Figura 9. Detecção específica de uma sequência de DNA usando um biossensor.

A detecção eletroquímica do DNA pode ser realizada por oxidação direta de bases do DNA ou por indicadores de hibridização, os quais são: mediadores, intercaladores, enzimas ou nanopartículas. O monitoramento é feito pelo aumento ou decréscimo das correntes de oxidação ou de redução dos indicadores, ou oxidação direta da guanina na dupla fita de DNA (WANG, 2000).

O uso de enzimas ou nanopartículas na construção de biossensores é menos vantajoso em relação aos mediadores ou intercaladores, pois necessitam de várias etapas de construção, além de reagentes de alto custo e baixa estabilidade (KERMAN, *et al.*, 2003; DRUMMOND *et al.*, 2003).

O primeiro relato na literatura com indicadores redox foi feito por MIKKELSEN *et al.*, (1994), para detectar seqüências relacionadas à fibrose cística. Neste trabalho foi possível detectar em 70% dos pacientes a seqüência relacionada à fibrose cística atingindo um limite detecção de 1,8 femtomoles de DNA, contendo 4000 bases, sendo utilizado $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ como indicador.

Esse indicador, em sua forma oxidada, é capaz de extrair elétrons dos resíduos de guanina em um alvo hibridizado (figura 10) passando para sua forma reduzida; aplicando um potencial positivo no eletrodo, o indicador é oxidado retornando ao primeiro estágio, completando assim, o ciclo redox. Isso possibilita a participação do indicador em vários ciclos redox, o que conduz a amplificação do sinal eletroquímico. Além disso, o tempo de resposta do sistema foi mais rápido quando comparado com a oxidação direta do ácido nucléico no eletrodo, devido a taxa de transferência de elétrons entre o $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ e guanina ser mais rápida.

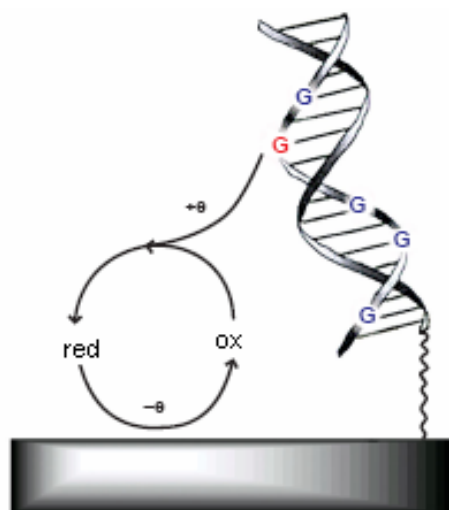


Figura 10. Biossensor eletroquímico de DNA baseado na reação redox entre $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ e resíduos de guanina.

YAN *et al.*, (2001) reportaram a detecção do gene de cianobactérias utilizando-se $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ como indicador sobre eletrodos de ouro. O pico de corrente do indicador foi linearmente relacionado com a concentração da sequência complementar e a sensibilidade do sistema foi da ordem de $10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$. Além disso, o biossensor foi capaz de distinguir polimorfismos no alvo complementar.

Em outro trabalho, XU *et al.*, (2000) marcaram DNA de *calf thymus* desnaturado com ferrocenocarboxaldeído via 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDC). A sonda marcada foi utilizada para hibridizar o complementar, imobilizado sobre a superfície do eletrodo de grafite. A imobilização da sonda no transdutor foi efetuada aplicando um potencial positivo em uma solução tampão contendo as sequências, não danificadas ou danificadas com radicais hidroxilas. Após o processo de hibridização com a sonda, os autores conseguiram diferenciar por voltametria de pulso diferencial as sequências não danificadas ou danificadas, monitorando o pico de oxidação do ferrocenocarboxaldeído.

BOON *et al.*, (2001) desenvolveram um método sensível para detectar bases nitrogenadas danificadas ou pontos de mutação na dupla fita de DNA por métodos electrocatalíticos. Eletrodos de ouro foram utilizados para monitorar o sinal electrocatalítico do azul de metileno (AM), como intercalador redox de DNA, acoplado ao ferricianeto $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Aplicando-se um potencial de redução o AM intercalado é reduzido para azul de leucometileno (LM), posteriormente AM reduz o ferricianeto em solução, regenerando AM cataliticamente, conduzindo ao aumento do sinal de hibridação. A presença de pontos de mutação ou bases nitrogenadas danificadas diminui substancialmente o sinal electrocatalítico (DRUMMOND *et al.*, 2003).

Estudos similares com sequências específicas do vírus da hepatite B, amplificadas por PCR, foram detectadas por MERIC *et al.*, (2002), pela técnica de voltametria. Eles imobilizaram 21 ou 24 bases de ssDNA, relacionadas à hepatite sobre eletrodos de pasta de carbono para detectar sua sequência complementar. A hibridização foi detectada utilizando azul de metileno como indicador, o que resultou no decréscimo de sinal do híbrido em relação a simples fita. Essa diferença de sinal foi usada para rastrear a sequência de DNA específica para esta doença infecciosa.

Pode-se observar o uso de diversos tipos de eletrodos na construção de biossensores electroquímicos com boa performance, como por exemplo, os sensores acima citados.

Todavia, na tentativa de melhorar a transdução do sinal de hibridização, esses eletrodos podem ser submetidos a modificações químicas da superfície para aumentar a reatividade e seletividade do sensor base.

Estas características podem ser obtidas com filmes gerados eletroquimicamente sobre diferentes superfícies. Algumas vantagens na aplicação de eletrodos modificados com filmes em biossensores serão discutidas abaixo.

1.3. Filmes poliméricos aplicados a biossensores

A crescente busca por sensores com melhores características é um dos maiores desafios entre os químicos eletroanalíticos, principalmente devido às diversas amostras de interesse existentes atualmente.

Apesar da grande versatilidade e perspectivas apresentadas pelos sensores eletroquímicos, a utilidade de um eletrodo é muitas vezes limitada devido a passivação gradual de sua superfície, que é consequência, principalmente, da adsorção dos produtos da própria reação de óxido-redução utilizada na detecção, ou ainda, dos subprodutos destas reações que podem se polimerizar e depositar sobre a superfície dos eletrodos (ROSATTO *et al.*, 2001). Além disso, a sensibilidade de muitos analitos de interesse pode ser prejudicada em função da cinética de transferência de elétrons entre estes compostos e os materiais dos eletrodos, serem excessivamente lenta (WANG, 1991). Uma outra limitação é a dificuldade de discriminar entre compostos alvos que possuam características redox similares (WANG, 1991).

A modificação química da superfície de eletrodos oferece grande potencial para amenizar os problemas acima descritos, e conseqüentemente pode aumentar a eficiência e aplicabilidade dos sensores eletroquímicos (WANG, 1991).

A habilidade para controlar e manipular deliberadamente as propriedades das superfícies dos eletrodos pode proporcionar uma variedade de efeitos atrativos, os quais podem contornar efetivamente muitos dos problemas apresentados pelos sensores eletroquímicos tradicionais (FREIRE, 2003a) A utilização de filmes poliméricos oferece várias vantagens na construção de sensores, visto que são materiais relativamente baratos, as técnicas de fabricação são simples, podem ser depositados em vários tipos de substratos

e a possibilidade de escolha de diferentes estruturas moleculares proporciona a construção de filmes com diversas características (HARSAËNYI, 2000).

As técnicas atualmente utilizadas na deposição de filmes em diferentes superfícies são bastante diversificadas. Os métodos de Langmuir-Blodgett e polimerização eletroquímica são os mais utilizados para a construção de biossensores (PEREIRA, 2002; HARSANYI, 2000). A vantagem do método eletroquímico é o controle na deposição do filme como espessura, morfologia e homogeneidade na formação da cadeia, variando-se o potencial e o número de varreduras sobre o eletrodo de trabalho (HARSAËNYI, 2000; SADKI, 2000).

O recobrimento de superfícies com filmes poliméricos tem sido empregado no desenvolvimento de biossensores para proteger a superfície dos eletrodos de impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes, incorporar mediadores e fornecer biocompatibilidade (PEREIRA, 2002).

A etapa de imobilização da biomolécula ou o indicador na superfície do eletrodo desempenha um papel importante na obtenção da sensibilidade, seletividade e estabilidade do biossensor. Estas características são alcançadas por meio do controle químico e cobertura da superfície, assegurando assim, reatividade, acessibilidade e estabilidade à biomolécula imobilizada (TLILI, 2005).

Uma forma comum de imobilizar biomoléculas e indicadores é sobre superfícies de monocamadas automontadas e filmes eletrodepositados. Grupos funcionais dos filmes podem se ligar a grupos reativos da biomolécula ou indicador, por reações com a própria molécula ou através do uso de reagentes como carbodiimida, biotina, estreptavidina ou por adsorção (TLILI, 2005).

O uso de filmes condutores e não condutores são adequados para imobilizar sondas de DNA (TLILI, 2005). Esta característica se deve a fácil processabilidade sobre os eletrodos condutores, combinado com o aumento da área de contato da biomolécula com o eletrodo, o que possibilita maior acomodação da molécula simulando seu ambiente natural, favorecendo a conversão do sinal biológico em sinal analítico mensurável, com rápido tempo de resposta e alta estabilidade (SADKI, 2000; CHRISTINE, 1997).

Devido às diversas características apresentadas pelos filmes poliméricos, vários trabalhos são encontrados na literatura visando à construção de biossensores (LEE *et al.*, 2001; HACCOUN *et al.*, 2005; CHAKER *et al.*, 2005).

A utilização de microeletrodos modificados com filmes poliméricos para a detecção de DNA apresenta elevada sensibilidade, visto que, nestes sistemas, é possível obter resposta eletroquímica em concentrações em torno de zeptomoles de DNA (XIE *et al.*, 2004; ZHANG, 2003).

1.3.1. Filmes condutores e não condutores

Os filmes poliméricos podem ser formados na superfície de eletrodos por oxidação eletroquímica de diversas estruturas eletroativas em meio aquoso ou em meio orgânico. A partir dessas diferentes estruturas podem-se criar filmes condutores e não-condutores (LONG, 2001; SADKI, 2000).

O mecanismo de condução de filmes poliméricos é baseado na teoria de banda nos sólidos, a mesma dos metais e semicondutores inorgânicos. A condutividade elétrica nos sólidos pode ser explicada em termos de orbitais moleculares.

Segundo a teoria citada acima, N orbitais atômicos se combinam em uma molécula, formando N orbitais moleculares, que se espalham em toda a molécula. O mesmo fenômeno é observado em metais, porém, o valor de N é elevado, por exemplo, 10^{23} para 10g de Cu. Em vez de poucos orbitais moleculares com energias extremamente espaçadas, um enorme número de orbitais moleculares em um metal apresenta os níveis de energia tão próximos que formam uma banda quase contínua (THE NOBEL PRIZE, 2000; ATKINS and JONES, 2001).

Em contraste com os gases nobres, a valência dos metais não são totalmente preenchidas. Assim, a banda de N orbitais moleculares não será totalmente ocupada, e a partir de um nível de energia todos os orbitais acima estarão vazios. Esse espaço entre o mais alto orbital ocupado *Homo*, (banda de valência) e o mais baixo orbital desocupado *Lumo*, (banda de condução) é denominado intervalo de banda ou *band gap*. A condutividade é devida ao preenchimento parcial da banda de condução ou de valência, bem como intervalos de bandas próximos de zero.

Em um semicondutor, o intervalo entre as bandas de valência e de condução é próximo, de forma oposta, em um isolante as bandas estão separadas por um grande intervalo de energia (Figura 11).

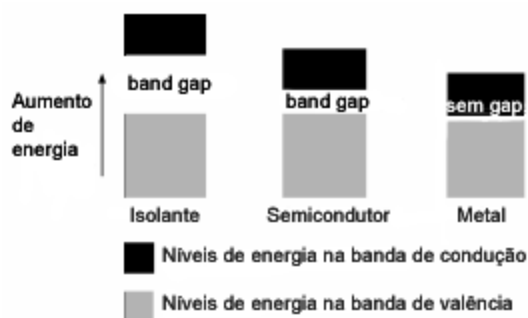


Figura 11. Diferença entre intervalos de bandas (THE NOBEL PRIZE, 2000).

Estruturalmente, os polímeros condutores possuem uma cadeia orgânica alternada entre ligações simples e duplas (HARSANIY, 2000). Várias teorias predizem que os elétrons π são deslocalizados sobre toda a cadeia e que o intervalo entre bandas torna-se menor quanto maior for a extensão da conjugação. (THE NOBEL PRIZE, 2000). Além disso, MacDiarmid e colaboradores (MACDIARMID *et al.*, 1977 *apud* DE PAOLI *et al.*, 2000) demonstraram aumento na condutividade elétrica desses polímeros tratando-os com ácidos ou bases de Lewis, em um processo de adição e remoção de elétrons denominado dopagem, em analogia aos semicondutores inorgânicos. Este processo nada mais é do que reações de oxi-redução envolvendo transporte de íons para dentro e fora do polímero (DE PAOLI *et al.*, 2000).

Uma questão fundamental a ser debatida é a relação entre a resposta eletroquímica das espécies em solução sobre a superfície de eletrodos modificados por polímeros condutores e a localização eletroquímica da reação redox. Do ponto de vista teórico, há pelo menos dois sítios de reações possíveis: (1) a interfase polímero e solução e (2) o eletrodo sólido subjacente e a solução.

A conversão eletroquímica de espécies em solução em eletrodos modificados por polímeros é um processo complexo, existindo pelo menos três processos que interferem na localização da reação, tais como: (i) fluxo de difusão das espécies em solução em uma camada subjacente ao polímero; (ii) reação química redox das espécies difundidas com o material do eletrodo (camada de polímero condutor); (iii) transporte de carga dentro da camada do polímero.

Os dois primeiros processos são caracterizados por reações eletrocatalíticas, enquanto que a terceira é específica para polímeros condutores. Se a taxa total de uma reação química (ii), e o transporte de carga (iii) excederem substancialmente o transporte de massa das espécies da solução ao eletrodo (i), a conversão eletroquímica poderia ocorrer na interface polímero/solução. Este caso refere-se à difusão eletrocatalítica controlada e espera-se uma aceleração da oxidação anódica em espécies com reações redox rápidas, tendo como resultado aumento da corrente anódica e uma sobretensão relativamente baixa. Assim, esta combinação de taxas para os três processos favorece a oxidação anódica eficiente e reversível do analito e poderia ser usada para sua detecção amperométrica no potencial de eletrodo relativamente baixo.

Em caso oposto, quando a reação redox entre o analito e polímero (ii) é lento, ou se a condutividade do polímero for baixa para assegurar um eficiente transporte de carga entre a zona de reação e o eletrodo (iii), a conversão eletroquímica do analito procede no eletrodo suporte. Em alguns casos o polímero retarda a penetração do analito, permitindo a seleção das espécies a serem oxidadas/reduzidas (MALINAUSKAS *et al.*, 2004).

A maioria dos trabalhos nessa linha de pesquisa está direcionado para a construção de filmes condutores ou redox. No entanto, polímeros não-condutores têm mostrado elevado grau de permeseletividade na superfície do eletrodo, formando membranas adequadas para construção de biossensores (PEREIRA *et al.*, 2002).

Outra aplicação é a construção de eletrólitos sólidos poliméricos, os quais são basicamente formados por polímeros não condutores que contêm sais iônicos dissolvidos em sua matriz e o transporte iônico ocorre por meio do movimento segmental da cadeia polimérica (DE PAOLI *et al.*, 2000).

O crescimento de polímeros não-condutores são auto-limitados e conseqüentemente os filmes tendem a serem muito finos, entre 10 a 100 nm, resultando em rápida difusão de substratos e produtos no eletrodo (LONG, 2001).

1.3.2. Filmes formados com 4-aminofenol (4-AF)

É possível encontrar na literatura vários trabalhos envolvendo a formação de filmes poliméricos construídos a partir de monômeros com átomos de oxigênio acoplados ao anel

aromáticos (EKINCI *et al.*, 1996, MENEZES and MAIA, 2006, VIEIRA *et al.*, 2006, FERREIRA *et al.*, 2007, FRANCO *et al.*, 2007, BRITO-MADURRO *et al.*, 2007, FRANCO *et al.*, 2008). Estudos têm comprovado que esses filmes apresentam facilidade de polimerização, além de resistência mecânica do filme obtido, propiciando maior estabilidade para o eletrodo modificado formado.

O estudo de aminofenóis é interessante do ponto de vista eletroquímico, pois apresenta dois grupos oxidáveis ($-NH_2$ e $-OH$) diferentemente da anilina e do fenol. A presença desses grupos funcionais é adequada para imobilização de biomoléculas. Além disso, apesar da diferença estrutural, entre esses três compostos (4-AF, anilina e fenol), existe um comportamento eletroquímico similar, pois tanto a anilina e o fenol são moléculas precursoras na formação de filmes com ampla aplicação em sensores e biossensores. (SALAVAGIONE *et al.*, 2003).

TAJ *et al.*, (1992) reportaram pela primeira vez a formação do primeiro filme de 4-AF em eletrodo de platina, por voltametria cíclica. A partir daí, outros grupos mostraram interesse na formação e na elucidação da estrutura desses filmes, bem como na sua aplicação (SALAVAGIONE *et al.*, 2003).

VIEIRA *et al.*, (2006) também demonstraram a formação de poli(4-AF) sobre eletrodos de grafite em diferentes valores de pH. As análises indicaram que filmes preparados em meio ácido favorecem a transferência de carga. Por outro lado, filmes preparados em meio básico geraram filmes passivantes, os quais dificultam a transferência eletrônica.

BRITO-MADURRO *et al.*, (2007) modificaram eletrodos de grafite com poli(4-AF), o qual indicou ser eficiente para imobilização das biomoléculas; adenosina trifosfato e guanosina trifosfato. A amplitude do sinal de detecção dessas bases foi vinte e quatro vezes maior quando comparado ao eletrodo de grafite não modificado com poli(4-AF).

Estudos (HAWLEY and ADAMS, 1965) sugeriram que a eletrooxidação do poli(4-AF) envolve a saída de dois elétrons e dois prótons, produzindo quinoneimina seguida por hidrólise, produzindo *p*-benzoquinona (figura 12). Em maiores valores de pH, os autores sugerem reações de acoplamento 1-4 e posteriormente a formação do polímero.

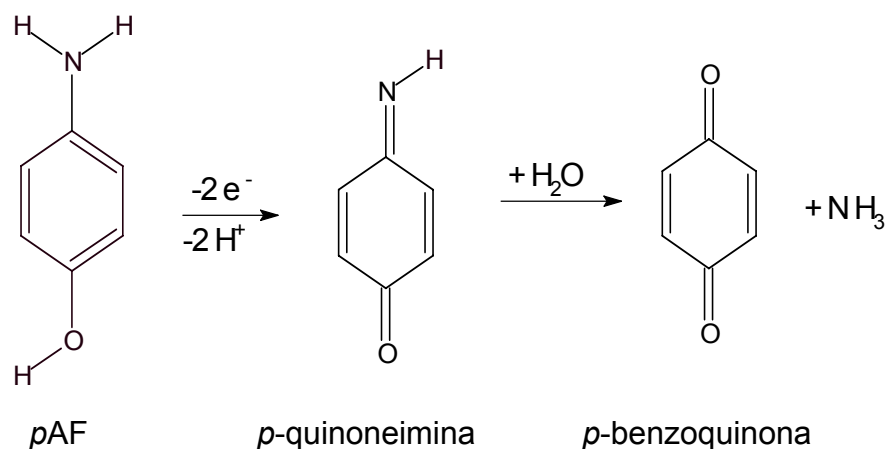


Figura12. Estruturas do processo de oxidação eletroquímica e processo químico do pAF.

A mesma proposta mecanística foi descrita por MENEZES and MAIA (2006) em estudos de filmes derivados de 4-aminofenol sobre superfície de platina, em diferentes valores de pH. Os polímeros produzidos indicaram diferentes valores de retenção de carga em função do pH que estão relacionados com grande número de ligações fenil-N-fenil (figura 13).

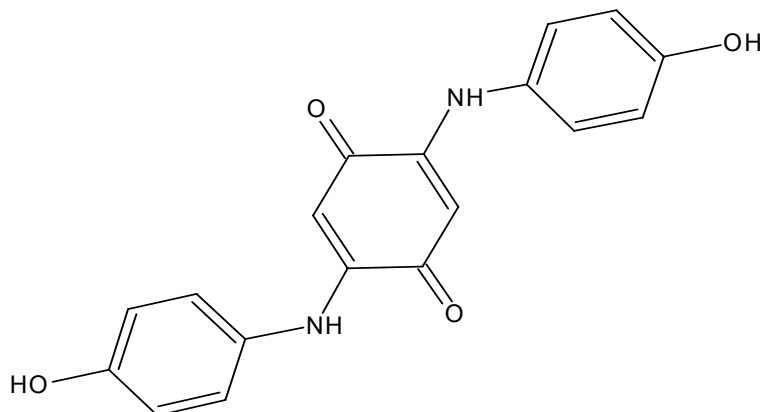


Figura 13. Proposta para acoplamento 1-4 via nitrogênio

Teoricamente esta característica é favorável à imobilização de biomoléculas, como DNA, por meio de interação entre grupos fosfato da estrutura do DNA e o esqueleto do polímero ou ligações covalentes entre os grupos funcionais da biomolécula e polímero, sendo uma etapa fundamental na construção do biossensor.

Para a modificação da superfície do eletrodo, análise e desenvolvimento do biossensor eletroquímico desenvolvido podem ser utilizadas algumas técnicas, descritas abaixo.

1.4. Técnicas eletroquímicas

1.4.1. Voltametria cíclica e pulso diferencial

Técnicas voltamétricas englobam um grupo de métodos eletroanalíticos em que as informações sobre o analito são obtidas através da medida de intensidade de corrente como função do potencial. A voltametria cíclica (VC) consiste na aplicação ao eletrodo de trabalho de um repetitivo potencial triangular variando continuamente com o tempo, o que conduz a ocorrência de reações de oxidação e redução de espécies eletroativas em solução. Este método tem sido extensivamente usado, para obter informações qualitativas sobre o comportamento eletroquímico de filmes poliméricos depois da eletropolimerização, e para identificar espécies presentes na solução. Outra técnica, mais poderosa é a voltametria de pulso diferencial (VPD). A polarização da superfície do eletrodo é feita aplicando-se pulsos de potencial. Ao mesmo tempo, a corrente é amostrada imediatamente antes e depois de cada pulso sendo o valor final de corrente a diferença entre os dois valores medidos.

Para este tipo de análise são utilizados três eletrodos. O indicador, conhecido como eletrodo de trabalho onde são medidos os processos redox de interesse. O eletrodo de referência, de potencial conhecido e constante, é a referência em relação a qual o potencial do eletrodo de trabalho pode ser medido. E o eletrodo auxiliar (também chamado de contra-eletrodo) é onde também ocorre os processos redox e o fechamento do circuito elétrico.

1.4.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A impedância baseia-se na aplicação de uma pequena perturbação senoidal de tensão ao sistema, de pequena amplitude e de frequência ω , gerando assim uma corrente AC provocado por um potencial $E = \sin(\omega t)$ que, de acordo com a lei de Ohm, origina a impedância, $Z = [\Delta E \sin(\omega t)]/R$ (GIROTTI and DE PAOLI, 1999).

Os resultados da técnica de impedância são normalmente apresentados na forma de gráficos que relacionam os parâmetros de frequência de excitação(f), em Hz, ângulo de fase, magnitude e componentes real e imaginário da impedância. A representação utilizada, neste trabalho foi o diagrama de Nyquist que representa os valores da componente real (Z') *versus* componente imaginário (Z''). A principal característica desse diagrama é a clareza com que pode ser visualizado os efeitos de resistência ôhmica do sistema.

A análise desse sistema é realizada comparando o sistema eletroquímico estudado com um circuito elétrico equivalente, formado pela combinação de resistores e capacitores. Este circuito deve conter, pelo menos, componentes para representar; a dupla camada elétrica: um capacitor de capacidade Q_{dl} ; a impedância dos processos faradaicos, relativo a transferência de carga ou transporte de massa das espécies eletroativas conhecido por impedância de warburg, representado por Z_f e Z_w . E por fim, a resistência não compensada, ou seja, a resistência da solução entre os eletrodos de trabalho e de referência representado por R_Ω . O sistema mais simples contendo, R_s , Q_{dl} , R_{ct} Z_w é conhecido como o circuito de Randles.

1.4.3. Microbalança de Cristal de Quartzo

Esta técnica, eletrogravimétrica, consiste basicamente de um disco de cristal de quartzo piezoelétrico parcialmente recoberto em ambas faces com um filme metálico fino. As faces deste cristal são conectadas a um circuito elétrico que aplica um sinal de corrente alternada, gerando assim um campo elétrico que causa a vibração do cristal a uma determinada frequência de ressonância, f .

Quando uma das faces do cristal é colocada em contato com uma solução eletrolítica, esta face passa a ter a função de eletrodo de trabalho, como em uma célula eletroquímica convencional.

As sensíveis mudanças de massa ocorrida na superfície do eletrodo são investigadas monitorando as variações de frequência do cristal utilizando a equação de Sauerbrey (SAUERBREY, 1959) para obter a relação massa/frequência.

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\mu_c \rho_c}} \quad (3)$$

Onde Δf é a variação da frequência de ressonância, f é a frequência de ressonância fundamental do cristal, Δm é a variação de massa na superfície do eletrodo, μ é o módulo de cisalhamento do cristal, ρ é a densidade do cristal e A é a área geométrica do eletrodo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Desenvolver sensor bioeletroquímico baseado em sondas de DNA para detecção do bacilo *M. leprae*.

2.2. Objetivos específicos:

- Construção e caracterização de filmes poliméricos derivados de 4-aminofenol;
- Incorporação de bases nitrogenadas do DNA, adenina, timina, citosina, guanina ao eletrodo sem filme e eletrodo modificado com filme polimérico;
- Incorporação ao suporte polimérico de produtos de PCR da região conservada do genoma do bacilo *M. leprae*;
- Detecção do alvo complementar e avaliação do desempenho eletroquímico do sensor utilizando-se mediadores ou indicadores;
- Análise da superfície do eletrodo modificado com filme polimérico contendo DNA imobilizado, utilizando-se microscopia de força atômica.

3. Parte Experimental

- 4-aminofenol (C_6H_7NO), 97,5%, Across organics, P.M.= 109,13 g. mol⁻¹
- Ácido nítrico (HNO_3), 65%, Cinética, P.M.= 63,01 g.mol⁻¹
- Ácido perclórico ($HClO_4$), 70%, A.C.S, P.M.= 100,46 g.mol⁻¹
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4), 98%, Merck, P.M.= 98,08 g.mol⁻¹
- Ácido acético glacial (CH_3COOH), 100%, A.C.S. P.M.= 60,05 g.mol⁻¹
- Hidróxido de sódio ($NaOH$), 100%, Vetec, P.M.= 40,00 g.mol⁻¹
- Nitrato de potássio (KNO_3), A.C.S, P.M.= 101,10 g.mol⁻¹

- Ferrocianeto de potássio $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, 100%, Vetec, P.M.= $422,39 \text{ g.mol}^{-1}$
- Ferricianeto de potássio $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 100%, Reagen, P.M.= $329,25 \text{ g.mol}^{-1}$
- Fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4), 100%, P.M.= $119,98 \text{ g.mol}^{-1}$
- Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4), 100%, Vetec, P.M.= $141,96 \text{ g.mol}^{-1}$
- Acetato de sódio anidro (CH_3COONa), 100%, Vetec, P.M.= $82,03 \text{ g.mol}^{-1}$
- Éter de petróleo ($\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_2$), 100%, Biotec, P.M.= $236,45 \text{ g.mol}^{-1}$
- Acetona (CH_3OCH_3), 100%, A.C.S, P.M.= $58,08 \text{ g.mol}^{-1}$
- Guanina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$) 99%, Acros Organics, P.M.= $151,13 \text{ g.mol}^{-1}$
- Adenina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5$), 99,5%, Acros Organics, P.M.= $135,13 \text{ g.mol}^{-1}$
- Timina ($\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$), 99%, Acros Organics, P.M.= $126,11 \text{ g.mol}^{-1}$
- Citosina ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}_3\text{O}$), 99%, Acros Organics, P.M.= $111,1 \text{ g.mol}^{-1}$
- Ferrocenocarboxialdeído ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{OFe}$), 100%, Fluka, P.M.= $214,05 \text{ g.mol}^{-1}$
- Metanol (CH_3OH), 99,9%, Merck. P.M.= $32,04 \text{ g.mol}^{-1}$
- Azul de metileno ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$) P.M.= $319,85 \text{ g.mol}^{-1}$
- Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{ClH}$), 99%, GiBcoBRL, P.M.= $157,64 \text{ g.mol}^{-1}$
- Ácido etilenodiamino tetra-acético ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 100%, Vetec, P.M.= $372,54 \text{ g.mol}^{-1}$
- Citrato de sódio ($\text{N}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 100%, Reagen. P.M.= $294,11 \text{ g.mol}^{-1}$
- Cloreto de sódio (NaCl), 100%, Biotec. P.M.= $58,44 \text{ g.mol}^{-1}$

Os reagentes foram utilizados conforme recebidos. Para os estudos eletroquímicos foi utilizada uma célula eletroquímica de três compartimentos. Como eletrodo auxiliar foi utilizado uma placa de platina de 2cm^2 de área aparente. Todos os potenciais são referidos a um eletrodo de calomelano saturado. O eletrodo de trabalho utilizado foi um disco de grafite (6mm de diâmetro), **figura 14A**. Um sistema contendo a célula de três compartimentos e os eletrodos citados acima, está ilustrado na **figura 14B**.

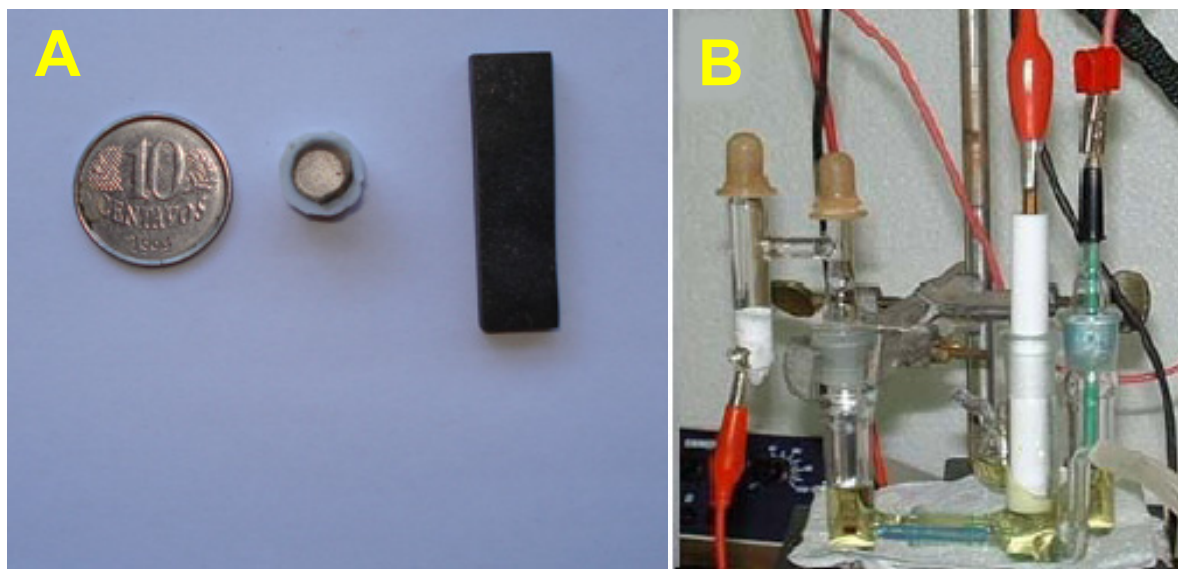


Figura 14. Materiais utilizados para estudos eletroquímicos A: eletrodo de grafite e barra de grafite B: cela de três compartimentos com respectivos eletrodos de trabalho, auxiliar e referência.

A vidraria utilizada para os experimentos eletroquímicos foi deixada em banho de ácido nítrico concentrado por aproximadamente 24 horas e a seguir, lavada com água deionizada.

Para as medidas eletroquímicas foi utilizado um potenciostato CH Instruments modelo 1120 A (**figura 15A**). Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas utilizando um Autolab PGSTAT20 (Eco Chemie, Holland) equipado com FRA (Frequency Response Analyzer) (**Figura 15B**). Uma politriz Aropol 2V da Arotec (**figura 15C**) foi utilizada para polimento mecânico dos eletrodos de trabalho.

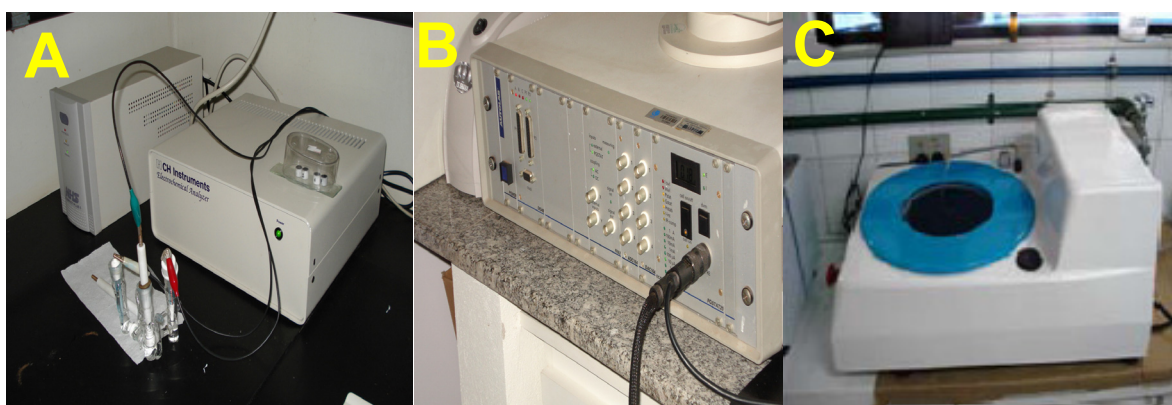


Figura 15. Equipamentos utilizados para os experimentos eletroquímicos e para limpeza dos eletrodos.

Para os estudos com a MECQ, foi utilizado um potenciostato da CH Instruments Modelo 420A para as medidas de variação de frequência do cristal de quartzo. O eletrodo de trabalho foi um cristal de quartzo de 13,7 mm de diâmetro (corte AT), com o recobrimento, em ambas as superfícies, com uma película de ouro com 5,11 mm de diâmetro. Um fio de platina de 1cm de comprimento foi usado como eletrodo auxiliar e um eletrodo de prata/cloreto de prata ($\text{Ag/AgCl/KCl } 3,5 \text{ mol.L}^{-1}$) como eletrodo de referência. O sistema foi conectado a uma célula eletroquímica de teflon com capacidade de 4ml. Os eletrodos auxiliar e referência foram conectados ao potenciostato e os dois contatos elétricos do eletrodo de trabalho conectados a um frequencímetro.

Água deionizada foi obtida de um ultrapurificador microprocessado Master System Gehaka. Medidas de pH foram realizadas utilizando pHmetro Digital PG1800. Para remoção de partículas dos eletrodos e preparo de soluções foi utilizado um ultra-som Ultrasonic Cleaner 1450 USC.

Para determinação da massa de polímero foi utilizada uma balança com cinco casas decimais, Shimadzu AUW220D.

Os produtos de PCR foram quantificados em um espectrofotômetro da Shimadzu UV-1650PC com duplo feixe e amplificados em termociclador Modelo TC412, Techne, Barloworld Scientific Ltd.

Os espectros de infravermelho das amostras foram obtidos através de FTIR (Fourier Transforme Infrared) em um Perking Elmer Spectrum 1000 (**figura 16A**), resolução de 4 cm^{-1} , em pastilha de KBr. As superfícies modificadas dos eletrodos foram analisadas em microscópico de força atômica Nanoscope IIIa da Digital Instruments (**figura 16B**).

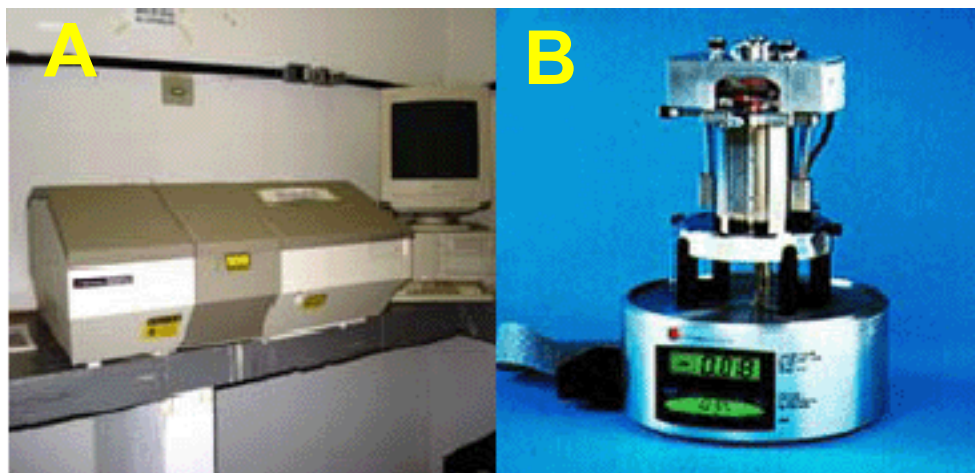


Figura 16. Equipamentos utilizados para os experimentos de infravermelho e para análise morfológica dos eletrodos modificados. As análises de MFA foram realizadas no Instituto de Física USP/São Carlos.

4. Metodologia

4.1. Pré-tratamento dos eletrodos

O eletrodo auxiliar de platina foi aquecido até sua superfície apresentar uma coloração avermelhada indicando a remoção de resíduos orgânicos na superfície.

O eletrodo de trabalho de carbono grafite foi polido em uma politriz. Em seguida foi polido em feltro, ambos contendo suspensão de alumina ($0,30\ \mu\text{m}$). Após esse tratamento os eletrodos foram levados a um ultra-som para remoção de partículas residuais de alumina.

4.2 Preparo de soluções utilizadas

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água deionizada. Soluções padrão contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foram preparadas utilizando-se $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($5 \times 10^{-3}\ \text{mol.L}^{-1}$) / $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ($5 \times 10^{-3}\ \text{mol.L}^{-1}$) em $0,1\ \text{mol.L}^{-1}$ de KNO_3 .

A solução do monômero 4-aminofenol ($2,5 \times 10^{-3}\ \text{mol.L}^{-1}$) foi preparada em solução aquosa de ácido perclórico $0,5\ \text{mol.L}^{-1}$.

Tampão de imobilização do DNA (tampão TE) foi preparado com Tris-HCl 10×10^{-3} mol.L⁻¹, pH 8,0, contendo EDTA 1×10^{-3} mol. L⁻¹.

Tampão de hibridação utilizado (tampão SSC) foi preparado com citrato de sódio 9×10^{-2} mol.L⁻¹, pH 7,0 contendo NaCl 0,9 mol.L⁻¹.

Tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 4,5, e monofosfato/difosfato de sódio 0,1 mol. L⁻¹, pH 7,4, foram utilizados como eletrólitos para detecção eletroquímica das biomoléculas.

Soluções de indicadores de hibridização foram preparadas utilizando-se ferrocenocarboxaldeído $4,8 \times 10^{-3}$ mol. L⁻¹ diluído em metanol ou azul de metileno 20×10^{-3} mol. L⁻¹ em NaCl 20×10^{-3} mol.L⁻¹.

4.3. Voltametrias cíclica e de pulso diferencial

Para as medidas eletroquímicas (voltametrias cíclica e de pulso diferencial) a solução de eletrólito foi desoxigenada durante 1 hora utilizando-se N_{2(g)} grau analítico.

Os eletrodos polidos foram transferidos para a célula eletroquímica, contendo a solução com o par redox K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆ previamente desoxigenada. Foram feitos voltamogramas cíclicos variando-se o potencial entre -0,10V a +0,50 V a uma velocidade de varredura de 100mV. s⁻¹.

Após esse processo, os eletrodos foram lavados, secos e transferidos para uma célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte na ausência do monômero. A velocidade de varredura foi de 50 mV.s⁻¹ em todos os experimentos.

A seguir, os eletrodos foram transferidos para a célula eletroquímica contendo o monômero 4-aminofenol. A eletropolimerização foi realizada com sucessivas varreduras variando-se o potencial limite entre 0 a 0,64V vs. ECS a temperatura ambiente (25±1°C).

Os eletrodos modificados foram, em seguida, transferidos para a célula eletroquímica contendo o par redox K₃Fe(CN)₆ / K₄Fe(CN)₆ com o objetivo de analisar as diferenças eletroquímicas no eletrodo modificado.

4.4. Microbalança eletroquímica de cristal de quartzo

O eletrodo de quartzo foi lavado com éter de petróleo, acetona e água deionizada, respectivamente e seco com nitrogênio ultra-puro. Um tratamento eletroquímico foi realizado antes da eletropolimerização, variando o potencial entre -0,25 e +1,25V em uma solução de ácido sulfúrico 0,2 mol.L⁻¹ para o polimento eletroquímico do eletrodo de ouro. A solução contendo o monômero foi deaerada durante 40 minutos por borbulhamento de N_{2(g)} antes do experimento. A medida de frequência *versus* potencial foi realizada concomitante à voltametria cíclica. O experimento foi realizado com uma velocidade de varredura de 50mV/s, 10 ciclos.

A equação de Sauerbrey, descrita anteriormente (item 1.4.3) foi utilizada para calcular as mudanças de massa no cristal de quartzo através da medida da variação da frequência, $A = 0,205 \text{ cm}^2$, $\rho = 2,648 \text{ g.cm}^{-3}$, $\mu = 2,947 \times 10^{11} \text{ g.cm}^{-1}.\text{s}^{-2}$, O valor de f_0 para o experimento foi de 7,987 MHz (f_0 deve estar entre 7,995 MHz e 7,950 MHz).

4.5. Determinação da massa depositada de poli(4-aminofenol)

Antes da eletropolimerização, as barras de grafite (3,5 cm; 1,0 cm; 0,5 cm) foram mecanicamente polida com suspensão de alumina (0,3 μm), lavado com água deionizada em um ultra-som para retirada das partículas de alumina, em seguida com éter de petróleo, acetona e novamente com água deionizada, seco em dessecador a vácuo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, até atingir uma massa constante (m_1).

A solução contendo o monômero foi deaerada com N_{2(g)}, por borbulhamento antes da eletropolimerização. Em seguida o 4-aminofenol foi eletropolimerizado sobre a barra de grafite em solução de HClO₄ com sucessivas varreduras de potencial.

O eletrodo modificado foi lavado com água deionizada para remover o monômero residual, seco em um dessecador sobre vácuo a temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) até atingir a massa constante (m_2). A massa do polímero foi determinada por diferença entre as massas (massa polímero = $m_2 - m_1$).

4.6. Estabilidade térmica do poli(4-aminofenol)

A estabilidade térmica de poli(4-aminofenol) foi avaliada em função do tratamento térmico. A cada 5 minutos em um período de 2 horas, o eletrodo foi mantido à temperatura de $(98 \pm 1^\circ\text{C})$, a seguir foi submetido à varredura de potencial no eletrólito suporte entre +0,30 a +0,55V *vs.* ECS. Um experimento controle foi realizado, utilizando-se um eletrodo modificado com filme polimérico, submetendo-o a sucessivas varreduras de potencial, sem o tratamento térmico.

4.7. Espectroscopia de infravermelho

Eletrodos de barra de grafite foram utilizados para produção dos filmes para serem analisados por infravermelho. Depois de formado, o filme foi solubilizado por imersão do eletrodo em acetonitrila durante 1 hora em ultra-som. A solução foi concentrada em um evaporador rotatório e o produto resultante foi transferido para um dessecador, sobre vácuo, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, antes da análise por infravermelho feitas em pastilha de KBr.

4.8. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

Os espectros de impedância foram realizados usando o mesmo sistema em uma célula de três compartimentos, contendo o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. As medidas para cada eletrodo foram feitas variando-se a faixa de frequência entre 100 KHz e 0,01 Hz usando-se um sinal de excitação senoidal com uma amplitude de excitação de 5mV. Os espectros de impedância foram ajustados para um circuito elétrico equivalente usando um programa Autolab 4.9.

4.9. Microscopia de força atômica

As microscopias de força atômica foram realizadas em eletrodos limpos, modificados com filmes poliméricos com e sem biomoléculas imobilizadas. A espessura e a rugosidade do filme foram determinadas seguindo procedimento proposto por LOBO *et al.*, 1999.

4.10. Dosagem do DNA

Para a dosagem de DNA foram utilizados cubetas de quartzo, espectrofotômetro ultravioleta-visível de duplo feixe e leituras de absorbância em 260 nm. No comprimento de onda de 260 nm, uma unidade de densidade óptica corresponde a 50 µg.mL de DNA fita dupla. A concentração e integridade do DNA também foram estimadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% de acordo com SAMBROOK *et al.*, 1989.

4.11. Análise molecular de gene específico para hanseníase

A reação em cadeia da polimerase foi feita em um volume final de 25 uL contendo 200 µmol.L⁻¹ de dNTPs, 1,6 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, tampão 1X, 10 pmol *de primers sense*: 5' GCA GGC GTG AGT GTG AGG AT 3' e *anti-sense*: 5' CGA CAC CTC AAG GCC ATG AC 3', 1 U de Taq Platinum, 400 ng de DNA genômico. Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen Life Technology.

Tampão 1X: Tris-HCl 200 mmol.L⁻¹, pH 9.0.

Após o preparo da mistura reacional para PCR, a reação de sequenciamento foi feita no seguinte ciclo de PCR:

95° C 1 minuto
58° C 20 segundos
72° C 30 segundos - Repetição por 36 ciclos
72° C 10 minutos
4° C 10 minutos

Ao término da ciclagem, as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8%

O produto de PCR obtido, sequência abaixo (RLEP3), foi utilizado como sonda para as etapas de imobilização e detecção do analito.

5' – GCAGGCGTGAGTGTGAGGATAGTTGTTAGCGCCGCGGGGTAGGGGCGTTTTAG
3' – CGTCCGCACTCACACTCCTATCAACAATCGCGGCGCCCCATCCCCGAAAATC

TGTGCATGTCATGGCCTTGAGGTGT– 3'
ACACGTACAGTACGGGAACCTCCACT– 5'

A sequência abaixo foi utilizada como alvo não complementar.

5' – CACGTAAGCATGTCGGTGGTGGATGCTGCTTGGTCTACATGTTGATGATGCC
AGGGGCTGGGCACCTGGGCTGTGCTGAAGGCGATATC – 3'

A análise da sequência nucleotídica foi feita utilizando-se o programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Acess number	Sequences producing significant alignments	Score (Bits)	E Value
gb U00010.1 	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B1170	74.9	3e-12
gb U00021.1 	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid L247	74.9	3e-12
emb AL583917.1 MLEPRTN1	<i>Mycobacterium leprae</i> strain TN complete	74.9	3e-12
gb U15183.1 MLU15183	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B1740	74.9	3e-12
gb U15187.1 MLU15187	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid L296	74.9	3e-12
gb L78829.1 MSGB998CS	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B998 DNA seque	74.9	3e-12
gb L78825.1 MSGB1723CS	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B1723 DNA seq	74.9	3e-12
gb L78823.1 MSGB13GS	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B13 DNA sequenc	74.9	3e-12
gb L78818.1 MSGB32CS	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B32 DNA sequenc	74.9	3e-12
gb L78817.1 MSGB27CS	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B27 DNA sequenc	74.9	3e-12
gb L78812.1 MSGB1229CS	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid B1229 DNA seq	74.9	3e-12
emb Z97179.1 MLCL383	<i>Mycobacterium leprae</i> cosmid L383	74.9	3e-12

4.12. Imobilização e detecção das bases nitrogenadas

Eletrodos modificados com purinas e pirimidinas foram preparados aplicando sobre o eletrodo modificado com poli(4-aminofenol), 15 µL de solução estoque dessas bases e em seguida colocados em um dessecador sobre vácuo a 25±1°C por 4 horas. Depois de imobilizadas, as bases foram detectadas por voltametria de pulso diferencial ou voltametria cíclica, usando-se tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 4,5 ou tampão monofosfato/difosfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, pH 7,4 como solução eletrolítica.

4.13. Imobilização e detecção de RLEP3

Para imobilização dos produtos de PCR foram realizadas as seguintes etapas:

I) Imobilização da simples fita do DNA

Primeiramente o DNA (PCR) foi desnaturado a 98°C por 5 minutos, em banho-maria. Ao mesmo tempo, o eletrodo modificado foi aquecido na estufa a 98°C por 3 minutos.

Em seguida, 15µL do DNA desnaturado foi gotejado sobre a superfície do eletrodo e mantido na estufa por mais 3 minutos a 98°C. Após esse tempo, a superfície do eletrodo foi lavada por imersão em tampão fosfato, pH 7,4, com agitação (100 rpm), durante 5 segundos, depois seco com N₂ ultra-puro.

Posteriormente, 15µL da solução do indicador foram gotejados sobre a superfície do eletrodo, e mantido durante 5 minutos. A seguir, o eletrodo foi lavado em tampão fosfato e seco como descrito anteriormente.

A detecção eletroquímica foi feita por VC ou VPD utilizando-se tampão fosfato pH 7,4 como solução eletrolítica.

II) Hibridização do alvo complementar e não complementar do DNA

Após a imobilização da simples fita o eletrodo foi aquecido a 42°C na estufa durante 3 minutos. Concomitantemente, o DNA foi desnaturado em banho-maria a 98°C por 5 minutos. De acordo com a literatura (WANG; 2000), elevada sensibilidade pode ser atingida conduzindo-se a hibridação a 42°C.

Em seguida, 15µL da solução desnaturada foram gotejados na superfície do eletrodo, o qual foi mantido na estufa a 42°C em tempos diferentes, lavado com tampão fosfato, pH 7,4, e seco como descrito acima. Posteriormente foram gotejados na superfície do eletrodo, 15µL da solução do indicador e deixado em contato com a superfície por 5 minutos. Em seguida, a superfície do eletrodo foi lavada com tampão fosfato e seco como descrito anteriormente.

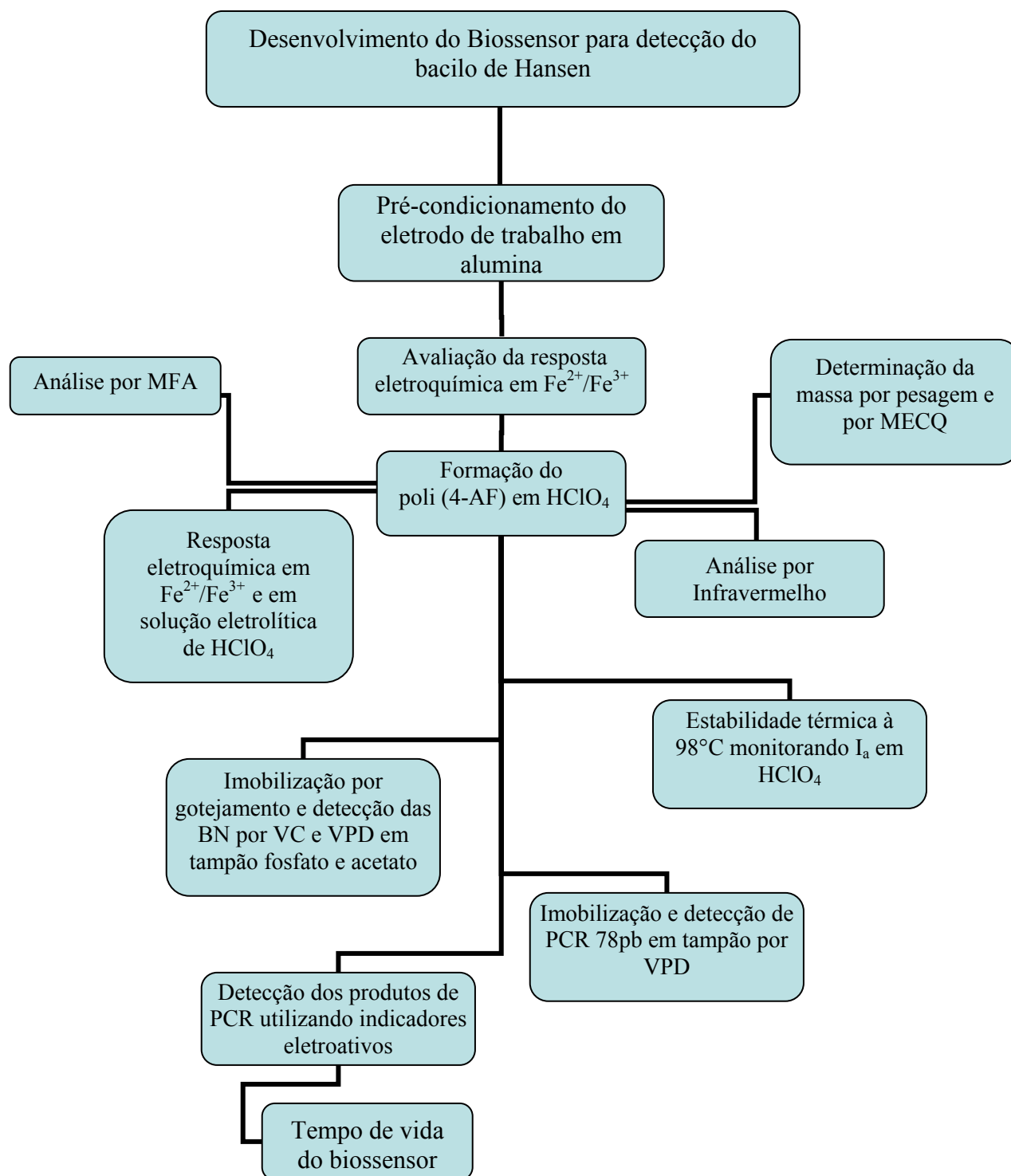
Detectou-se eletroquimicamente por VC ou VPD utilizando-se tampão fosfato pH 7,4,

como solução eletrolítica.

4.14. Tempo de vida do biossensor

Foi avaliado o tempo de vida do biossensor por um período de dois meses. Os eletrodos contendo a simples fita imobilizada (*ssDNA*) foram armazenados em geladeira a 4°C, protegidos da luz. Nesse período foi avaliada sua resposta eletroquímica seguindo o procedimento 4.13 (II) a cada dez dias.

4.15 Resumo do procedimento utilizado na construção do biossensor



5. Resultados e discussão

5.1. Estudos de formação de poli(4-aminofenol)

Os eletrodos de grafite foram avaliados frente ao par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ utilizando-se voltametria cíclica. Os eletrodos adequados para os estudos eletroquímicos seguiram o perfil observado na figura 17. A carga elétrica (coulombs) foi calculada integrando-se o voltamograma [corrente (A) vs. potencial (V)/velocidade de varredura (V.s^{-1})]. O valor de carga obtido para este voltamograma foi $1,9 \times 10^{-3} \text{ C}$ e todos os eletrodos utilizados seguiram este valor de carga elétrica com coeficiente da variação de 5%.

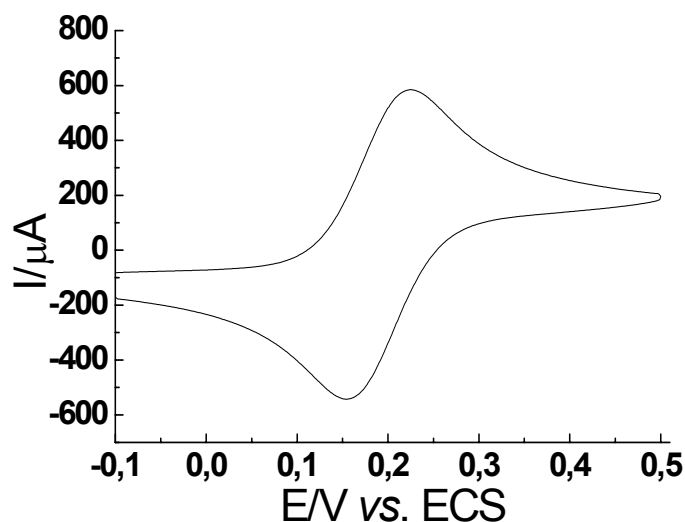


Figura 17. Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, 100 mV.s^{-1} .

A formação de poli(4-aminofenol) foi feita em solução de ácido perclórico, 50 mV.s^{-1} , variando-se os potenciais anódicos limites entre 0 V a $+0,64 \text{ V vs. ECS}$ (figura 18 I). Na primeira varredura (figuras 18 I e 18 II) pode-se observar um processo redox reversível em potenciais $E_a = +0,54 \text{ V}$ e $E_c = +0,51 \text{ V}$, o que sugere que o processo não é seguido de uma reação química rápida. Nas próximas varreduras de potencial é observado crescimento de um pico em potenciais mais baixo $E_a = +0,45 \text{ V}$ e $E_c = +0,42 \text{ V}$, sugerindo formação de material eletroativo na superfície do eletrodo.

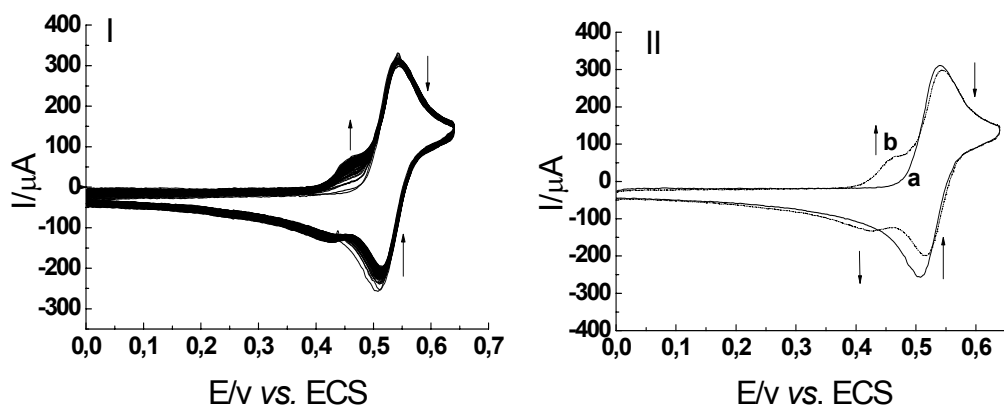


Figura 18. (I) voltametrias cíclicas sucessivas de eletrodo de grafite em solução contendo 4-aminofenol $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ sobre eletrodo de grafite, 100 varreduras, 50 mV.s^{-1} . (II) Primeiro (a) e centésimo (b) voltamograma cíclico.

O crescimento da onda em $+0,45 \text{ V}$ é resultado do aumento da extensão de conjugação no polímero, resultando em menor potencial de oxidação, se comparado com o monômero.

Pode-se sugerir, no primeiro pico de oxidação (figura 18 II), a adsorção de 4-aminofenol seguido da primeira transferência eletrônica e perda do primeiro próton. A seguir, o radical adsorvido é submetido à segunda perda eletrônica e de mais um próton, formando 4-quinoneimina (MENEZES and MAIA, 2006). Posteriormente a quinoneimina é hidrolisada a 4-benzoquinona (HAWLEY and ADAM, 1965; MENEZES and MAIA, 2006) que reage com 4-aminofenol via adição 1,4 resultando em produto pouco solúvel que precipita na superfície do eletrodo (figura 12). A partir de reações sucessivas forma-se o filme polimérico. Concomitantemente, as ondas de oxi-redução do 4-aminofenol apresentam apenas um pequeno decréscimo, sugerindo dificuldade de adsorção do monômero 4-aminofenol à superfície do eletrodo já modificada.

É importante ressaltar que em valores de pH abaixo de 5,3 os grupos NH_2 estão protonados, formando filmes com estes grupos funcionais contendo cargas positivas.

A resposta eletroquímica frente ao par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ou em solução do eletrólito suporte, ácido perclórico, foram avaliados (figuras 19 e 20).

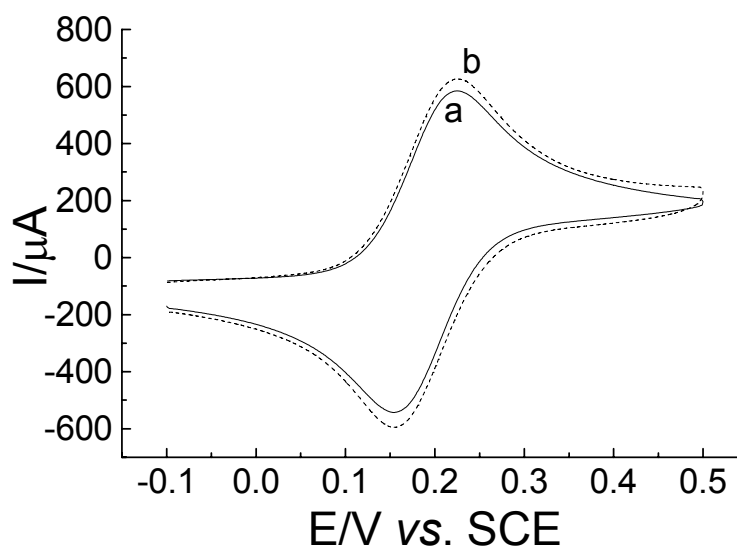


Figura 19. Voltamograma cíclico de eletrodo de grafite sem filme (a) e modificado (b) com poli(4-aminofenol), ambos em solução contendo $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ e $0,1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, 100 mV.s^{-1} .

Observou-se que o filme polimérico auxilia a transferência de elétrons entre o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Analisando-se os valores de carga entre os voltamogramas padrões e as superfícies modificadas com filme polimérico foi observado aumento de $12 \pm 2\%$ no valor de carga no eletrodo modificado em relação ao eletrodo não modificado (figura 19).

Picos redox em $+0,27\text{V}$, $+0,46\text{V}$ e $+0,45\text{V}$ foram observados na presença do eletrólito suporte para eletrodo de grafite modificado com filme polimérico (figura 20). Este comportamento sugere a modificação da superfície do eletrodo de grafite.

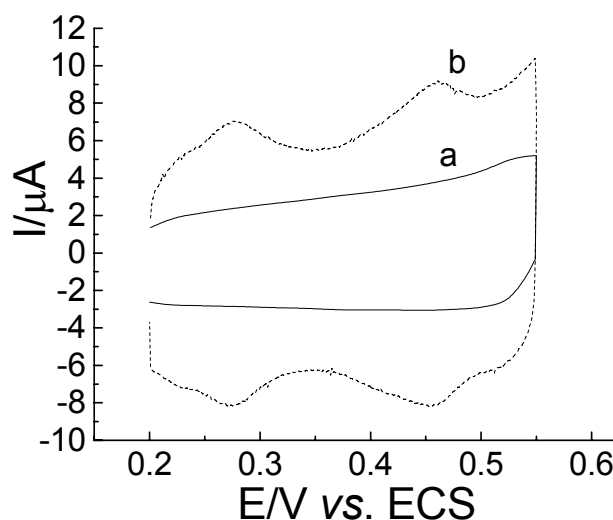


Figura 20. Voltamograma cíclica de eletrodo de carbono grafite sem filme (a) e modificado com poli(4-aminofenol), 100 varreduras (b) em solução aquosa de HClO_4 $0,5 \text{ mol/L}^{-1}$, 50 mV.s^{-1} .

Mais de um estado redox também pode ser observado nos voltamogramas de eletrodeposição de polianilina ou poli-metilanilina quando estudados em solução eletrolítica de formação do filme na ausência do monômero em meio ácido (WEI *et al.*, 2005). Esse comportamento está relacionado a diferentes estados de oxidação da molécula, figura 21, o qual pode ser atribuído a diferentes estados redox que aparecem no filme em

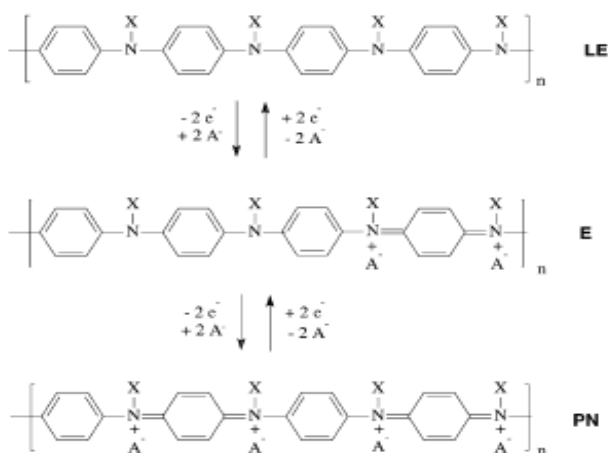


Figura 21. Diferentes estados redox para poli(metanilina) (LE) Leucoemeraldina, (E) emeraldina e (PN) pernigranilina (WEI *et al.*, 2005).

função das modificações impostas pelo potencial.

Isso possibilita propor que poli(4-aminofenol) possui estados de oxidação intermediários antes do estado mais oxidado, como no caso da poli(metilanilina). Este polímero possui a emeraldina como estado intermediário antes do estado mais oxidado, pernigranilina.

5.2. Determinação da massa de poli(4-aminofenol)

Para calcular o rendimento eletroquímico do polímero foi necessário supor que o poli(4-aminofenol) polimeriza, formando ligações entre o anel aromático e NH_2 ou OH , produzindo cadeias lineares.

A massa do polímero formado, carga da oxidação do monômero e o rendimento eletroquímico obtidos estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de massa do polímero, carga e rendimento eletroquímico para 4-aminofenol sobre a superfície de grafite.

Monômero	Massa do polímero (mg)	Carga (Coulombs)	Rendimento eletroquímico
4-aminofenol	0,05	1,71	1,3

O rendimento eletroquímico da polimerização indica uma quantidade razoável de produto formado na eletropolimerização de 4-aminofenol.

5.2.1. Determinação da massa do poli(4-aminofenol) utilizando MECQ

A figura 22 representa os gráficos experimentais de voltametria cíclica (A) e o perfil massa *versus* potencial (B) calculada a partir da equação (3) dos resultados obtidos de frequência. Os voltamogramas foram realizados em ácido sulfúrico como eletrólito suporte ao invés de ácido perclórico, para evitar a adsorção de íons perclorato. Além disso, Snook e colaboradores (SNOOK *et al.*, 2002) classificaram as reações interfaciais usando a

microbalança em cinco classes e uma delas se refere aos processos não-faradaicos que são associados a variações de massa com adsorção específica de íons perclorato sobre a superfície de ouro. A concentração também é menor ($0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ ao invés de $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$) para evitar o surgimento de cromo na superfície do eletrodo. Essa preocupação é devido aos eletrodos de ouro serem manufaturados sobre este metal para promover a aderência da camada de ouro com o quartzo (VARELA *et al.*, 2000) Mais do que isso, Shiu e colaboradores (SHIU *et al.*, 1998) estudaram a eletropolimerização da 2-fenilenodiamina usando diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Os melhores resultados foram obtidos em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ do que em $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ devido à acidez e à presença de excesso de ânions sulfato mostrando um decréscimo na cobertura da superfície de sítios eletroativos no eletrodo de ouro.

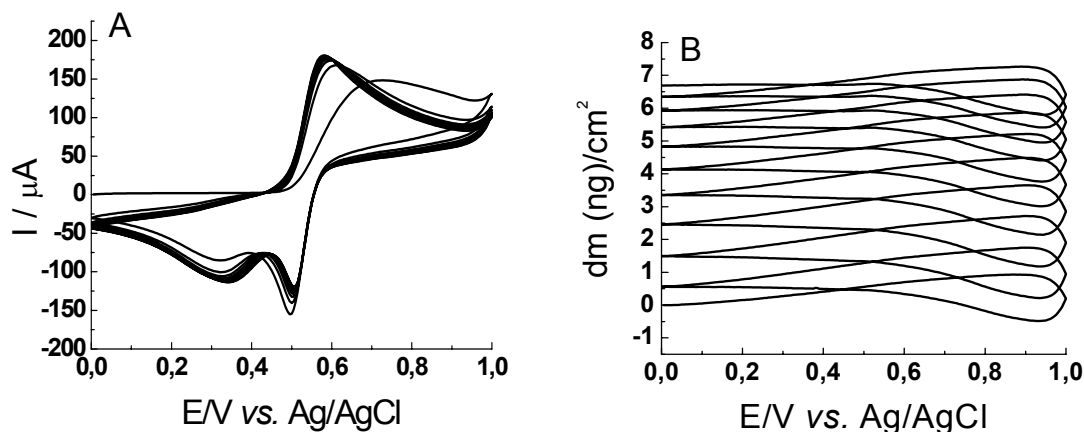


Figura 22: (A) perfil i/E para 10 ciclos da eletropolimerização de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de 4-aminofenol em $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 , 50 mV/s . (B) perfil dm/E para 10 ciclos da eletropolimerização de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de 4-aminofenol em $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ de H_2SO_4 , 50 mV/s .

Como pode ser visto no gráfico 22B, o aumento global de massa é muito pequeno, mostrando um acréscimo total de $6,69 \text{ ng}$ com 10 varreduras sucessivas de potencial. Isso corrobora os dados obtidos em eletrodo de grafite em solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ e os dados de MFA mostrando eletrodo com pouca modificação de um filme polimérico derivado de 4-aminofenol. A pouca variação na massa, consequentemente, pouca variação na queda de frequência nos permite dizer, que nos estágios iniciais de polimerização o filme apresenta fina espessura.

Pode-se observar (figura 22-B) que o depósito do material (decréscimo de frequência) na superfície do eletrodo começa no potencial relacionado ao início da formação da primeira onda de oxidação em voltametria cíclica ($\sim 0,5\text{V}$), a formação dos primeiros cátions-radicaís. No voltamograma reverso há a presença de duas ondas de redução e um aumento de massa não tão acentuado começa a ocorrer nos potenciais mais anódicos, indicando também, um aumento do material depositado na superfície. O aumento global de massa é pequeno, como mencionado, com $0,56\text{ ng}$ de modificação no final do primeiro voltamograma. Pode-se observar um decréscimo de massa nos potenciais de retorno mais anódicos ($+0,9$ a $+1,0\text{ V}$). Isso sugere que nem todas as espécies formadas estão sendo depositadas no eletrodo, difundindo próximo à superfície onde, posteriormente, com o voltamograma reverso, são depositadas por redução. O aumento global de massa se torna pequeno mostrando a dificuldade de formação e modificação do poli(4-aminofenol) na superfície do eletrodo.

A modificação do eletrodo, apesar de pequena, é uniforme, como pode ser visto na figura 23, abaixo.

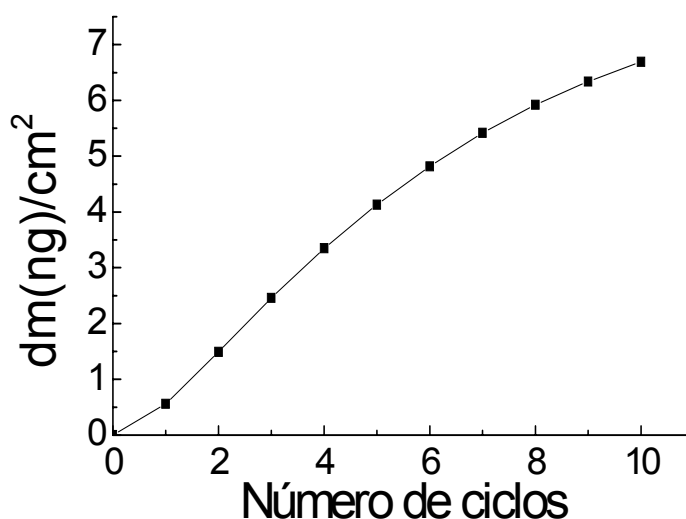


Figura 23. Gráfico da massa de poli(4-aminofenol) formada na superfície do eletrodo, no fim de cada ciclo, versus o número de ciclos.

5.3. Estabilidade térmica de poli(4-aminofenol)

A estabilidade térmica de poli(4-aminofenol) foi avaliada à 98 °C em função do tratamento térmico, monitorando os picos de correntes anódicas (i_a) dos voltamogramas cíclicos em solução aquosa de HClO_4 0,5 mol.L⁻¹ por varreduras de potencial entre +0,3 e +0,55 V vs. ECS. Essa etapa foi importante para analisar a estabilidade do filme quando o mesmo for submetido ao processo de imobilização da biomolécula, durante a construção do biossensor.

Os voltamogramas dos eletrodos de grafite modificados com filmes poliméricos com e sem tratamento térmico em solução de ácido perclórico são representados na figura 24.

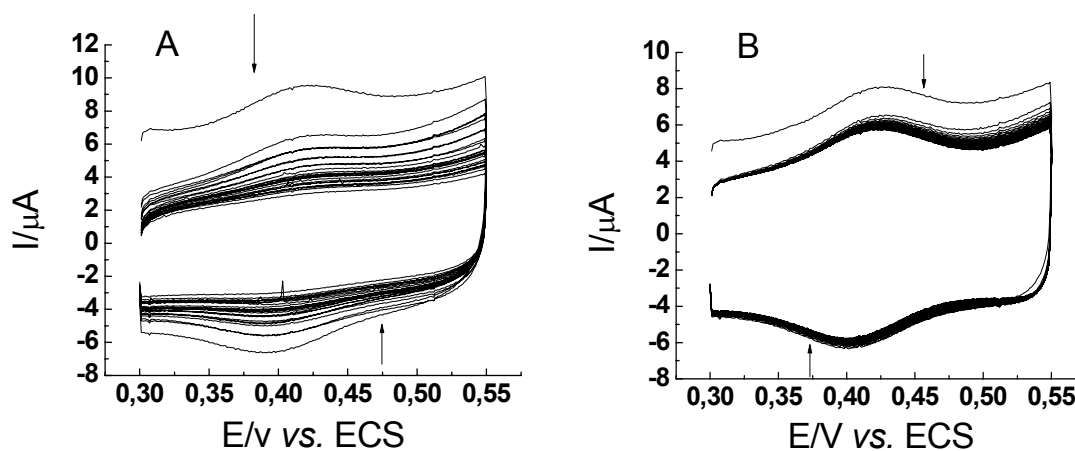


Figura 24. Voltamogramas cíclicos dos eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) (A) submetido à temperatura de 98°C (B) apenas ciclagens de potencial em HClO_4 0,5 mol.L⁻¹ a temperatura ambiente.

Observou-se na figura 24A que o filme manteve suas características de eletroatividade, mas com diminuição nos valores de corrente.

A figura 25 representa o decréscimo nos valores de carga obtidos em função do tempo de tratamento térmico do eletrodo modificado com poli(4-aminofenol).

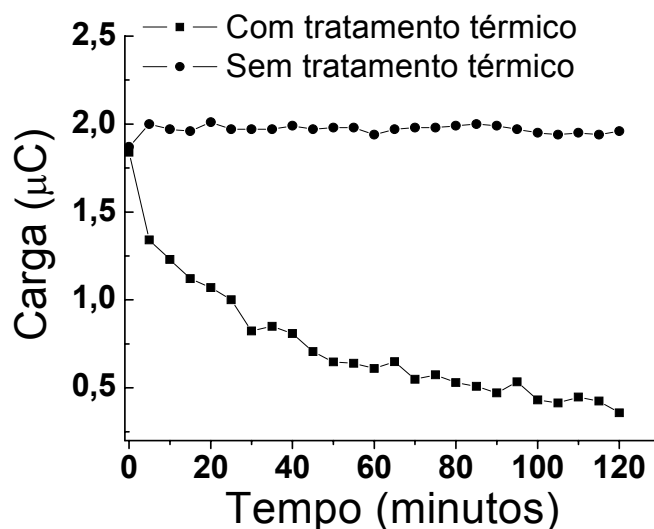


Figura 25. Valores de carga dos picos de oxidação nos voltamogramas cíclicos do filme com ou sem tratamento térmico em solução de HClO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$.

A figura 25 mostra que, após 25 ciclagens de potencial, o eletrodo modificado que permaneceu a temperatura ambiente não teve sua carga de oxidação alterada, demonstrando que não houve diminuição de sua eletroatividade com as sucessivas ciclagens, evidenciando sua alta estabilidade eletroquímica nestas condições.

Foi observada alteração da carga referente à oxidação do eletrodo modificado que sofreu tratamento térmico. Após o primeiro tratamento (5 minutos), o eletrodo modificado manteve 73 % desta carga de oxidação inalterada, sendo a ocorrência de variação desta carga cada vez menor, com o aumento do número de tratamentos térmicos. Após o quarto tratamento térmico (20 minutos), o eletrodo modificado manteve ainda cerca de 60 % de sua carga, indicando que a exposição deste eletrodo modificado a 98°C , por períodos de tempo não muito longos pode ser efetuada, pois a maior parte da eletroatividade do filme polimérico permaneceu sem alteração.

Estes resultados mostram que o tratamento térmico a 98°C por tempos curtos, processo que normalmente é utilizado no desenovelamento da dupla fita do DNA, pode ser feito na presença do eletrodo modificado, para incorporação da simples fita ao mesmo, pois a manutenção da maior parte de eletroatividade do filme polimérico está relacionada com a manutenção de sua estrutura. Esta correlação é reforçada pela inalteração dos potenciais de

oxi-redução, conforme observado na figura 24, pois não foi detectado qualquer deslocamento destes potenciais, nem houve o surgimento de outras ondas, pois estas mudanças nos voltamogramas indicariam alteração na estrutura da maior parte do polímero.

5.4. Estudos de espectroscopia de infravermelho do poli(4-aminofenol)

A característica do filme formado foi estudada por espectroscopia de infravermelho. O monômero 4-aminofenol ($2,5 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$) foi depositado sobre barra de grafite utilizando-se solução aquosa de HClO_4 como eletrólito.

No espectro abaixo (figura 26) é nítida a diferença entre o espectro do monômero e do filme polimérico. No espectro do monômero pode-se observar as bandas em 3343 e 3284cm^{-1} referentes à deformação axial N-H em amins aromáticas. A deformação angular N-H é observado em 1616 cm^{-1} . A banda em 1094 cm^{-1} está relacionada à deformação axial C-O e em 1386 cm^{-1} é referente à deformação angular O-H. Os núcleos aromáticos estão caracterizados pelas bandas em 3100 , 3030 e 3005 cm^{-1} (bandas referentes à deformação axial C-H). A deformação axial do anel das ligações C=C é caracterizado pelas bandas em 1478 e 1512 cm^{-1} e as deformações angulares fora do plano C-H aparecem em 826 , 750 e 705 cm^{-1} .

No espectro do polímero, as bandas referentes à deformação axial N-H de amins aromáticas desaparecem e uma banda larga toma lugar em 3421 cm^{-1} referente a interações intermoleculares do grupo O-H. A deformação axial C-O característica de fenóis é representada pela banda em 1087 , 1111 e 1144 cm^{-1} . O núcleo aromático é representado pelas bandas de deformação axial C-H em 2925 e 2854 cm^{-1} e a deformação angular fora do plano em 627cm^{-1} . Em 1511 cm^{-1} é referente à absorção angular N-H de amins aromáticas secundárias.

Estes resultados sugerem possível polimerização via NH_2 com presença de bandas de OH livres, pela possibilidade de ligações tipo C-N-C de bandas de amins aromáticas secundárias.

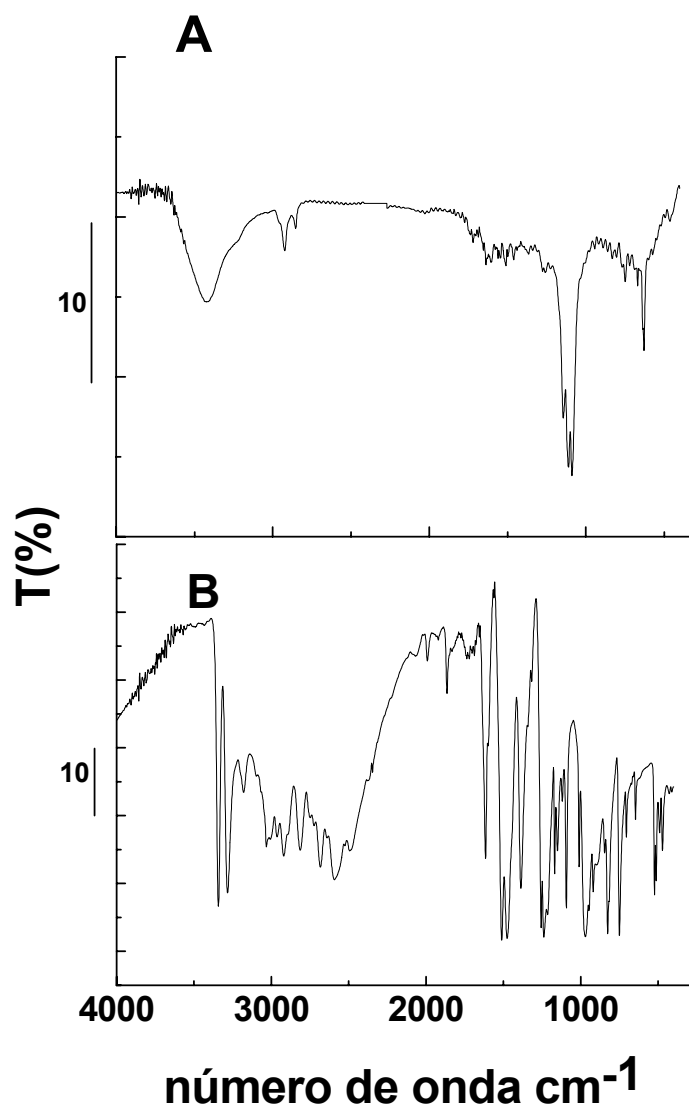


Figura 26. Espectro de infra-vermelho do (A) poli(4-aminofenol) preparado em solução de HClO_4 , pH 0,5 e (B) 4-aminofenol.

5.5. Imobilização e detecção de bases nitrogenadas

Os eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) foram utilizados para imobilização e detecção de bases nitrogenadas. As bases utilizadas foram purinas e pirimidinas. Bases purínicas (guanina e adenina) e bases pirimidínicas (timina e citosina) são os principais componentes do DNA.

Filmes poliméricos foram construídos de acordo com a metodologia descrita acima. Soluções estoque $20 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de bases purínicas e $200 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de bases pirimidínicas foram preparadas em água deionizada. Os estudos voltamétricos foram conduzidos gotejando $15 \mu\text{L}$ (3×10^{-7} para G, A e 3×10^{-6} moles para T, C) de solução estoque das bases isoladas ou da mistura das mesmas sobre a superfície de poli (4-AF). Os eletrodos modificados foram colocados em um dessecador sobre vácuo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 4 horas. A detecção foi feita por meio de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial em tampões acetato de sódio, pH 4,5 e fosfato de sódio, pH 7,4. Foi possível detectar todas as bases nitrogenadas em ambos os tampões utilizados. O pico em +0,68V e +0,82V (figuras 27A e 27B) é atribuído à oxidação da guanina, usual biomarcador para biossensores (BRETT *et al.*, 2004). Estudos sobre potenciais de ionização e propriedades de doação de elétrons comprovaram que as bases pirimidínicas são mais difíceis de serem oxidadas, sendo piores doadores de elétrons π , e menos eletroativas que as bases purínicas. Dentre estas últimas, a guanina possui o menor potencial de oxidação, o que corrobora com os voltamogramas obtidos (BRETT *et al.*, 2004, BERTHOD *et al.*, 1966).

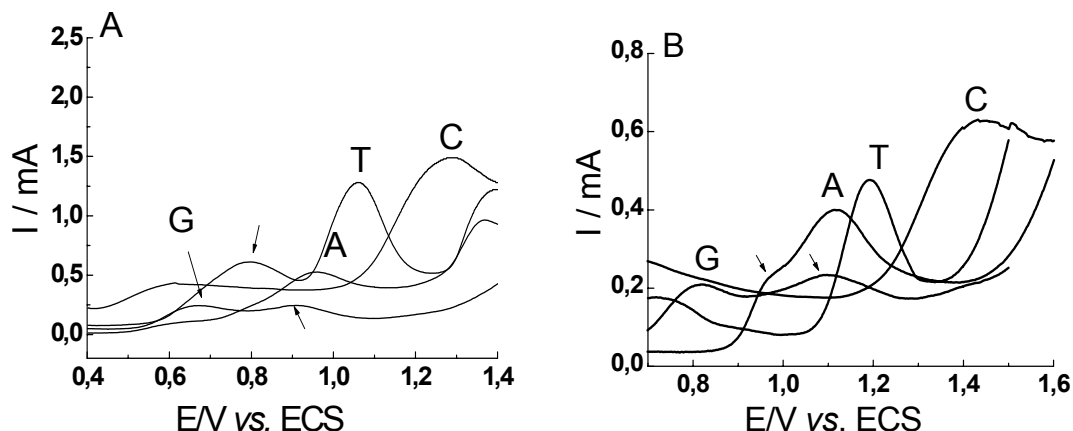


Figura 27. Voltamogramas de pulso diferencial de eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol), 100 varreduras, com as bases nitrogenadas isoladas. Guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4 (A) ou tampão acetato pH 4,5 (B), incremento de 0,01mV, período do pulso 0,2s, velocidade de varredura 5mVs⁻¹. As setas indicam presença de dímeros ou impurezas.

A tabela 5 representa os valores de potencial e corrente de oxidação das bases nitrogenadas incorporadas aos eletrodos modificados.

Tabela 5. Valores de potencial e corrente das respectivas bases nitrogenadas isoladas.

Bases Nitrogenadas	Guanina		Adenina		Timina		Citosina	
Eletrólito	tampão acetato	tampão fosfato	tampão acetato	tampão fosfato	Tampão Acetato	tampão fosfato	tampão acetato	tampão fosfato
Potencial / V	0,82	0,68	1,12	0,96	1,20	1,06	1,45	1,27
Corrente (10 ⁻⁶)/A	180	219	370	450	430	730	412	914

*Os valores acima foram obtidos a partir do gráfico ilustrado na figura 27.

Os potenciais de oxidação, tabela 5, encontrados para as bases nitrogenadas estão em concordância com a literatura (BRETT *et al.*, 2004). As detecções em tampão fosfato, do ponto de vista analítico, são mais apropriadas para detecção dessas bases, devido ao potencial de oxidação mais baixo, tanto para as purinas quanto para as pirimidinas, em relação ao tampão acetato.

A região de menor potencial de oxidação das bases purinas é conhecida na literatura (SCALEA *et al.*, 1999), figura 28. Os potenciais de oxidação mais anódicos em meio ácido indicam que os íons H^+ protonam os grupos carbonila e amino das bases nitrogenadas, diminuindo a extensão de conjugação e, conseqüentemente, aumentando os respectivos potenciais de oxidação.

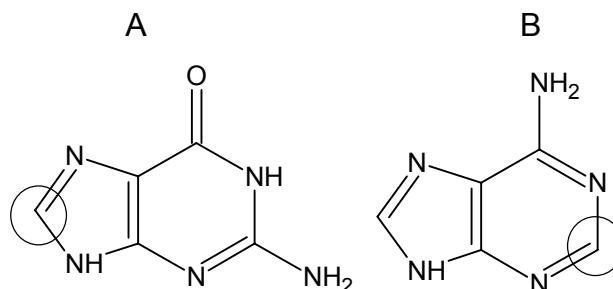


Figura 28. Bases purínicas (A) guanina e (B) adenina. O círculo representa região de menor potencial de oxidação (SCALEA *et al.*, 1999).

Os estudos com a mistura das bases purinas e pirimidinas foram avaliados (figura 29).

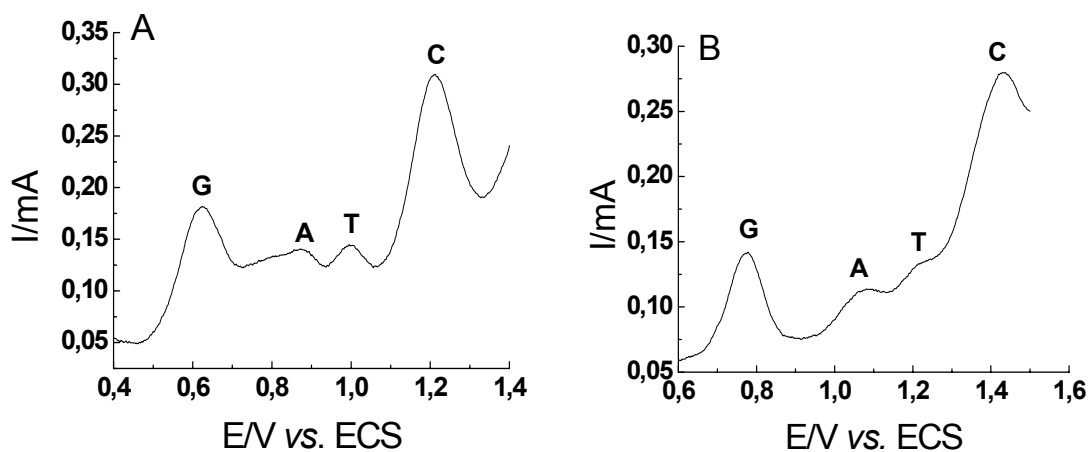


Figura 29. voltamogramas de pulso diferencial para a oxidação da mistura de guanina (G), adenina (A), timina (T) e citosina (C) em tampão fosfato, pH 7,4, (A) e acetato pH 4,5 (B). incremento de 0,01mV, período do pulso 0.2s, $5mVs^{-1}$.

Conforme observado para as bases nitrogenadas imobilizadas separadamente, potenciais mais catódicos foram obtidos em tampão fosfato e um ligeiro deslocamento de potencial foi encontrado para a mistura das bases nitrogenadas.

Tabela 6. Valores de potencial e corrente de oxidação de uma mistura das bases nitrogenadas imobilizadas sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol).

Bases nitrogenadas Eletrólitos	Guanina		Adenina		Timina		Citosina	
	tampão acetato	tampão fosfato	tampão acetato	tampão fosfato	tampão acetato	tampão fosfato	tampão acetato	tampão fosfato
Potencial / V	0,77	0,62	1,07	0,87	1,2	0,99	1,43	1,21
Corrente /(10 ⁻⁶)A	70	97	20	28	10	16	80	150

*Os valores acima foram obtidos a partir do gráfico ilustrado na figura 29.

Esses valores correspondem a potenciais de oxidação mais baixos quando comparados com a detecção das bases livres em tampão pH 7,4. Segundo a literatura (BRETT *et al.*, 2004), a facilidade na oxidação se deve ao fato de camadas dos produtos oxidados facilitarem a transferência eletrônica entre o eletrodo e a biomolécula posterior a ser oxidada. Com relação aos maiores picos para guanina e citosina, foi reportado que monocamadas de guanina são preferencialmente formadas em diferentes superfícies quando bases combinadas são submetidas à evaporação (SOWERBY *et al.*, 2000, STEPHEN *et al.*, 2001, BRETT *et al.*, 2004) ocasionada pelo maior número de sítios de ligação. Posteriormente, devido às ligações de hidrogênio, a citosina forma uma camada subjacente à guanina. Dessa forma, maior quantidade de G+C é oxidada na superfície do eletrodo em relação às bases A+T, correspondendo aos maiores valores de corrente.

Estes estudos indicam que o tampão fosfato é o mais adequado para utilizar na detecção de produtos de PCR, pois se situa próximo ao pH fisiológico, além de propiciar potenciais de oxidação das bases nitrogenadas mais baixos, diminuindo ação de interferentes e gerar maiores valores de corrente.

5.6. Imobilização e detecção de produtos de PCR

Para os experimentos realizados de imobilização e detecção, utilizaram-se produtos de PCR específicos para hanseníase, com 78 pb, desnaturados (ssDNA) e hibridizados (dsDNA) sobre superfície de poli(4-aminofenol). Todos os experimentos foram realizados em

triplicata, sendo calculado o coeficiente de variação: (desvio padrão/média) x 100, descartando os resultados acima de 5%.

Primeiramente foram imobilizados $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ de *dsDNA* por gotejamento de $15 \mu\text{L}$ de amostra sobre a superfície do eletrodo. Nenhuma resposta foi observada com concentrações mais baixas. A eficiência da imobilização foi avaliada por estudos voltamétricos em tampão fosfato e acetato figura 30.

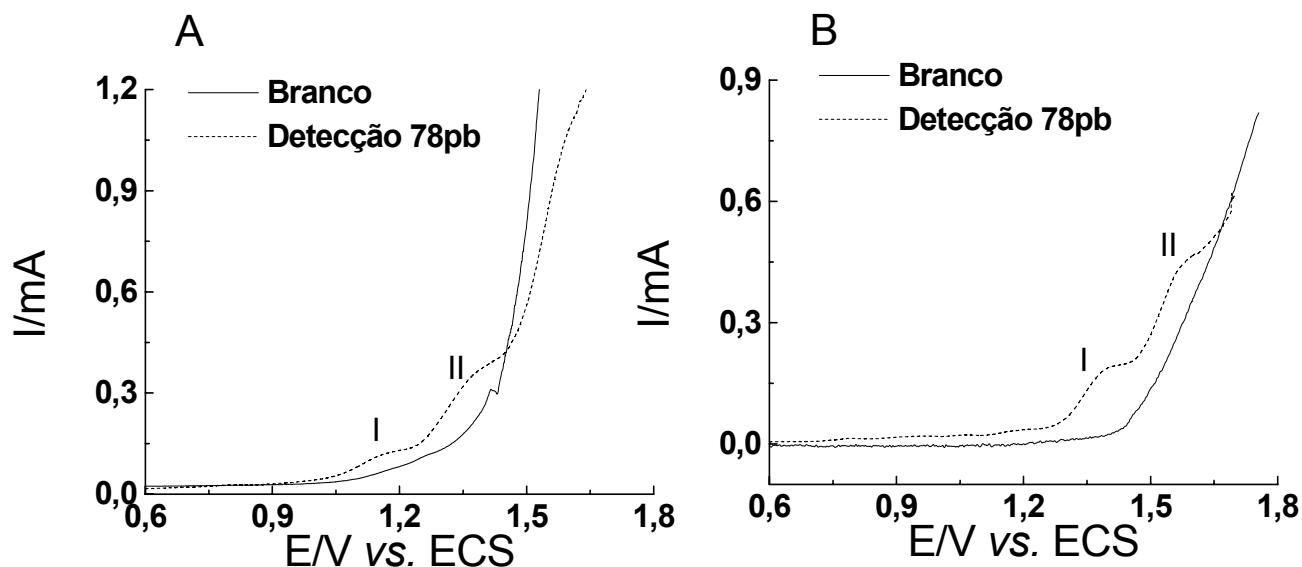


Figura 30. Voltametria de pulso diferencial de eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) contendo *dsDNA*, 78pb em: (A) tampão fosfato, pH 7,4 ou (B) tampão acetato, pH 4,5. (I): guanosina monofosfato, (II): adenosina monofosfato.

Os picos observados na figura 30 são atribuídos à oxidação das bases guanosina monofosfato (+1,15 V e +1,39 V em tampões fosfato ou acetato, respectivamente) e adenosina monofosfato (+1,37 V e +1,56 V em tampões fosfato ou acetato, respectivamente). Como descrito anteriormente, estas bases são mais fáceis de serem oxidadas do que as bases pirimidínicas. O mesmo deslocamento de potencial anódico para pH 4,5 também é observado. No entanto, o potencial de oxidação mais elevado do que as bases isoladas ou combinadas é determinado pelo impedimento dos sítios de oxidações, decorrentes das ligações de hidrogênio (figuras 31 e 32) necessitando de maior energia para

as mesmas serem oxidadas. Não obstante, a dupla fita é uma molécula mais rígida, de menor flexibilidade e de difícil acomodação na superfície do eletrodo (BRABEC, 1981) dificultando a oxidação das bases nitrogenadas relacionadas.

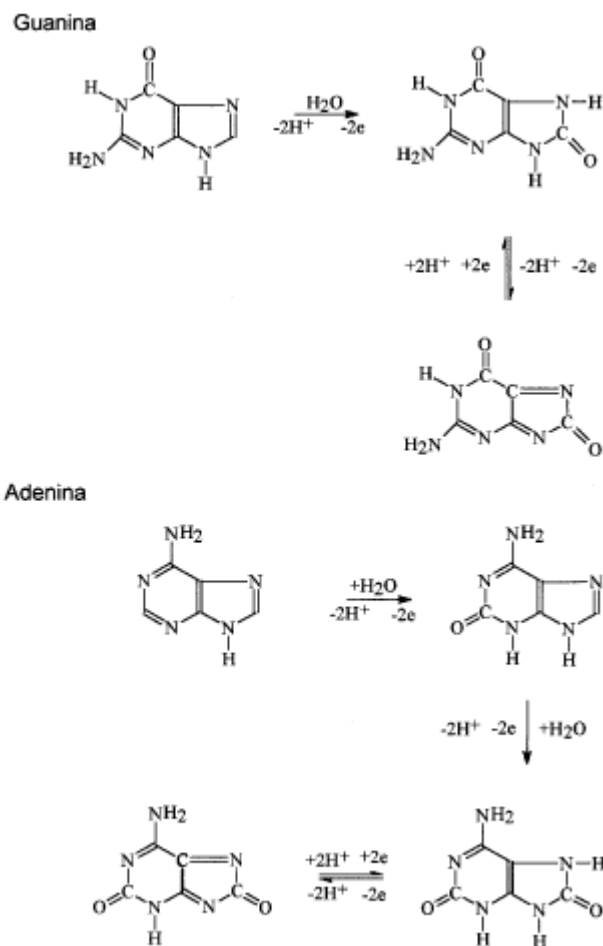


Figura 31. Oxidação das bases purínicas. (SCALEA *et al.*, 1999).

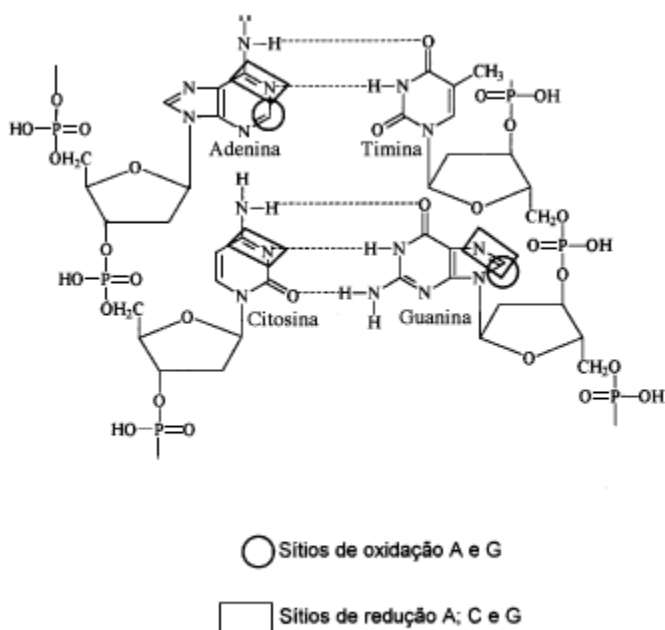


Figura 32. Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos pontos de oxidação e redução.

5.6.1. Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizada como técnica de apoio para confirmar a modificação da superfície com a simples fita de DNA e o evento de hibridização. Para as medidas de impedância, foi utilizada solução do par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$, conforme descrito no item 4.8. Os dados foram representados pelo gráfico de Nyquist (Z' vs. $-Z''$) e admitância ($1/Z'$ vs. $1/-Z''$) para as diferentes superfícies (figura 33). Cada ponto representa um valor de Z' e Z'' medidos em uma frequência particular. O espectro é composto de um semicírculo em regiões de alta frequência e de uma reta em baixas frequências. O semicírculo descreve processos faradaicos de transferência de elétrons entre o eletrodo e a superfície, e a porção linear contém informações sobre transporte de íons.

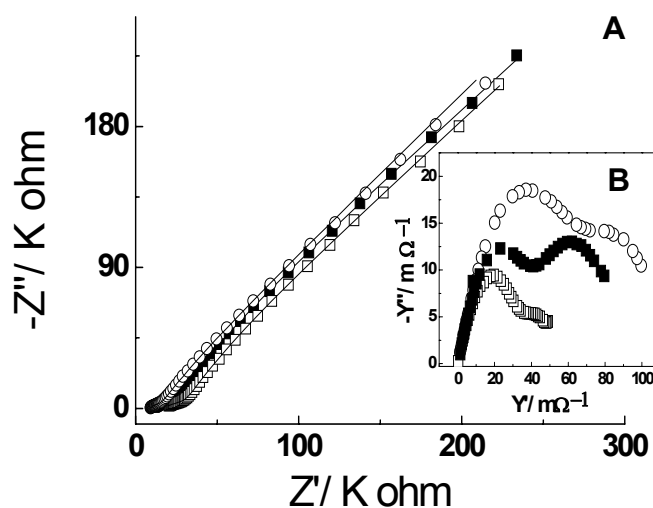


Figura 33. Diagramas de Nyquist (A) ou admitância (B) para eletrodo de grafite modificado 5×10^{-3} mol.L $^{-1}$ de $K_3Fe(CN)_6$ e 5×10^{-3} mol.L $^{-1}$ / $K_4Fe(CN)_6$ em 0,1 mol.L $^{-1}$ KNO_3 com: ($\circ$) poli(4-aminofenol), ($\square$) poli(4-aminofenol) contendo ssDNA, ($\blacksquare$) poli(4-aminofenol) contendo dsDNA.

A figura 34 representa o circuito equivalente que melhor descreve as características elétricas do sistema, consistindo de resistores (R), elemento de fase constante (Q), impedância de warburg (Z_w).

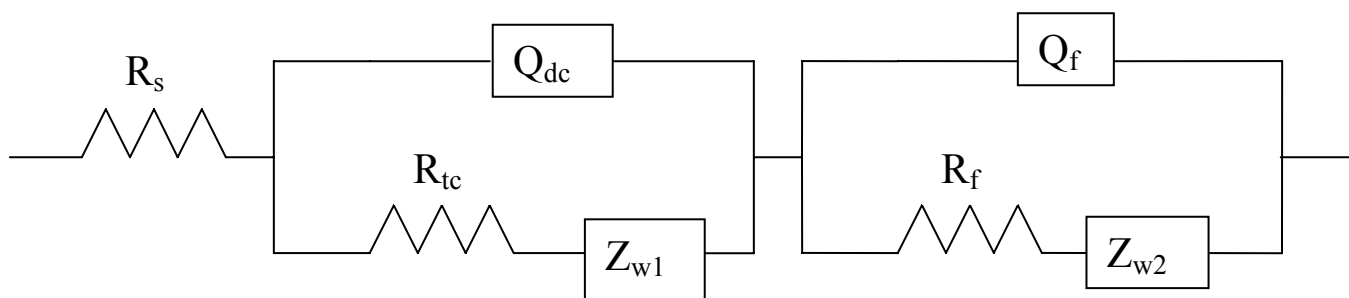


Figura 34. Circuito equivalente. R_s : resistência da solução, R_{tc} : resistência à transferência de carga, R_f : resistência do filme, Q_{dc} : capacitância da dupla camada elétrica, Q_f : capacitância do filme: Z_{w1} : resistência ao transporte de íons da dupla camada elétrica: Z_{w2} : resistência ao transporte de íons dentro do filme.

Pode se observar na figura 33A que a impedância do sistema aumenta nesta ordem: poli(4-AMF) < poli(4-AMF)/*ds*DNA < poli(4-AMF)/*ss*DNA. A figura 33 B mostra que maiores valores de admitância correspondem a menores valores de impedância. Os dados referentes aos elementos do circuito estão representados na tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagramas de Nyquist.

Superfície	R_s (Ω)	R_{tc} (Ω)	R_f (Ω)	Q_{dc} ($Fcm^{-2}s^n$)	Q_f ($Fcm^{-2}s^n$)	W_1	W_2
Poli(4AMF)	8,9	1,37	7,06	$2,79.10^{-3}$	$1,39.10^{-5}$	$1,28.10^{-2}$	$1,38.10^{-2}$
Poli(4AMF/ <i>ss</i> DNA)	14,32	7,52	67,1	$6,22.10^{-5}$	$2,05.10^{-9}$	$1,95.10^{-2}$	$1,42.10^{-2}$
Poli(4AMF)/ <i>ds</i> DNA	10,55	15,36	3,42	$7,08.10^{-6}$	$4,79.10^{-5}$	$1,39.10^{-2}$	$5,18.10^{-2}$

* R_f : resistência do filme, Q_{dc} : capacitância da dupla camada elétrica, Q_f : capacitância do filme; Z_{W1} : resistência ao transporte de íons da dupla camada elétrica; Z_{W2} : resistência ao transporte de íons dentro do filme.

Os valores de resistência de transferência de carga da dupla camada elétrica (R_{tc}) aumentam para os eletrodos modificados com poli(4-AMF) na presença de biomoléculas em relação ao eletrodo modificado com poli(4-AMF) sem biomolécula.

O evento de hibridação aumenta a resistência de transferência de carga. É conhecido da literatura que íons ferro associam-se eletrostaticamente com o esqueleto negativo do *ss*DNA e *ds*DNA (YE *et al.*, 2003) e a formação da dupla hélice dificulta o acesso do cátion aos grupos aniônicos do esqueleto aumentando a distância entre o eletrodo e o íon. A dificuldade ao acesso à carga na superfície do eletrodo também é observado com a queda nos valores de Q_{dc} . Também é descrito que moléculas pesadas diminuem a capacitância no eletrodo (HACCOUN, *et al.*, 2005). Em contra partida, *ss*DNA aumenta a resistência no filme, visto que as cargas negativas dos grupos fosfato nos poros do polímero estão mais disponíveis do que na molécula de *ds*DNA, o que pode provocar a expulsão dos contra íons do filme. Além disso, a repulsão das cargas negativas causa distorções nos orbitais π aumentando a energia da banda de condução (PECK *et al.*, 2004). Isso pode ser visto com a diminuição da Q_f . O valor de R_f aumenta porque a condutividade iônica e eletrônica diminui. É conhecido na literatura (LEE *et al.*, 2001) que a dupla fita possui maiores

propriedades condutoras do que a simples fita, o que está em concordância com os resultados obtidos.

A partir destes resultados, pode-se afirmar que a superfície do eletrodo de grafite contendo o filme polimérico foi modificada com a *ssDNA* e ocorreu hibridação com o alvo complementar (*dsDNA*).

A seguir, foram conduzidos os estudos de detecção do DNA desnaturado e hibridizado utilizando-se indicadores eletroativos (ferrocenocarboxaldeído ou azul de metileno).

5.6.2. Análises de microscopia de força atômica

As imagens de MFA para eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) sem biomoléculas ou contendo biomoléculas imobilizadas são mostradas na figura 35.

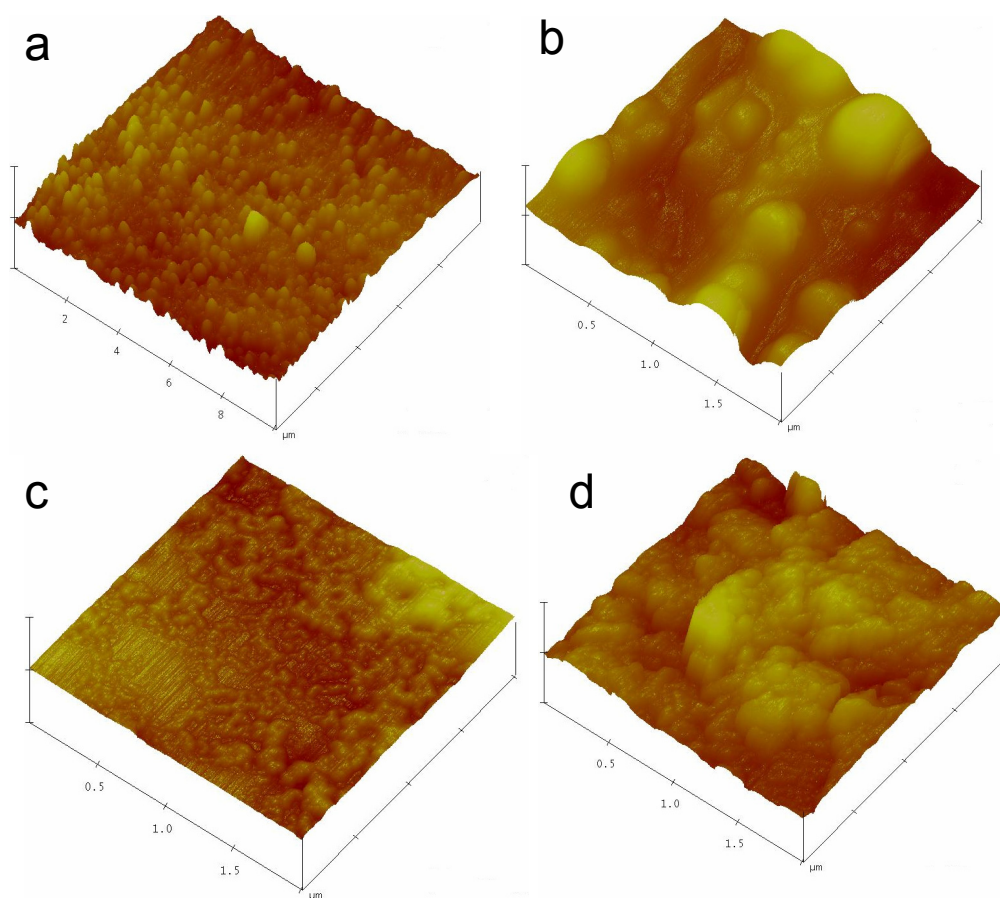


Figura 35. Imagens de MFA de eletrodos de grafite modificados com poli(4-aminofenol) sem DNA: (a) e (b), ou contendo DNA: antes da hibridação, *ssDNA* (c), após a hibridação com o alvo complementar, *dsDNA* (d).

O valor de rugosidade para eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol), escala de 10 μ m, foi 397 nm.

A espessura do filme polimérico foi medida seguindo o procedimento descrito por LOBO *et al.*, 1999. O valor de espessura média foi 800 nm.

O eletrodo modificado com o filme polimérico apresenta maior número de glóbulos com estrutura mais definida, em relação ao eletrodo modificado com poli(4-aminofenol) contendo DNA.

A topografia apresentada na figura 35c é diferente da figura 35d, o que reforça a ocorrência do evento de hibridação na superfície do eletrodo modificado contendo o alvo complementar.

5.6.2. Detecção de produtos de PCR utilizando-se indicadores

Para a detecção dos eventos de hibridação ocorridos na superfície do biossensor, foram utilizados ferrocenocarboxaldeído ou azul de metileno. A escolha desses dois indicadores foi atribuída ao baixo potencial de oxidação em relação aos outros disponíveis.

5.6.2.1. Detecção de produtos de PCR utilizando ferrocenocarboxaldeído

Para o pré-condicionamento, limpeza e polarização da superfície do eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol), a mesma foi submetida a sucessivas varreduras de potencial de 0 a +0,8 V *vs.* ECS em tampão fosfato até que os voltamogramas se mantivessem constantes. A etapa de polarização é importante para a indução de interações iônicas entre os grupos fosfatos de carga negativa da biomolécula e os grupos imina do filme polimérico pré-oxidado (figura 36).

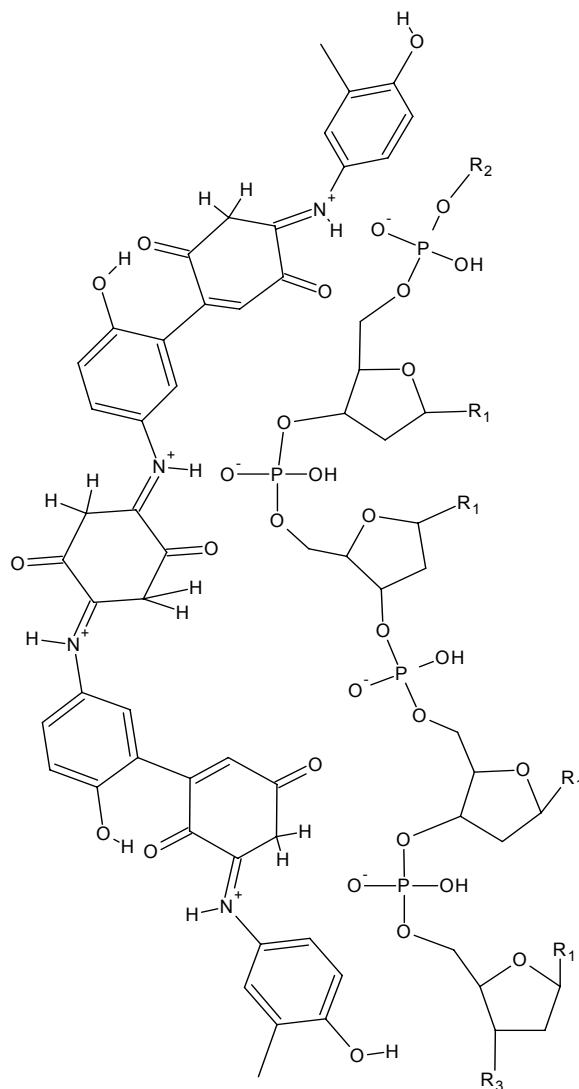


Figura 36. Representação das interações iônicas entre o polímero e a molécula de DNA, R_1 = guanina, adenina, timina ou citosina, R_2 = ribose, R_3 = grupo fosfato.

A detecção dos produtos amplificados de PCR foi realizada utilizando-se voltametria cíclica como técnica de transdução.

A $3,93 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹ ssDNA (sonda) foi imobilizado de acordo com o procedimento descrito no item 4.13. Uma alíquota da amostra de PCR diluído em tampão de hibridização SSC 6X foi submetida à desnaturação térmica e adicionado por gotejamento à superfície do eletrodo de grafite modificado com filme polimérico. O evento de hibridização foi acompanhado monitorando-se o potencial de oxidação do ferrocenocarboxaldeído em

+0,52V. A diminuição na magnitude do sinal de corrente de oxidação do indicador sugere a ocorrência da hibridização com o alvo complementar (figura 37).

A diminuição nos valores de corrente está relacionada com o menor numero de espécies indicadoras na superfície do eletrodo quando está presente o alvo complementar, visto que o indicador tem maiores sítios de ligações de hidrogênio com ssDNA (figura 38).

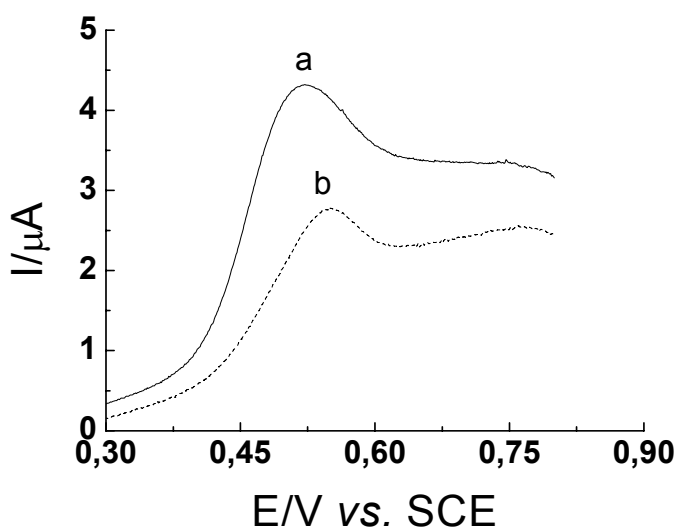


Figura 37. Voltametria linear para eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) contendo $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ ssDNA (a) e após hibridação com o alvo complementar, dsDNA (b) de ferrocenocarboxaldeído $6,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ detectado em tampão fostato pH 7,4 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, 10 mVs^{-1} .

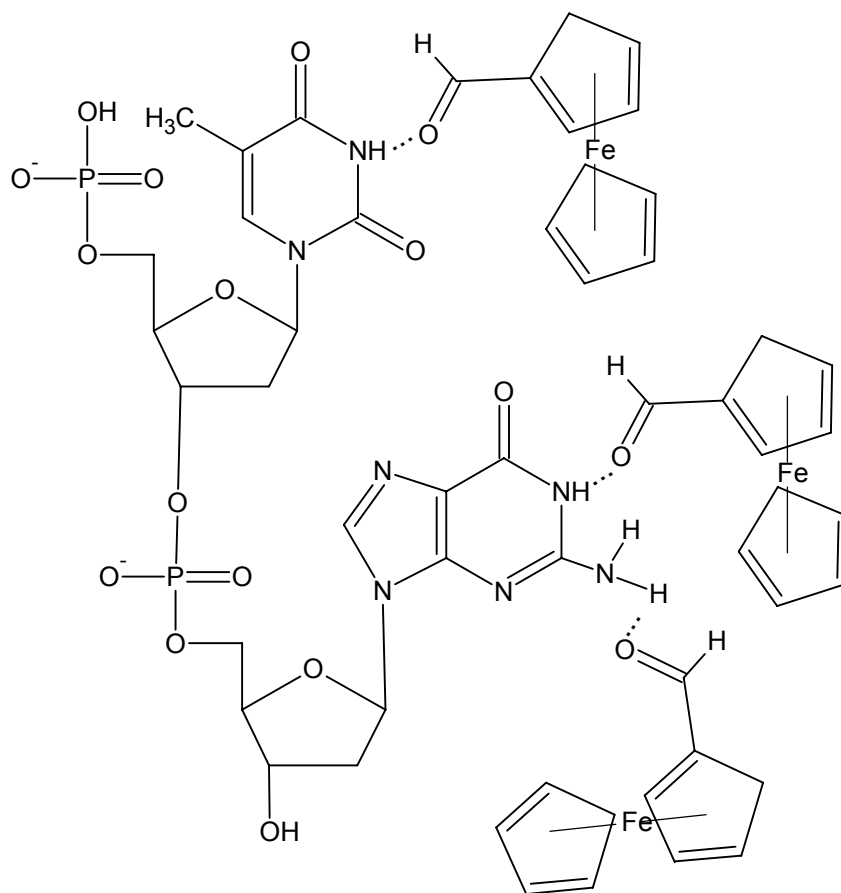


Figura 38. Representação entre ligações de hidrogênio entre ferrocenocarboxaldeído e ssDNA.

Alguns parâmetros experimentais, tais como, tempo de hibridização e concentração do alvo complementar foram estudados para avaliar as características analíticas do biossensor. A influência no tempo de hibridização esta representada na figura 39.

Foi observada uma queda na resposta de corrente para o eletrodo modificado, monitorando-se o pico de oxidação do indicador, após 15 minutos de hibridação. Após este tempo, o sinal do indicador aumentou com o tempo de hibridização. Este aumento pode ser atribuído ao acúmulo não específico do alvo na superfície do eletrodo. O tempo de 15 minutos foi utilizado para a os experimentos de hibridização seguintes, visto que apresenta uma queda mais acentuada no sinal de corrente.

O limite de detecção do biossensor foi avaliado frente à resposta do indicador (figura 40).

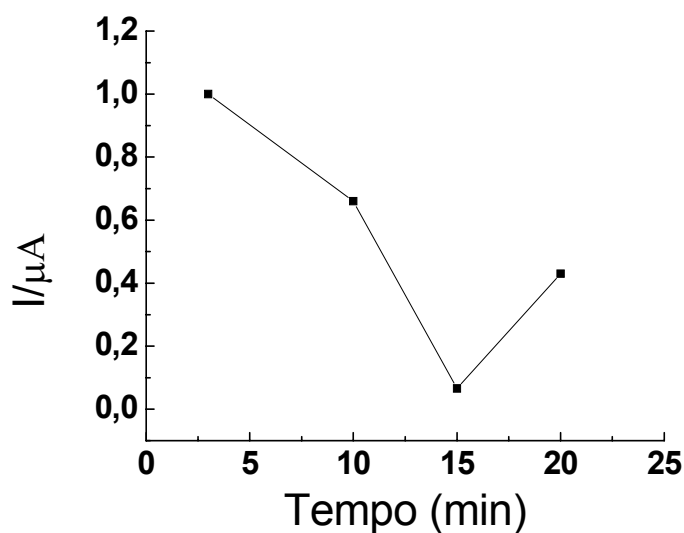


Figura 39. Tempo de hibridização do biossensor com o alvo complementar a 42°C. A análise foi feita por voltametria cíclica, 10mVs⁻¹, monitorando-se o pico de oxidação de 650 μmol.L⁻¹ de ferrocenocarboxaldeído.

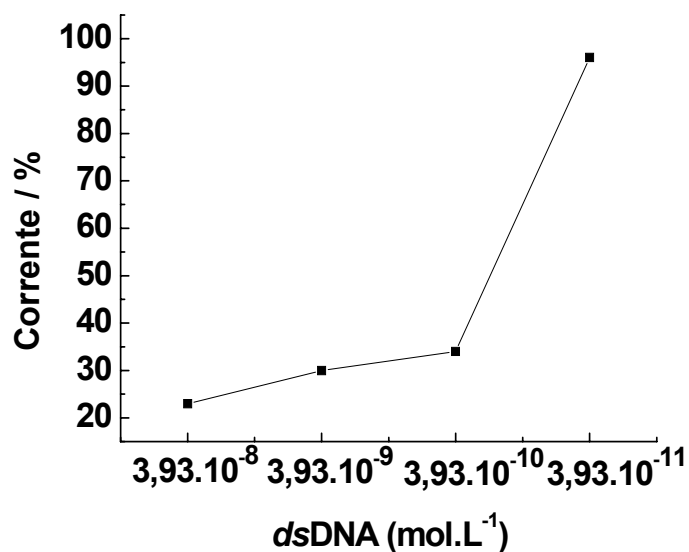


Figura 40. Porcentagem de corrente em relação a simples fita em função de diferentes concentrações do alvo complementar ($3,93 \times 10^{-8}$; $3,93 \times 10^{-9}$; $3,93 \times 10^{-10}$; $3,93 \times 10^{-11}$ mol.L⁻¹) monitorando-se o pico de oxidação do ferrocenocarboxaldeído. A concentração da sonda imobilizada na superfície do biossensor foi $3,93 \times 10^{-8}$ mol.L⁻¹.

A mínima quantidade do alvo complementar detectado foi $3,93 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$. Abaixo desta concentração, nenhuma diferença de sinal foi observado rastreando-se o alvo complementar.

A seguir, foram realizados experimentos para detecção da hibridação do alvo complementar utilizando-se azul de metileno como indicador.

5.6.2.2. Detecção de produtos de PCR utilizando-se azul de metileno como indicador

A detecção dos produtos de PCR empregando azul de metileno foi realizada seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 5.6.2.1

A interação do azul de metileno com *ssDNA* ou *dsDNA* foi avaliada eletroquimicamente por voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial (figura 41 A e B).

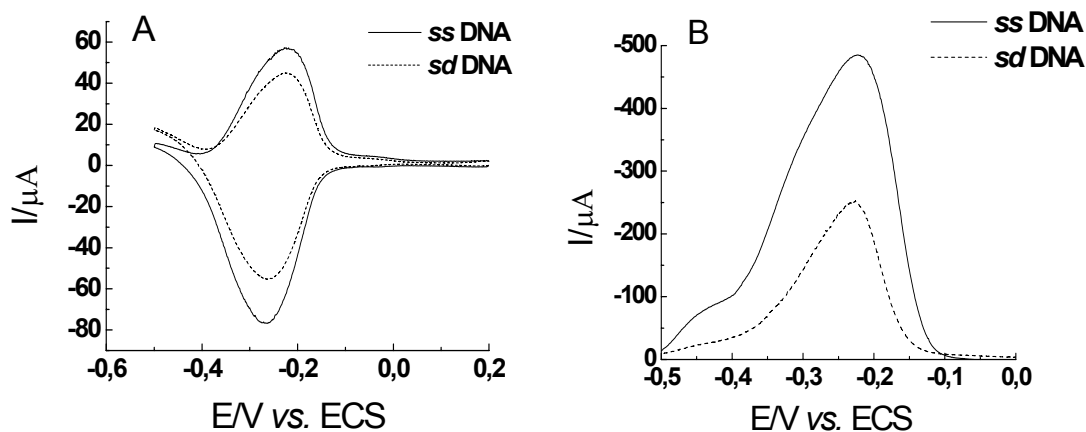


Figura 41. Detecção com azul de metileno $6,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. (A) voltametria cíclica. (B) voltametria de pulso diferencial. Sonda imobilizada (*ssDNA*) $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$; alvo complementar (*dsDNA*) $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato pH 7,4 $0,1 \text{ mol/L}$. Tempo de hibridização 15 minutos. V_c 10 mVs^{-1} e VPD 5 mV.s^{-1} .

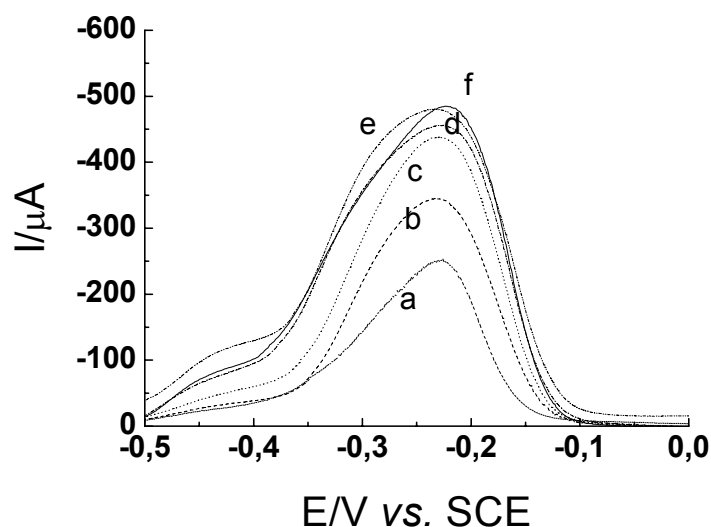


Figura 43. Voltamograma de pulso diferencial de azul de metileno como indicador redox em tampão fosfato, pH 7,4, em eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol), hibridizado com diferentes concentrações do alvo complementar: (a) $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$, (b) $3,93 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$, (c) $3,93 \times 10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$, (d) $3,93 \times 10^{-11} \text{ mol.L}^{-1}$ (e) $3,93 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ ou (f) não hibridizado (ssDNA $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$). 5mVs^{-1} , $0,01\text{mV}$, $0,2\text{ms}$. Tempo de hibridização: 15 minutos

Diminuída a concentração do alvo, maiores valores de corrente de redução do AM foram observados. Este comportamento é determinado pela redução de bases não hibridizadas em baixas concentrações do alvo complementar, aumentando as interações entre a guanina livre e AM, e conseqüentemente maior quantidade de espécies a serem reduzidas na superfície do eletrodo. Como se pode observar nas figuras 43 e 44, quando hibridizado $3,93 \times 10^{-12} \text{ mol.L}^{-1}$ do alvo complementar, não há diferença significativa nos valores de corrente do AM e sonda. A menor concentração detectada pelo biossensor foi da ordem de $10^{-10} \text{ mol.L}^{-1}$.

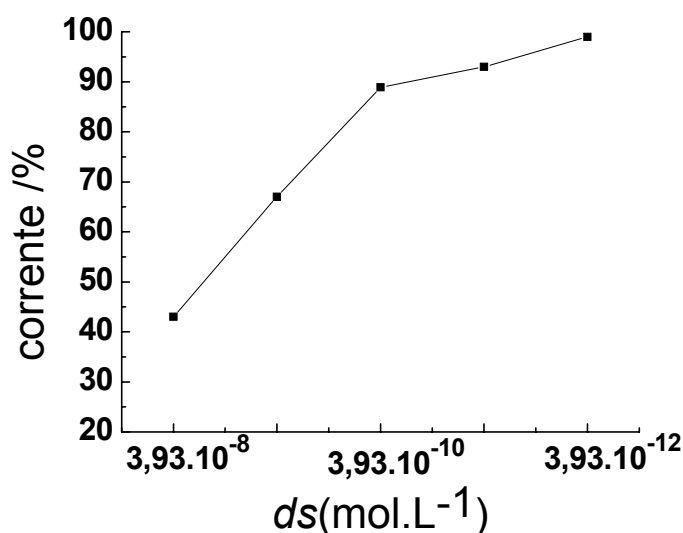


Figura 44. Porcentagem de corrente em relação a simples fita em função de diferentes concentrações do alvo complementar ($3,93 \times 10^{-8}$, $3,93 \times 10^{-9}$, $3,93 \times 10^{-10}$, $3,93 \times 10^{-11}$ mol.L⁻¹, $3,93 \times 10^{-12}$ mol.L⁻¹) monitorando-se o pico de oxidação do azul de metileno. Os resultados foram obtidos a partir do gráfico mostrado na figura 40.

A performance do biossensor também foi avaliada frente a um analito alvo não complementar (figura 45). Não houve mudança na eletroatividade do azul de metileno com o alvo não complementar quando comparado à resposta de amplitude de sinal de corrente da sonda imobilizada. Isto se deve ao fato de não haver hibridização entre a sonda e o alvo não complementar, ou seja, o biossensor foi capaz de diferenciar o alvo complementar e não complementar.

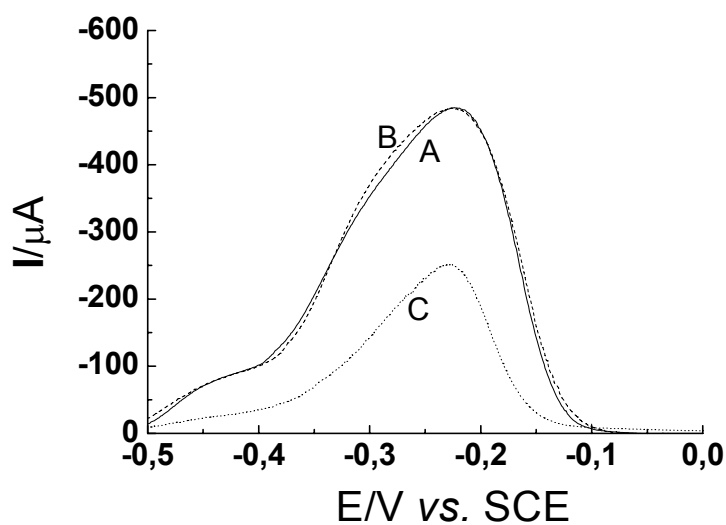


Figura 45. Voltamograma de pulso diferencial de azul de metileno como indicador redox em tampão fosfato, pH 7,4 em eletrodo de grafite modificado com poli(4-aminofenol) antes da hibridação (A), após a hibridação com: alvo não complementar (B) ou alvo complementar (C). 5mVs^{-1} , $0,01\text{mV}$, $0,2\text{ms}$. Tempo de hibridização: 15 minutos.

5.7. Tempo de vida do biossensor

A estabilidade do biossensor foi avaliada durante 02 meses. Para a condução deste estudo, o biossensor foi armazenado a 4°C protegido da luz. A figura 46 representa a resposta de corrente, monitorando-se o azul de metileno, após hibridização com o alvo complementar.

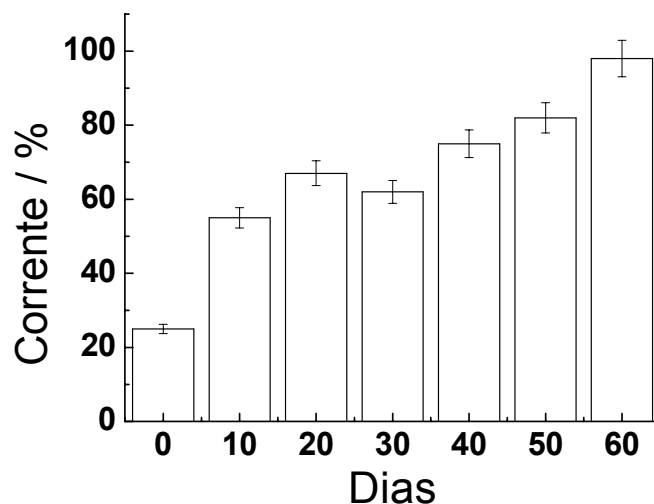


Figura 46. Porcentagem de corrente em relação a simples fita em função tempo monitorando-se o pico de oxidação do ferrocenocarboxaldeído. As concentrações utilizadas para o indicador, ssDNA imobilizado sobre a superfície do eletrodo e analito alvo foram $6,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ e $3,93 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente.

A queda de corrente do pico de oxidação do azul de metileno foi de 75%, para análise imediata de ensaios com resposta positiva. Após 30 dias de preparação do biossensor, o valor desta resposta positiva correspondeu a uma queda de 40% do valor da corrente, no final de 50 dias este valor corresponde a 20%.

6. Conclusões

Foi possível eletrogerar filme de poli(4-aminofenol) em meio ácido sobre superfície de grafite. Diferentes graus de oxidação do filme produzido foram determinados por voltametria cíclica. Os estudos de tratamento térmico revelaram que o filme pode ser utilizado para imobilização da simples fita de DNA, pois o mesmo manteve 60% de suas propriedades eletroativas em um período de vinte minutos sem mudanças aparentes de sua estrutura. Sendo, portanto, adequado para imobilização de produtos de PCR.

O espectro de infravermelho determinou que o polímero é formado preferencialmente por ligações C-N-C.

Todas as bases nitrogenadas incorporadas à matriz polimérica foram detectadas. O pH neutro favorece estas análises devido ao deslocamento dos potenciais de oxidação das bases nitrogenadas para valores mais baixos.

Os espectros de impedância e estudos de voltametria confirmaram a modificação da superfície com a sonda imobilizada e o evento de hibridização.

O biossensor foi capaz de detectar a sequência complementar do PCR amplificado de amostras reais utilizando ferrocenocarboxaldeído e azul de metileno como indicadores de hibridização. Estes indicadores são moléculas simples que podem ser empregadas para construção de um biossensor de baixo custo. Além disso, elimina o uso de moléculas carcinogênicas como daunomicina, brometo de etídeo conhecidos intercaladores de DNA. O azul de metileno foi analiticamente mais adequado do que o ferrocenocarboxaldeído como indicador, devido ao seu menor potencial de trabalho. Entre os dois indicadores o menor limite de detecção foi na ordem 10^{-10} mol.L⁻¹ do alvo complementar utilizando azul de metileno. Utilizado, então para diferenciar a hibridização da sequência complementar e não complementar o indicador foi seletivo ao analito.

O biossensor eletroquímico de DNA apresentou tempo de hibridação com a fita complementar de 15 minutos, o qual é adequado para obtenção de resultados rápidos para detecção de 78pb de produtos de PCR específico do *M. leprae*.

O biossensor apresentou boa resposta (40% de queda de corrente, com a hibridação), após 30 dias de sua preparação.

Estes estudos demonstraram que foi possível a construção de um biossensor eletroquímico, a partir de eletrodos modificados de grafite com poli(4-aminofenol), utilizando indicadores eletroativos de baixo custo, com estabilidade de trinta dias de armazenamento que pode ser usado em amostras reais com DNA do bacilo de Hansen.

7. Referencias Bibliográfica

ATKINS, P and JONES, L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Tradução de Ignez Caracelli. Porto alegre: Bookman, capítulo 3: A forma da Molécula e a sua Estrutura, 2001. 250p.

BERTHOD, H.; GIESSNER-PRETTRE, C.; PULLMAN, A. **Theoretical study of the electronic properties of the purine and pyrimidine components of the nucleic acids**. Theoretica Chimica Acta. 1996.5. 53p.

BOON, E. M; CERES, M. D; DRUMMOND, T. G; HILL, M. G; BARTON, J. K. **Mutation detection by electrocatalysis at DNA-modified electrodes**. Nature Biotechnology. 2000.18. 1096p.

BRABEC, V. **Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes**. Bioelectrochemistry and Bioenergetics. 1981. 8. 433p.

BRETT, A. M. O; SERRANO, S. H. P; PIEDADE, A. J. P. Electrochemistry of DNA, in **Comprehensive Chemical Kinetics**. 1999. cap.3.

BRETT, A. M.O; PIEDADE, J. A. P; DICULESCU, S. V. C. **Voltammetric determination of all DNA nucleotides**. Analytical Biochemistry. 2004. 332. 321p.

BRITO-MADURRO, A. G.; FERREIRA, L. F;; VIEIRA, S. N. ; GOULART, L. R. ; MADURRO, J. M. . **Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix**. Journal of Materials Science. 2007. 42. 3238p.

CAMPELO, V; GONÇALVES, G. M. A; DONADI, E. A. **Mortalidade por doenças infecciosas e parasitárias no Município de Teresina-PI (Brasil), 1971-2000**. Revista Brasileira de Epidemiologia. 2005. 8. 34p.

CASTILLO, J. S; GASPAR, S. L; NICULESCU, M; MORTARI, A; BONTIDEAN, I; SOUKHAREV, V; DORNEANU, S. A; RYABOV, A. D; CSÖREGI, E. **Biosensors For Life Quality Design, Development And Applications. Sensor and Actuator B**, 2004.102. 179p.

DATASUS, 2007. www.datasus.gov.br acessado em 29 08 07 as 19 59 Acompanhamento da Hanseníase.

DAVID, H. S; GONZALES, M. D; GARCIA, M. B. G; GARCIA, A. C. **Enzymatic Genosensor on Streptavidin-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes**. Analytical Chemistry. 2004. 76. 6887p.

D'ORAZIO, P. D. **Biosensors In Clinical Chemistry**. Clinica Chimica Acta. 2003. 334. 41p.

DE PAOLI, M-A; MAIA, D. J; ALVES, O. L. **Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras**. Química Nova. 2000. 23:2, 204p.

DE WIT, M.Y.L.; FABER, W.R.; KRIEG, S.R.; DOUGLAS, J.T.; LUCAS, S.B.; MONTREEWASUWAR, N. *et al.* **Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues**. Journal of Clinical Microbiology. 1991. 29. 906p.

DORNELES, M. M.; **Dissertação De Mestrado**, Universidade Federal De Uberlândia, Brasil, 2005.

DRUMMOND, T. G; HILL, M. G; BARTON, J. K. **Electrochemical DNA sensor**. Nature Biotechnology. 2003. 21:10.1192p.

CHRISTINE, E.S; VENKATRAM, R.S; JOSPEH, P.V; ROBERT, L. **Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer** Proceedings of the National Academy of Sciences . U.S.A.1997. 94. 8948p.

EKINCI, E. KARAGOZLER, A. A; KARAGOZLER, A. E. **The preparation ans Sensor Application of poly(*p*-Aminophenol).** Eletroanalysis. 1996. 8:6. 571p.

ENESCU, M; L, B; GHEORGHE, V. **Molecular Dynamics Simulation of methylene Blue – Guanine Complex in Water: The Role of Solvent in Stacking.** Journal Physics Chemistry. 2000. 1004. 1073p.

FERREIRA, L. F; MADURRO, J. M. ; BOODTS, J. F. C. ; MADURRO, A. G. B. **Gold electrodes modified with poly(4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide** (publicado online em 13 de Dezembro de 2007). Polymer International. 2007 Vx, p. xx.

FOSS, N. T. **Aspectos Imunológicos Da Hanseníase.** Simpósio: Hanseníase, Ribeirão Preto. 1997. 30. 335p.

FRANCO, D. L. ; AFONSO, A. S. ; FERREIRA, L. F. ; GONCALVES, R. A. ; BOODTS, J. F. C. ; MADURRO, A. G. B. ; MADURRO, J. M. . **Electrodes modified with polyaminophenols: immobilization of purines and pyrimidines.** Polymer Engineering and Science. 2007. Vx, pxx.

FRANCO, D. L; MADURRO, J. M. ; AFONSO, A. S. ; VIEIRA, S. N. ; FERREIRA, L. F. ; GONCALVES, R. A. ; MADURRO, A. G. B. . **Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: electric and morphologic properties** (publicado online em 21 de Setembro de 2007). Materials Chemistry and Physics. 2008. 107. 404p.

FREIRE, R. S; PESSOA, C. A. KUBOTA. L. T. **Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.** Química Nova. 2003a. 26:3. 381p.

FREIRE, R. S; PESSOA, C. A. MELLO, L. D KUBOTA, L. T. **Direct Electron Transfer: An Approach for Electrochemical Biosensors with Higher Selectivity and Sensitivity.** Journal Brazilian Chemistry Society. 2003b. 14:2. 230p.

HARSAÂNYI GAÂBOR, G. **Polymer films in sensor applications: a review of present uses and future possibilities.**Sensor review. 2000. 20:2. 98p.

GIROTTTO, E. M; DE PAOLI. **Transporte de massa em polímeros intrinsecamente condutores: importância, técnicas e modelos teóricos.** Química nova. 1999. 22:3 359p.

GOODING, J.J; **Biosensor technology for detecting biological warfare agents: Recent progress and future trends.** Analytica Chimica Acta. 2006. 559. 137p.

HACCOUN, M. C; PIRO, B; PHAM, L. D; TRAN, RUBIM, A; PERROT, H; GABRIELLI, C. **Study of the DNA hybridization transduction behavior of a quinone-containing electroactive polymer by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy.** Journal of Electroanalytical Chemistry. 2005. 577. 155p.

HAWLEY, D; ADAMS, R. N. **Homogeneous chemical reactions in electrode processes : Measurement of rates of follow-up chemical reactions .**Journal Electroanalytical Chemistry. 1965. 10, 376.

SHIU KWOK-KEUNG; DAI HONG-PING; WU QI-HUI A; SUN SHI-GANG;. **Electrochemical quartz crystal microbalance studies on the electropolymerization processes of *ortho*-phenylenediamine in sulfuric acid solutions.** Journal of Electroanalytical Chemistry. 1998. 456. 47p.

IHARA, T; MARUO, Y; TAKENAKA, S; TAKAGI, M; **Ferrocene-oligonucleotide conjugates for electrochemical probing of DNA.** Nucleic Acids Research. 1996. 24:21. 4273p.

JIN, Y; YAO, X; L, Q; LI, J. **Hairpin DNA probe based electrochemical biosensor using methylene blue as hybridization indicator.** Biosensors and Bioelectronics. 2006. 22. 1126p.

KARA, P; KERMAM, K; OZKAN, D; MERIC, B; ERDEM, A; OZKAN, Z; OZSOZ, M. **Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA.** Electrochemistry Communications. 2002. 4. 705p.

KARA, P; MERIC, B; ZEYTINOGLU, A; OZSOS, M, **Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples.** Analytica Chimica Acta. 2004. 518. 69p.

KERMAN, K; KOBAYASHI, M; TAMIYA, E. **Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology.** Measurement Science And Technology. 2003. 15, R1.

LEE, TAE-YOUNG; SHIM, YOON-BO. **Direct DNA Hybridization Detection Based on the Oligonucleotide-Functionalized Conductive Polymer.** Analytical Chemistry. 2001. 73. 5629p.

LOBO, R.F.M.; PEREIRA-DA-SILVA, M.A.; RAPOSOS, M.; FARIA, R.M.; OLIVEIRA JR, O.N. **In situ thickness measurements of ultra-thin multilayer polymer films by atomic force microscopy.** Nanotechnology. 1999.10. 389-393p.

LOMBARD, C; SUÁREZ, R.E.G; **Epidemiologia da Hanseníase** in: Talhari, S.; Neves, R.G. Hanseníase, 3^a ed. Manaus: 1997. capítulo.12. 127p.

LONG, D. D; MARX, K. A; Z. T. **Amperometric hydrogen peroxide sensor electrode coated with electropolymerized tyrosine derivative and phenolic films.** Journal of electroanalytical Chemistry. 2001. 501. 107p.

LUCARELLI, F; MARAZZA, G.; TURNER, A.P.F.; MASCINI, M. **Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors Biosensors Bioelectronics** 2004.19. 515p.

MALINAUSKAS, A; GARJONYTĖ, R.; MAŽEIKIENĖ, R; JUREVIČIUTĖ, I. **Electrochemical response of ascorbic acid at conducting and electrogenerated**

polymer modified electrodes for electroanalytical applications: a review. Talanta. 2004. 64. 121p.

SHIRAKAWA, H; LOUIS, J. E; MACDIARMID, A. G; CHIANG, C. K; HEEGER, A. J. **Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH)_x** Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. 1977. 16. 578p.

MENEZES, H. A; MAIA, G. **Films formed by the electrooxidation of p-aminophenol (p-APh) In aqueous medium: What do they look like?** Journal of Electroanalytical Chemistry. 2006. 586. 39p.

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

MIKKELSEN, R. S; MILLAN, M. K; SARAULL, A. **Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode.** Analytical chemistry. 1994. 66. 2943p.

PAES, N. A.; SILVA, L. A. A. **Doenças infecciosas e parasitárias no Brasil: uma década de transição** Revista Panam Salud Publica/Pan American Journal Public Health. 1999. 6. 99p.

PECK, R. J; CAI, W; VAN DER WIDE, D. W; HAMERS, J. R. **Direct electrical detection of hybridization at DNA-modified silicon surfaces.** Biosensors and Bioelectronics. 2004. 19. 1013p.

PEREIRA, A. C; SANTOS, A. S; KUBOTA, L. T; **Tendência em modificação de Eletrodos Amperométricos para aplicações eletroanalíticas.** Química nova. 2002. 25:6. 1012p.

PINGANG,H; YING, X; YUXHI, F. **A Review: Electrochemical DNA Biosensors for sequence Recognition.** Analytical Letters. 2005. 35. 2597p.

RAMAPRASAD, P., FERNANDO, A., MADHALE, S., RAO, J.R., EDWARD, V.K., SAMSON, P.D., KLATSER, P.R., DE WIT, M.Y., SMIT, W.C., CREE, I.A. **Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity.** Leprosy review. 1997. 68:4. 301p.

ROHS, R; SKLENAR, H; LAVERY, R; RODER, B. **Methylene Blue Binding to DNA with Alternting GC Base Sequence: A Modeling Study.** Journal American Chemistry Society. 2000. 122. 2860p.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. **Biossensores Amperométricos para Determinação de Compostos Fenólicos em Amostras de Interesse Ambiental.** Quimica Nova. 2001. 24. 77p.

SADKI, S; SCHOTTLAND, P; BRODIE, N; SABOURAUD, G. **The mechanisms of pyrrole electropolymerization.** Chemical Society. 2000. 29. 283p.

SALAVAGIONE, H. J; ARIAS, J; GARCÉS, P; MORALLÓN, E; BARBERO, C; VÁZQUEZ, J. L. **Spectroelectrohemcial study of the oxidation of aminophenols on platinum electrode in acid media.** Journal of Electroanalytical Chemistry. 2004. 565. 375p.

SAKER, L.; LEE, D.; CANNITO, B.; GILMORE, A.; LENDRUM, D. C. **Globalization and infectious diseases: A review of the linkages.** Special Topics In Social, Economic And Behavioural (SEB) Research. 20041, 3.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989) **Molecular cloning: a laboratory manual** (2nd ed.). Vol 1, 2 e 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual** (2nd ed.). Vol 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, CHarbor, New York, 1989.

SAMUEL, L; MOSCHELLA, M.D. **An Update On The Diagnosis And Treatment Of Leprosy**. Journal of the American Academy of Dermatology. 2004. 51. 417p.

SAÚDE BRASIL. **Uma Análise Da Desigualdade Em Saúde**. Brasília-DF, 2006.

SAÚDE 2007 <[Http://Portal.Saude.Gov.Br/](http://Portal.Saude.Gov.Br/)> Acessado 06 Agosto 2007 23:00.

SAUERBREY, G.; **Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung**. *Z. Phys.* 1959.155:2, 206p.

SCALEA-LA, M. A; SERRANO, S. H. P; GUTZ, I, G. R. **Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise**. Química Nova. 1999. 22:3. 417p.

SNOOK, G.A.; Bond, A.M.; Fletcher, S. **The use of massograms and voltammograms for distinguishing five basic combinations of charge transfer and mass transfer at electrode surfaces**. Journal Electroanalatical. Chemistry. 2002. 526 1p.

SOWERBY, S. J; STOCKWELL, P. A; HECKL, W. M; PETERSEN, G.B. **Self-programmable, self-assembling two-dimensional genetic matter**. Origins of Life and Evolution of Biospheres. 2000. 30: 1. 81p.

STEPHEN J. SOWERBY, S. J; COHN, C. A; HECKL, W. M; HOLM, N. G **Differential adsorption of nucleic acid bases: Relevance to the origin of life**. Proceedings of the National Academy os Sciences of the United States of America PNAS. 2001. 98:3. 820p.

STEPHEN, L. W and DIANA, N.J. **LEPROSY**. Clinics In Dermatology. 2007. 25. 165p.

TAJ, S. AHMED; M. F; SANKARAPAPAVINASAM, S. **Poly(para-aminophenol): a new soluble, electroactive conducting polymer**. Journal of Electroanalytical Chemistry. 1992. 338. 347p.

TALHARI, S. NEVES, R.G. **Hanseníase: Dermatologia Tropical**. Gráfica Tropical 3^a ed., Manaus-AM, 1997. 149p.

THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY, 2000: Conductive polymers.
www.nobel.se/announcement/2000.

TLILI, C; YOUSOUFI, H. K; PONSONNET, L; MARTELET, C; NICOLE, J; REANAULT, J. **Electrochemical impedance probing of DNA hybridisation on oligonucleotide-functionalised polypyrrole**. Talanta. 2005. 68. 131p

TURNER, A.P. F; KARUBE, I; WILSON, G. S. **Biosensor Fundamental and Applications**, Oxford University Press, Oxford, 1987, 770p.

UMEZAWA, Y; AOKI, H. **Electrochemical detection method of complementarity to nucleic acid bases** US Patent Issued on January. 2007. 30.

VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R.M. **Técnicas de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo**. Química Nova. 2000. 23:5. 664p

VAN BEERS, S.M.; DE WIT, M.Y.; KLATSER, T.R. **The epidemiology of *Micobacterium leprae*: recent insight**. FEMS Microbiology Letters. 1996.136. 221p.

VIEIRA, S. N; AFONSO, A. S; MADURRO, A. G. B; FERREIRA, L. F; ARIZA, R. G; FILHO, L. R. G; MADURRO, J. M. **Electrochemical Modification of graphite electrodes with poly(4aminophenol)**. Macromolecular Symposia. 2006.236. 246p.

WALDMAN, A. E.; SILVA, L. J.; MONTEIRO, C. A. **Informe Epidemiológico Do SUS**. 1999, 8. 5p.

WANG, J. **Survey and Summary from DNA biosensor to gene chip**. Nucleic acid res research. 2000. 28:16. 3011p.

WANG, J. **Modified electrodes for electrochemical sensors**. Electroanalysis 1991, 3. 255p.

WARWICK, J. B; DIANA, N. J. L. **Leprosy**. The Lancet. 2004. 363. 1209p.

Weekly Epidemiological Record. **Global Leprosy Situation**. 2007. 82. 225p.

WEI, D; LINDFORS, T; KVARNSTROM, C; KRONBERG, L; SJOHOLM, R; IVASKA, A. **Electrosynthesis and characterisation of poly(N-methylaniline) in organic solvents**. Journal of Electroanalytical Chemistry. 2005. 575. 19p.

WHO, 2007<www.who.int/Lep/En/> Acessado 06 Agosto 2007, 22:30.

WHO. **Global Leprosy Situation in 2003** <www.who.int/lep> Acessado em: 12 apr.2005.

XIE, H; YU, Y.H; XIE, F; GAO, Z. **A nucleic biosensor for gene expression anlysis in nanograms of mRNA**. Analytica Chemistry. 2004. 76. 4023p.

XU, C; CAI, H; HE, P; FANG, Y. **Ferrocenecarboxaldehyde labeled DNA probe for the study on DNA damage and protection**. Fresenius Journal Analytical chemistry. 2000. 367. 593p.

YAN, F; ERDEM, A; MERIC, B; KERMAN, K; OZSOZ, M; S, O. A. **Electrochemical DNA biosensor for the detection of specific gene related to Microcystis species**. Electrochemistry Communication. 2001. 3. 224p.

YE, K. Y; ZHAO, J. H; YAN, F; ZHU, Y. L; JU, H. X. **Electrochemical behavior and detection of hepatitis B virus DNA PCR production at gold electrode.** Biosensors and Bioelectronics. 2003. 18. 1504p.

YOON, K-H.; CHO, S-N.; LEE, M-K.; ABALOS, R.M.; CELLONA, R.V.; FAJARDO JR.; GUIDO, L.S.; DELA CRUZ, E.C.; WALSH, G.P.; KIM, J-D. **Evaluation of Polymerase Chain Reaction Amplification of Mycobacterium leprae-Specific Repetitive Sequence in Biopsy Specimens from Leprosy Patients.** Journal of Clinical Microbiology. 1993.31. 4. 895p.

ZHANG, Y; KIM H-H, HELER. A. **Enzyme-amplified amperometric detection of 3000 copies of DNA in a 1,0 μ L droplet at 0,5fM concentration.** Analytical Chemistry. 2003. 75. 3267p.