



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**IMOBILIZAÇÃO E DETECÇÃO DE
BIOMOLÉCULAS EM MATRIZES DE POLI(ÁCIDO
4-HIDROXIFENILACÉTICO): APLICAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES**

TATIANA APARECIDA ROSA DA SILVA

UBERLÂNDIA
2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**IMOBILIZAÇÃO E DETECÇÃO DE
BIOMOLÉCULAS EM MATRIZES DE POLI(ÁCIDO
4-HIDROXIFENILACÉTICO): APLICAÇÕES NO
DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES**

TATIANA APARECIDA ROSA DA SILVA

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

Orientadora: **Profa. Dra. ANA GRACI BRITO-MADURRO**

Co-Orientador: **Prof. Dr. JOÃO MARCOS MADURRO**

UBERLÂNDIA
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586i Silva, Tatiana Aparecida Rosa da, 1982-
Imobilização e detecção de biomoléculas em matrizes de poli (ácido 4-
hidroxifenilacético) : aplicações no desenvolvimento de genossensores /
Tatiana Aparecida Rosa da Silva. - 2008.
88 f. : il.

Orientadora: Ana Graci Brito-Maduro.

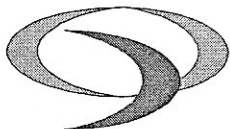
Co-orientador: João Marcos Maduro.

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

Inclui bibliografia.

1. Polímeros - Teses. 2. Biosensores - Teses. 3. Polimerização - Teses.
I. Brito-Maduro, Ana Graci. II. Maduro, João Marcos. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 678.7



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

ALUNO(A): TATIANA APARECIDA ROSA DA SILVA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5061404

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Imobilização e detecção de biomoléculas em matrizes de poli(ácido 4-hidroxifenilacético): aplicações no desenvolvimento de genossensores”

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 25 de fevereiro de 2008, às 9:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof^a Dra. Ana Graci Brito Madurro

(Instituto de Química / UFU)

Prof. Dr. Wellington Oliveira Cruz

(Instituto de Química / UFU)

Prof^a Dra. Hideko Yamanaka

(UNESP)

Uberlândia, 25 de fevereiro de 2008.

O Caminho das Estrelas

Nunca abandone um sonho! Abandonar um sonho é o mesmo que abandonar você!

Um sonho é tão importante quanto seu braço ou sua perna.

Assim, abandonar um sonho é como que deixar para trás uma parte de você mesmo; e, o que é pior, uma parte da sua alma.

Jamais desista de um sonho. Em caso de tropeço, saiba que eles acontecem para você conhecer o seu poder.

Avance sempre! Nem que seja um simples milímetro. E, só pare quando puder comemorar sua vitória!

A vida é a doce arte de transformar o impossível em realidade. Sempre que você tiver uma meta muito difícil de realizar – como devem ser todas as boas metas – a maioria das pessoas vai dizer: “desista, isso é impossível!”...

Não acredite nisso; não deixe de cuidar bem dos seus sonhos e, principalmente, não permita que ninguém destrua os seus sonhos.

Vá atrás deles, pois eles definirão o tamanho da sua vida.

Avance no caminho das estrelas, fazendo, realizando, porque:

Querer não é poder!. Poder é fazer!

AGRADECIMENTOS

Sabia que aqui seria a parte mais difícil e emocionante, pois aqui quero registrar os mais profundos agradecimentos a todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para que eu desse mais este passo em minha vida.

Primeiro quero agradecer a Deus por me acompanhar sempre e me dar forças nessa jornada, porque só ele sabe o caminho pelo qual tive que traçar para chegar até aqui: foram muitos caminhos de espinhos e obstáculos, enfim as dificuldades; mas estas foram como um grão de areia no mar se comparadas às alegrias e as realizações, a felicidade, esta sim faz tudo valer a pena e tudo se transformar em virtudes.

Gostaria de deixar aqui os profundos agradecimentos aos meus pais Fátima e João por me terem dado a vida, a educação e o caráter que tenho e lhes dedicar mais esta vitória. Sei que não foi fácil pra eles mais aos “trancos e barrancos” puderam me dar subsídios para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Amo vocês mãe e pai.

Quanto ao meu amor, meu marido, Marco Polo, meu nenê, sempre acreditou no meu sucesso, e que sempre me levanta do chão quando eu caio, e que fica nervoso também quando percebe algo errado, a ele serei eternamente grata pelos carinhos e colos oferecidos nos momentos de tristeza e pela felicidade que é estar ao seu lado.

A minha família quero aqui deixar minhas saudações a todos e em especial, ao meu irmão Cristiano, meus sobrinhos aos meus cunhados e aos meus sogros Antônio e Elza e a minha prima Fabiana, por sempre me tratarem com tanto carinho e respeito.

As minhas amigas Vanessa, Silvia, Yara e Aimee que sempre torceram pelo meu sucesso. À minha mestra tia Ângela por sempre acreditar em mim. Ao “cabeção”, Lucas, pelo companheirismo e por me ensinar a não reclamar, à Sabrina pelos momentos de companheirismo e de conselhos, ao Diego pelos momentos de descontração e de amizade, e em especial aos colegas de laboratório e amigos: André, Franciele, Letícia, Érica, Carla, Daniel, Guedmiller, Leandro, Adriano, Wallans, Cláudio, Alessandra, Vilma, Márcia e Odilon. A todos que passaram por minha vida que não foram citados, mas que estão marcados na memória.

Meu muito obrigada aos meus orientadores Ana Graci Brito-Madurro e João Marcos Madurro por me darem a oportunidade de ingressar na pesquisa e pela ajuda com ensinamentos que nada pode apagar, com suas respectivas competências.

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

4-HFA – Ácido 4-hidroxifenilacético
A – Ampère
AMP – Adenosina monofosfato
BE – Brometo de etídio
bpy- Bpiridina
cDNA- DNA complementar
C- Capacitância
Cdl- Capacitância da dupla camada
CEPs- Polímeros eletricamente Condutores
DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 – Tipos de vírus da dengue ou sorotipos da dengue
DF- Dengue clássica
DHF - Dengue hemorrágica
DNA- Ácido deoxirribonucleico
dsDNA- fita dupla de DNA
DTT - Ditioneitol
E- potencial
EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica
EQM – Eletrodo quimicamente modificado
f – Frequência
GMP - Guanosina monofosfato
IOM- Instituto Otavio Magalhães
m – Massa
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MFA - Microscopia de força atômica
M.M – Massa Molar
MS- Ministério da Saúde
OD- Densidade óptica (Absorbância)
OMS- Organização Mundial de Saúde
pb- Pares de base
PC – Polímero condutor
PAni- Polianilina
PNCD- Programa Nacional de Controle da Dengue

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PICs- Polímeros intrinsecamente condutores

OCP - Potencial de circuito aberto

P_{O2} - Pressão parcial de oxigênio

PPi- Polipirrol

PTf- Politiofeno

Q – Capacitância

R – Resistência

Rs- Resistência da solução

RNA- Ácido ribonucléico

RT-PCR – Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase

Rct- Resistência à transferência de carga

ssDNA- Fita simples de DNA

s - Segundos

S - Pulso de potencial

SSC – tampão de citrato de sódio e cloreto de sódio

SVS/MS- Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

UV- Ultravioleta

V – Volts

VC – Voltametria cíclica

VPD - Voltametria de pulso diferencial

W – Warburg

Zw - Impedância por difusão (Warburg)

Z' – Resistência

Z'' – Reatância

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1º - CAPÍTULO : INTRODUÇÃO	1
1 – Introdução	2
1.1 - Eletrodos Quimicamente Modificados por Filmes Poliméricos	2
1.2 – Técnicas Eletroquímicas de Preparação de Polímeros	7
1.2.1 - Fundamentos e Definições	7
1.2.2 – Técnicas Eletroquímicas	8
1.3 – Sensores Biológicos	11
1.3.1 – Genossensores Baseados em Detecção Eletroquímica	13
1.4 - Dengue	19
1.4.1 - Histórico e Definições	19
1.4.2 – A Dengue no Brasil e no Mundo	21
1.4.3 – Diagnóstico da Doença	25
1.5 – Objetivos	27
1.5.1 – Objetivo Geral	27
1.5.1 – Objetivos Específicos	27
2º - CAPÍTULO: PARTE EXPERIMENTAL	28
2 - Parte Experimental	29
2.1 - Materiais e Equipamentos	29
2.2 - Reagentes e Soluções Utilizadas	31
2.3 – Procedimentos Experimentais	33
2.3.1 - Limpeza do Material	33
2.3.2 - Determinação da Qualidade da Superfície do Eletrodo de Trabalho	33
2.3.3 – Formação de Filme Polimérico	33
2.3.4 – Incorporação de Biomoléculas ao Eletrodo Modificado	34
2.3.4.1 – Imobilização de Nucleotídeos Monofosfatos	34
2.3.4.2 – Estudo da Variação do pH de Detecção	34
2.3.4.3 – Imobilização de Oligonucleotídeos	34
2.3.5 – Estudos com produto de PCR específico para dengue (DEN-1)	35
2.3.5.1 – Dosagem de DEN-1	35

2.3.5.2 – Amplificação de DEN-1	35
2.3.5.3 – Detecção da Hibridação	36
2.3.6 – Análises das Superfícies	37
2.3.6.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
2.3.6.2 - Microscopia de Força Atômica (MFA)	37
2.3.6.3 - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)	38
3º - CAPÍTULO: RESULTADOS e DISCUSSÃO	39
3 – Resultados e Discussão	40
3.1 - Estudo de Dependência do pH na Formação do Filme	40
3.1.1 - Comportamento Eletroquímico de Ácido 4-HFA	40
3.1.2 - Estudo da Espectroscopia de Ultravioleta (UV)	42
3.1.3 – Eletropolimerização de Poli (4-HFA) em Diferentes Valores de pH	44
3.2 – Estudos de Variação do Número de Varreduras para Eletrodeposição de Poli (4-HFA)	47
3.2.1 – Eletropolimerização e Propriedades de Poli(4-HFA)	47
3.2.2 - Estudo de Espectroscopia de Impedância	52
3.3 – Incorporações de Biomoléculas	55
3.3.1 - Estudo de Incorporação de Nucleotídeos sobre Eletrodos de Grafite sem Filme e Modificados com Poli(4-HFA)	55
3.3.1.1 – Estudos de Variação do pH para Detecção das Bases Nitrogenadas	58
3.3.1.2 – Análises das Superfícies por MFA para Eletrodos Modificados com Poli (4-HFA) ou Poli (4-HFA) contendo AMP ou GMP	60
3.3.1.3 – Estudos de EIE para os Eletrodos Modificados com Poli(4-HFA) contendo Biomoléculas	61
3.4 – Caracterização Voltamétrica da Imobilização e Detecção de Oligonucleotídeos ..	62
3.5 – Estudos de Imobilização e Detecção de Fragmento de DNA de Região Conservada do Vírus da Dengue (DEN-1)	65
3.6 – Caracterização da Superfície Hibridizada	66
4º - CAPÍTULO: CONCLUSÕES	69
4 – Conclusões	70
5º - CAPÍTULO : REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
5 – Referências Bibliográficas	72

Lista de Figuras

Figura 1 – Dopagem do poliacetileno com iodo.....	03
Figura 2 – Estrutura de polímeros conjugados mais utilizados.....	04
Figura 3 - Estrutura do ácido 4-hidroxifenilacético (a) fórmula estrutural (b) modelo tipo bola-e-bastão.....	06
Figura 4 - Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d0 a d1) camada interna compacta e (d1 a d2) camada difusa	07
Figura 5 – Forma da onda utilizada na voltametria cíclica.....	09
Figura 6 - Representação esquemática de aplicação de potencial em função do tempo em pulso diferencial.....	10
Figura 7 – Esquema de biossensor.....	12
Figura 8 – Métodos de imobilização de biomoléculas em filmes poliméricos.....	14
Figura 9 - Esquema de hibridização. A representa a imobilização da fita simples; B representa a formação da fita dupla de DNA na superfície do EQM.....	15
Figura 10 - Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA.....	16
Figura 11 - Esquema da detecção eletroquímica da hibridização do DNA. (1) Pareamento das bases nitrogenadas do DNA, (2) Intercalação e acúmulo do indicador na fita dupla do DNA (3) Sinal obtido.....	17
Figura 12 – (a) Brometo de etídio; (b) processo de intercalação da <i>ds</i> -DNA.....	18
Figura 13 - Representação esquemática da oxidação da guanina mediada por um ligante redox-ativo, Ru(bpy) ₃	18
Figura 14 – Fêmea do mosquito <i>Aedes aegypti</i> no momento de uma picada	19
Figura 15 - Ciclo de evolução do <i>Aedes aegypti</i>	20
Figura 16 - Zonas endêmicas (representadas em vermelho ou amarelo) de dengue no mundo	22
Figura 17 - Distribuição dos Estados por Áreas de Incidência, Brasil, 2007	23
Figura 18 - Distribuição dos casos de dengue notificados no Brasil por Unidade Federativa.....	24

Figura 19 – (A) célula eletroquímica; (B) eletrodo de trabalho de carbono grafite na base de teflon, à esquerda da moeda; (C) eletrodo auxiliar de platina; eletrodo de referência de (D) prata/cloreto de prata e de (E) calomelano.....	29
Figura 20 – Sistema de detecção de biomoléculas.....	29
Figura 21 - Potenciostatos utilizados para os experimentos eletroquímicos. (A) PAR 273A e (B e C) CH Instruments 420 e 760A.....	30
Figura 22 - Equipamentos utilizados para a caracterização morfológica da superfície. (A) microscópio eletrônico de varredura, (B) microscópico de força atômica. As análises de MEV e MFA foram realizadas no Laboratório de Tribologia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica/UFU e Instituto de Física USP/São Carlos, respectivamente.....	31
Figura 23 - Primeiros voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em solução de ácido (4-HFA) ($1,5 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹) em meio de HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ , 50 mV s ⁻¹ . Valores de pH: (■) 0, (□) 1, (▲) 2, (—) 4, (---) 7, (→) 8, (○) 10 e (●) 12. As setas indicam deslocamento de potencial ou aumento/diminuição nos valores de corrente.....	40
Figura 24 – (a) Distribuição das estruturas de acordo com o pH. (b) Equilíbrio presente na solução do monômero de acordo com os valores de pK _a	41
Figura 25 - Dependência do potencial com o valor de pH para poli(4-HFA). As estruturas indicadas ao lado são as predominantes, no respectivo pH.....	42
Figura 26 - Espectro de UV de 4-HFA em meio de pH (a) 0,3; (b) 8,0; (c) 12,0.....	43
Figura 27 - Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em solução de 4-HFA $1,5 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹ em solução aquosa de HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ . (a) pH 0,3; (b) 2,0; (c) 7,0; (d) 10,0; (e) 12,0 à 50 mV s ⁻¹ . As setas indicam o efeito do aumento do número de ciclos nos valores de corrente.....	44
Figura 28 – Voltamogramas cíclicos de eletrodo de grafite em solução de 4-HFA ($1,5 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹) em HClO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ em pH 0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 7,0; 8,0; 10,0; 12,0; 50 mV s ⁻¹ , 100 varreduras. As setas indicam diminuição nos valores de corrente com aumento dos valores de pH.....	45

- Figura 29** - Voltametria cíclica do eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA), preparado nos valores de pH: 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 7.0, 8.0, 10.0 e 12.0, em solução de $K_3Fe(CN)_6 / K_4Fe(CN)_6$. As setas indicam diminuição nos valores de corrente e aumento dos valores de pH..... 46
- Figura 30** – Imagens de topografia da superfície por MEV dos eletrodos de grafite após a polimerização com HFA, 500x. (a) 0,0; (b)1,0; (c) 2,0; (d) 7,0; (e)10,0 e (f)12,0..... 47
- Figura 31** - Voltametria cíclica de eletrodo de grafite em solução aquosa de 4-HFA $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em meio ácido de $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , 200 varreduras..... 48
- Figura 32** - Voltamograma cíclico de eletrodo de carbono grafite modificado com poli(4-HFA), 200 varreduras, em $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} 48
- Figura 33** - Voltamograma cíclico de eletrodo de grafite (—) não-modificado e (□) modificado com poli (4-HFA) em $K_3Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) / $K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) em $0.1 \text{ mol L}^{-1} KNO_3$, 100 mV s^{-1} 49
- Figura 34** - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo de grafite em (a) 4-HFA $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 100 Varreduras, 50 mV s^{-1} ; (b) em solução aquosa de $HClO_4$ $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, 50 mV s^{-1} , (c) solução aquosa de $K_3Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) / $K_4Fe(CN)_6$ (5 mmol L^{-1}) em $0.1 \text{ mol L}^{-1} KNO_3$, 100 mV s^{-1} . (---) não-modificado e (—) modificado com poli (4-HFA)..... 50
- Figura 35** - Voltametria cíclica do poli(4-HFA), eletropolimerizado em diferentes números de varreduras: (□) 100 e (⊗) 200; em solução monomérica de 4-HFA $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ em $HClO_4$ 0.5 mol L^{-1} , 50 mV s^{-1} . As setas indicam aumento de valores de corrente, com o aumento do número de varreduras. 51
- Figura 36** – Imagens de topografia da superfície por MEV dos eletrodos de grafite após a polimerização com poli (4-HFA) em meio ácido com ampliação de 200 x. (a) 100 varreduras e (b) 200 varreduras..... 51
- Figura 37** - (I) Diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') em KCl 1.0 mol L^{-1} para eletrodo modificado com poli(4-HFA) usando: (O) 100 ciclos; (□) 200

ciclos e (Δ) 200 ciclos, mas com a concentração do monômero 10x maior ($1.5 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$). A linha contínua representa o ajuste usando o circuito equivalente mostrado na Figura 35, onde: $n=6$ para 100 e 200 ciclos; $n=5$ para 200 ciclos com a concentração do monômero $1.5 \cdot 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. O gráfico inserido corresponde ao voltamograma cíclico de poli(4-HFA) em KCl 1.0 mol L^{-1} à 100 mV s^{-1} sendo (a) 100 ciclos; (b) 200 ciclos e (c) 200 ciclos com a concentração do monômero 10x maior. (II) Corresponde a ampliação dos voltamogramas cíclicos na baixa região de Z'	53
Figura 38 - Circuito equivalente usado para ajustar os dados de EIE.....	54
Figura 39 - Voltametrias de eletrodo, subtraídas de suas linhas de base, de grafite sem filme (---) ou modificado (—) com poli (4-HFA), 100 varreduras, contendo bases nitrogenadas imobilizadas. (I) AMP (II) GMP usando-se diferentes eletrólitos para a detecção. (a) tampão acetato, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5 ou (b) tampão fosfato, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4; 5 mV s^{-1} . As setas indicam oxidação de traços da base guanina.....	56
Figura 40 – Estruturas dos nucleotídeos (a) adenosina e (b) guanosina monofosfato.....	57
Figura 41 - Dependência do potencial de pico anódico em função do pH da solução tampão de detecção de (a) AMP, (b) GMP sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-HFA), 25 varreduras.....	58
Figura 42 – Análise da superfície de resposta para (a) AMP e (b) GMP como função do pH e valores de corrente de pico.....	59
Figura 43 - Imagens de MFA de eletrodos de grafite modificados com poli(4-HFA) 200 varreduras: (a) sem biomolécula, (b) poli(4-HFA)/AMP e (c) poli(4-HFA)/GMP.....	60
Figura 44 – (a) Diagrama de Nyquist ($-Z''$ vs. Z') em 1.0 mol L^{-1} KCl contendo para eletrodo de grafite modificado com (■) poli (4-HFA) contendo (●) AMP e (▲) GMP. (b): Gráfico inserido: ampliação das regiões da região indicada. A linha contínua representa o ajuste para o circuito equivalente mostrado na Figura 39.....	61

Figura 45 - VPD para eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA) contendo oligonucleotídeo, em tampão acetato, pH 4,5. (I): (a) poliG, (b) poliG:poliG, e (c) poliG:poliC (híbrido), (II) (a) poliA, (b) poliA:poliA, e (c) poliA:poliT (híbrido). Velocidade 10mV s^{-1} , amplitude de pulso 50 mV, largura de pulso 70 ms.....	63
Figura 46 – Esquema de hibridação de homooligonucleotídeos.....	63
Figura 47 - VPD para eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA) contendo o oligonucleotídeo polyGA:poliCT, em tampão acetato, pH 4,5. Sendo (a) poliGA, (b) poliGA: poliGA, e (c) poliGA:poliCT (híbrido). Velocidade 10mV s^{-1} , amplitude de pulso 50 mV, largura de pulso 70 ms.....	64
Figura 48 - Voltametria de pulso diferencial de brometo de etídio $6,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ como indicador redox, para eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA) (a) sem biomolécula (b) contendo $3,5 \text{ nmol L}^{-1}$ ssDNA e (c) após hibridação com o alvo complementar, dsDNA. Eletrólito: tampão fostato, pH 7,4, $0,1 \text{ mol/L}$. velocidade: 10 mVs^{-1} , amplitude de pulso: 50 mV, largura de pulso: 70 ms.....	65
Figura 49 – Voltametria de pulso diferencial de brometo de etídio $6,48 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ como indicador redox, para eletrodo de grafite modificado com poli(4-HFA) (a) sem biomolécula (b) contendo $3,5 \text{ nmol L}^{-1}$ ssDNA e após hibridação com o alvo complementar dsDNA com concentração de: (c) $3,5 \text{ nmol L}^{-1}$ (d) $0,35 \text{ nmol L}^{-1}$ dsDNA e (e) $0,035 \text{ nmol L}^{-1}$ dsDNA Eletrólito: tampão fostato, pH 7,4, $0,1 \text{ mol/L}$. velocidade: 20 mVs^{-1} , amplitude de pulso: 25 mV, largura de pulso: 60 ms.....	66
Figura 50 - Imagens topográficas de MFA de eletrodos de grafite modificados com filmes poli(4-HFA): (A e D) e após imobilização de oligonucleotídeo (poliGA): antes (B e E) e após hibridização com o alvo complementar (poliCT).....	67
Figura 51 - Imagens topográficas de MFA de eletrodos de grafite modificados com filmes poli(4-HFA): (A e D) e após imobilização de DEN-1: antes (B e E) e após hibridização com o alvo complementar.....	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Número de casos notificados de dengue de 2000 até 2007 no Brasil.....	24
Tabela 2 - Valores de comprimento de onda em diferentes valores de pH de 4-HFA.....	43
Tabela 3 - Valores do ajuste do circuito equivalente para o poli (4-HFA) preparado com (A) 100 ciclos (B) 200 ciclos e (C) 200 ciclos e concentração do monômero 10x maior.....	54
Tabela 4 - Valores de corrente e potencial de oxidação das bases nitrogenadas incorporadas em eletrodo de grafite sem e com filme poli(4-HFA), analisados em solução de tampão acetato (pH 4,50) e de tampão fosfato (pH 7,50).....	57
Tabela 5 - Valores do ajuste do circuito equivalente para o poli (4-HFA), poli (4-HFA)/AMP, poli (4-HFA)/GMP.....	62
Tabela 6 – Valores de rugosidade de eletrodos de grafite modificados com poli(4-HFA) na ausência e presença de biomoléculas.....	68

RESUMO

Eletrodos modificados com filmes poliméricos são matrizes eficientes para a imobilização de biomoléculas. Devido à funcionalização aniônica ou catiônica da superfície, eles promovem a repulsão eletrostática de interferentes e interação eficiente com a biomolécula imobilizada. Desta forma, os EQM impulsionam grande avanço no desenvolvimento de biossensores e sensores.

Visando a incorporação de nucleotídeos, oligonucleotídeos e fragmentos de DNA foram feitos estudos sobre a eletropolimerização do monômero ácido 4-hidroxifenilacético (4-HFA) sobre eletrodo de grafite, para se obter a melhor condição de polimerização e caracterização da superfície. Em valores de pH ácido, foi observada a formação de filmes com maior caráter eletroativo e que facilitam a transferência de elétrons frente ao par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$. A caracterização desses filmes, por meio de MFA e MEV, confirmou a deposição de material polimérico sobre a superfície.

Estudos de eletrooxidação e otimização de guanosina monofosfato e adenosina monofosfato imobilizadas sobre filmes de poli(4-HFA) foram realizados em diferentes valores de pH. A variação das condições experimentais, particularmente o pH do eletrólito, mostraram que o potencial de oxidação de AMP e GMP imobilizados sobre poli(4-HFA) decresceram com o aumento de valores de pH da solução. Maiores valores de corrente de oxidação foram obtidas para AMP em tampão fosfato (pH 7,5) e GMP em tampão acetato (pH 4,5).

A imobilização e detecção de oligonucleotídeos de 16 pb foram realizadas em matrizes de poli(4-HFA). No processo de detecção com o alvo complementar foi observado decréscimo nos valores de corrente, quando comparados com a resposta obtida antes da hibridização.

A magnitude do sinal de corrente da eletrooxidação dos nucleotídeos e oligonucleotídeos foi maior para os eletrodos de grafite modificados com poli(4-HFA), mostrando a eficiência da cobertura polimérica. A amplitude do sinal de corrente é um importante parâmetro para garantir a sensibilidade dos biossensores.

A hibridização com os fragmentos de DNA do vírus da dengue (DEN-1) foi feita utilizando brometo de etídio como indicador da hibridação. A formação de dsDNA foi monitorada por meio do aumento no sinal de corrente, provocado pelo acúmulo do intercalador sobre a superfície do eletrodo.

Imagens da topografia da superfície por MFA indicam que a imobilização de DEN-1 (ssDNA) sobre a matriz polimérica resulta em diminuição da rugosidade e, após a hibridização com o alvo complementar (dsDNA), observou-se a formação de maior número de glóbulos. As imagens de MFA comprovam a imobilização das biomoléculas em estudo, bem como, sugerem a hibridização com o alvo complementar.

ABSTRACT

Modified electrodes with polymer films are efficient matrix to biomolecules immobilization. Therefore due the anionic or cationic surface functionalization, they promote the electrostatic repulsion of interferents and efficient interaction with immobilized biomolecules. Of this form, they stimulate great advance in the development of biosensors and sensors.

Aiming at the incorporation of nucleotides, oligonucleotides and DNA fragments were made studies of the electropolymerization of the 4-hydroxyphenylacetic acid monomer on graphite surface, to obtain the best condition of polymerization and characterization of the surface. In more acid pH values, was observed the films formation with bigger electroactive character and with higher electrons transference in redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$. The characterization of these films by means of AFM and SEM confirmed the deposition of the polymer onto surface.

Electrooxidation and optimization studies of the adenosine monophosphate and guanosine monophosphate immobilized onto poly(4-HPA) films were carried out at different pH values. Variation of the experimental conditions, particularly of the pH of the electrolytic solution, showed that the oxidation potentials of immobilized AMP or GMP onto the modified electrodes decreased with increasing of pH values of the solution. Higher oxidation current was obtained to AMP in phosphate buffer (pH 7.50) and GMP in acetate buffer (pH 4.50).

The immobilization and detection of oligonucleotide of 16-pb were carried out on the poly(4-HPA). In the detection process with the complementary target was observed decrease in the values of current, when compared with the response obtained before of the hybridization.

The magnitude of the current signal of the eletrooxidation of nucleotides or oligonucleotides was bigger for the modified graphite electrodes with poly(4-HPA), in relation to the graphite electrodes without modification. The amplitude of the current signal is an important parameter that guarantees the sensitivity of the biosensors.

The immobilization and detection of DNA fragments of the dengue virus (DEN-1) was carried out using ethidium bromide as hybridization indicator. The dsDNA formation was monitored by means of the increase in the current signal, caused by accumulation of the intercalator on the surface of the electrode.

Images of the surface topography for AFM indicate that the DEN-1 (ssDNA) immobilization on the polymeric matrix results in reduction of the roughness and, after the hybridization with the complementary target (dsDNA), was observed formation of higher globules number. The AFM images showed the immobilization of biomolecules in study and suggest the hybridization with the complementary target.

1º - CAPÍTULO : INTRODUÇÃO

1 – Introdução

1.1 - Eletrodos Quimicamente Modificados por Filmes Poliméricos

Um histórico sobre tecnologia de polímeros evidencia que uma das propriedades mais importantes destes materiais sintéticos é sua capacidade de comportar-se como excelentes isolantes elétricos. No entanto, nos últimos anos uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir eletricidade. O interesse evidente é combinar em um mesmo material as propriedades elétricas de um semicondutor ou metal com as vantagens de um polímero [1].

Várias são as pesquisas em todo o mundo que mostram a interdisciplinaridade na aplicação de polímeros. A condutividade eletrônica desses materiais orgânicos tem atraído muito interesse devido ao desenvolvimento de projetos aplicados na produção de células solares, baterias, aparelhos eletrocromáticos, sensores, aparelhos eletrônicos moleculares, biossensores e Eletrodos Quimicamente Modificados (EQM) [2-11].

Murray e colaboradores, em 1975, introduziram o termo EQM para designar eletrodos com moléculas quimicamente ativas imobilizadas em sua superfície. O objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações [12,13].

Para o preparo de um EQM é necessário escolher adequadamente o material do eletrodo e o material a ser depositado, pois ambos devem apresentar características apropriadas para a análise em questão e serem compatíveis com a janela de potencial a ser utilizada. Dentre os materiais de eletrodo é possível citar o ouro, platina, carbono grafite, fibra de carbono, pasta de carbono, mercúrio e outros [14,15].

A modificação de eletrodos com filmes poliméricos permite a imobilização de camadas de espécies ativas sobre a superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica, por isso eles têm sido utilizados no desenvolvimento de sensores para proteger a superfície contra impurezas, bloquear interferentes, imobilizar biocomponentes e imobilizar mediadores [12]. Devido à grande variedade de polímeros eles podem ser utilizados conforme a aplicação desejada. Os filmes poliméricos

condutores têm sido utilizados [16,17] por aumentarem a eficiência de transferência de elétrons no sistema.

Na segunda metade da década de 70 foram descobertos os polímeros condutores, quando Shirakawa trabalhou junto com Heeger no laboratório de MacDiarmid, na Universidade da Pensilvânia e descobriram os primeiros “metais sintéticos” através do aumento da condutividade do poliacetileno ($10^{-9} \text{ S.cm}^{-1}$) para 10^5 S.cm^{-1} utilizando “dopagem” com agentes oxidantes, Figura 1 [17,18].

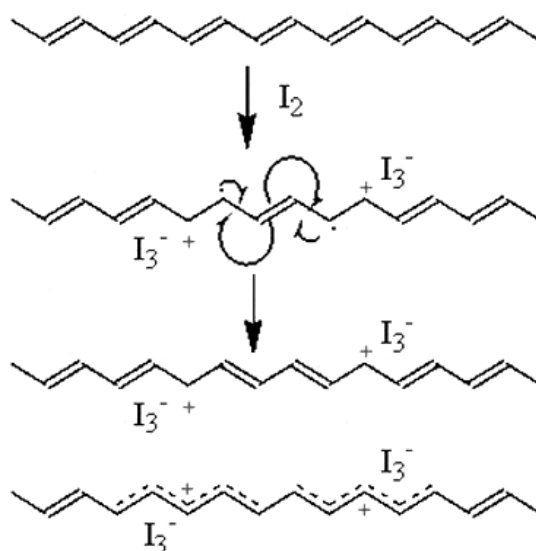


Figura 1 – Dopagem do poliacetileno com iodo.

O processo de dopagem envolve a remoção ou adição de elétrons da cadeia polimérica. O termo dopagem é utilizado em analogia aos semicondutores inorgânicos cristalinos, sugerindo semelhanças com os polímeros intrinsecamente condutores (PICs). Em ambos os casos a dopagem é aleatória e não altera a estrutura do material. No entanto, na dopagem de um polímero, as impurezas não são introduzidas nas cadeias, mas sim nas suas “vizinhanças”. Ao se adicionar o agente dopante, este gera uma deslocalização de cargas na cadeia polimérica com a neutralização através dos contra-íons, os quais são responsáveis pelo aumento na condutividade [17].

Os polímeros condutores contêm elétrons π ao longo de sua cadeia que são responsáveis por sua condutividade elétrica, pela baixa energia de transição óptica, pela baixa energia de ionização. A extensão do sistema π -conjugado dos polímeros, ligações

duplas e simples alternadas, faz com que a condutividade do polímero seja maior ou menor, pois esta propriedade depende da extensão da cadeia conjugada [19-22].

Uma nova classe de polímeros conhecidos como polímeros intrinsecamente condutores ou polímeros conjugados eletroativos, tem emergido desde a descoberta da condutividade dos polímeros [23-25]. Para que um polímero seja intrinsecamente condutor é necessário que haja uma sobreposição dos orbitais moleculares formando uma nuvem deslocalizada de elétrons [17-19].

Desde a descoberta feita por MacDiarmid e colaboradores com o poliacetileno, houve um crescimento significativo da pesquisa sobre estruturas poliméricas conjugadas, levando ao desenvolvimento de novas famílias de polímeros condutores. Dentre as famílias mais estudadas e aplicadas em sistemas biológicos são citados: polianilina (PAni) [25-30], polipirrol (PPi) [31-37], politiofeno (PTf) [38-40] e seus derivados (Figura 2). Os motivos da PAni e seus derivados serem importantes objetos de estudos se devem principalmente, à estabilidade química de sua forma condutora em condições ambientais, facilidade de polimerização e dopagem e baixo custo do monômero. O PPi, PTf e seus derivados também são facilmente oxidados eletroquimicamente, e tem sido preferencialmente utilizados por permitir a formação de filmes finos sobre eletrodos.

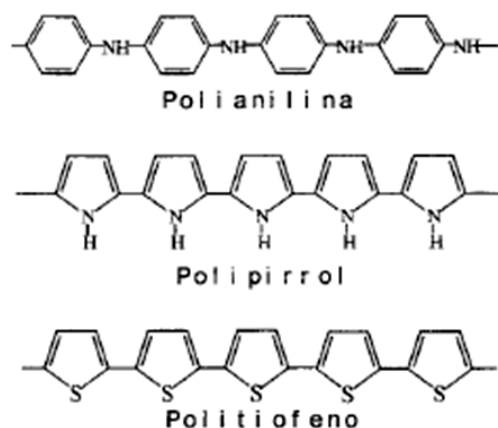


Figura 2 – Estrutura de polímeros conjugados mais utilizados.

Filmes condutores ou eletroativos têm sido extensivamente usados [23-41]. Este tipo de polímero apresenta vantagens, tais como a facilidade de sua produção, bem como a possibilidade de controle da espessura através do controle da passagem de carga elétrica durante a eletropolimerização [42,43].

Os polímeros não-condutores, que não possuem ligações duplas e simples alternadas, podem ser utilizados como matrizes suporte para imobilização de biomoléculas, visto que oferecem vantagens como a permeseletividade, a qual é usada para prevenir espécies interferentes de aproximação ou contaminação da superfície do eletrodo, alta seletividade, rápido tempo de resposta e reprodutibilidade [44]. Filmes formados por polímeros não-condutores preparados por eletropolimerização apresentam grande resistência e crescimento auto-limitado sendo que o filme formado é muito mais fino do que os filmes poliméricos condutores. Devido à sua fina espessura, entre 10 e 100 nanômetros, os substratos e produtos difundem-se mais rapidamente [45].

A eletrooxidação de monômeros tem sido largamente utilizada para produção de polímeros. Estudos reportam que eletrodos de grafite modificados com filmes eletropolimerizados aumentam a eficiência de imobilização de biomoléculas. O mecanismo da polimerização consiste na formação de um cátion-radical seguido de acoplamento para se formar um di-cátion e assim sucessivamente, formando-se os oligômeros e dando origem uma reação em cadeia na superfície do eletrodo, até se formar o polímero na superfície do eletrodo [46-48].

As condições da eletrossíntese são importantes, pois podem alterar as propriedades do filme formado, como por exemplo, a condutividade. Em estudos de filmes de politiramina [49,50] a condutividade foi aumentada ao se realizar os experimentos em meio ácido em relação ao filme eletropolimerizado em pH básico.

Estudos da formação, caracterização e aplicação de filmes poliméricos, derivados de compostos fenólicos, os quais são depositados eletroquimicamente sobre ânodos condutores tem sido intensificados nas últimas décadas [46,47,51]. Estas coberturas poliméricas têm recebido muita atenção, devido à funcionalização aniônica ou catiônica da superfície que promove a repulsão eletrostática de interferentes e interação acentuada com o analito [52]. Esta funcionalização pode oferecer uma localização especial na deposição, controle na espessura do filme e nas suas características morfológicas que facilitam a incorporação de moléculas ou biomoléculas de interesse, impulsionando grande avanço no desenvolvimento de biossensores e sensores, dentre outras aplicações [52-56].

Monômeros contendo grupamentos aromáticos ligados diretamente ao oxigênio apresentam facilidade de eletropolimerização sobre eletrodos de carbono vítreo, além da alta resistência mecânica do filme obtido, proporcionando maior estabilidade para o

eletrodo modificado formado. Estes filmes, contendo grupos funcionais na cadeia polimérica, podem auxiliar na formação de ligações do DNA com o transdutor, através de interação dos grupos funcionais com as bases nitrogenadas do DNA [57-62].

Nesse trabalho, o monômero utilizado para os estudos de eletropolimerização em eletrodo de carbono grafite foi o ácido 4-hidroxifenilacético (4-HFA). Este monômero (Figura 3) apresenta um grupo hidroxila (-OH) e uma carboxila (-COOH) em sua estrutura, que faz com que a solubilidade deste composto seja maior em solventes mais polares. O grupo (-OH) ligado ao anel aromático pode ser oxidado gerando um cátion radical, dando origem a espécie reativa fundamental para a polimerização.

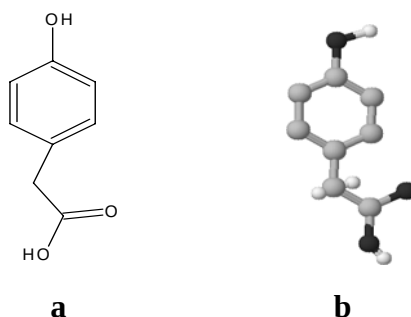


Figura 3 - Estrutura do ácido 4-hidroxifenilacético (a) fórmula estrutural (b) modelo tipo bola-e-bastão

Para a produção de EQM com poli(4-HFA), podem ser utilizadas diferentes técnicas eletroquímicas, descritas a seguir.

1.2 – Técnicas Eletroquímicas de Preparação de Polímeros

1.2.1 - Fundamentos e Definições

A preparação de polímeros através de métodos eletroquímicos é muito utilizada, pois apresenta grande reprodutibilidade, a metodologia é simples e pode ser realizada à temperatura ambiente. A eletropolimerização utiliza uma célula eletroquímica contendo dois condutores elétricos chamados eletrodos, imersos em soluções de eletrólitos para que surja uma corrente elétrica, sendo necessário que os eletrodos sejam conectados externamente por um fio metálico, e que as soluções dos eletrólitos estejam em contato para permitir que os íons se movimentem de uma solução para a outra e que a transferência de elétrons ocorra nos eletrodos [63].

A carga dentro de uma célula pode ser conduzida por três processos distintos nas várias partes da célula: (1) nos eletrodos e no condutor externo, os elétrons atuam como transportadores; (2) nas soluções, o fluxo de elétrons envolve a migração de cátions ou de ânions e nas (3) superfícies dos eletrodos, onde ocorrem as reações de oxidação; este conjunto fornece um mecanismo pelo qual a condução iônica da solução é acoplada a condução eletrônica do eletrodo para gerar o circuito elétrico para o fluxo de cargas [63].

As medidas eletroquímicas envolvem sistemas heterogêneos porque o eletrodo pode apenas doar e receber elétrons da espécie que está diretamente na solução imediatamente adjacente ao eletrodo, sendo assim esta camada pode ter uma composição diferente do restante da solução. Esse conjunto de cargas na superfície do eletrodo e na solução adjacente a esta superfície é chamado de dupla camada elétrica, Figura 4.

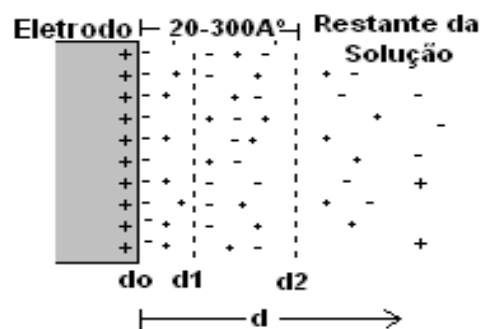


Figura 4 - Dupla camada elétrica formada na superfície do eletrodo como resultado do potencial aplicado. (d0 a d1) camada interna compacta e (d1 a d2) camada difusa [63].

São dois os tipos de processos que podem conduzir correntes através de uma interface eletrodo/solução. Um tipo envolve transferência direta de elétrons via reação de oxidação em um eletrodo e redução no outro. Esse processo é conhecido como processo faradaico, porque é governado pela lei de Faraday, que estabelece que a quantidade de produto de uma reação química em um eletrodo é proporcional à quantidade de corrente. As correntes resultantes são chamadas correntes faradaicas [63].

Outro tipo acontece em um intervalo de potencial onde os processos faradaicos são impedidos em um ou em ambos os eletrodos por razões termodinâmicas e cinéticas. A chamada corrente capacitiva interfere nas medidas forçando a transferência de elétrons do potenciostato para o eletrodo de trabalho, fazendo com que o potencial deste eletrodo fique mais negativo causando o deslocamento de cátions presentes na solução para a superfície do eletrodo. Este fluxo que gera esta corrente capacitiva, não oriunda de processos redox, é chamado corrente não-faradaica.

A corrente faradaica requer a transferência contínua de espécies reativas da solução como um todo para a superfície do eletrodo. São três os mecanismos que proporcionam essa transferência de massa: convecção, migração e difusão. A convecção envolve movimento da solução como resultado de agitação ou fluxo da solução que passa pela superfície do eletrodo. A migração é o movimento de íons da solução causado por atração eletrostática entre os íons e o eletrodo carregado. E a difusão que é o movimento das espécies causado pelo gradiente de concentração [64].

Os processos de geração de corrente através da aplicação de um potencial que ocorrem na interface eletrodo-solução são fundamentos das técnicas eletroquímicas citadas a seguir.

1.2.2 – Técnicas Eletroquímicas

A síntese eletroquímica tem se tornado o método preferido para o preparo de polímeros condutores por causa da sua simplicidade e reprodutibilidade. A polimerização eletroquímica geralmente utiliza os métodos: (1) galvanostático, corrente constante, (2) potenciostático, potencial constante e (3) voltamétrico, variação cíclica do potencial [64-68], onde os melhores filmes são obtidos quando se utiliza um sistema de três eletrodos na solução do monômero e eletrólito apropriado [51,69,70]. Desta forma, a contaminação do filme devido à oxidação e redução de espécies no mesmo eletrodo é

reduzida; o eletrodo de trabalho é protegido contra sobrecargas de corrente. Quanto ao eletrólito, este deve solubilizar o monômero, mas não o polímero formado.

Na eletroquímica é muito utilizado o método voltamétrico, que é um conjunto de técnicas nas quais se observa uma relação entre o potencial e a corrente durante o processo eletroquímico. Em voltametria, um sinal de excitação de potencial variável é aplicado sobre os eletrodos de uma célula eletroquímica. Esse sinal extrai uma resposta característica de corrente na qual se baseia o método. As informações qualitativas e quantitativas sobre as espécies químicas, que são obtidas a partir desta técnica, são representadas por uma curva de corrente contra o potencial, chamado de voltamograma [71].

Na voltametria cíclica, o potencial elétrico aplicado no eletrodo de trabalho corresponde a uma onda triangular como mostra a Figura 5.

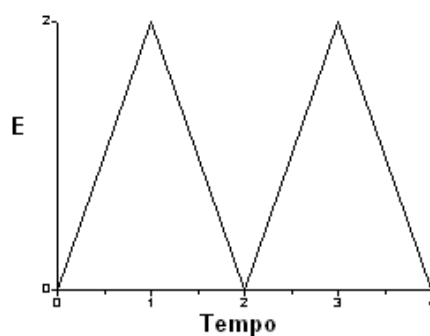


Figura 5 – Forma da onda utilizada na voltametria cíclica.

Nesta técnica, o potencial é repetido ciclicamente entre dois valores, aumentando primeiramente de forma linear até o máximo e então decrescendo linearmente com o mesmo valor numérico de inclinação, até o seu valor original. Esse processo é repetido inúmeras vezes com a corrente sendo registrada em função do tempo. A técnica de voltametria cíclica consiste em realizar a varredura de potencial direto e inverso em vários ciclos sucessivos, observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa. Se houver adsorção de substâncias eletroativas no eletrodo, os picos catódicos e anódicos irão crescer a cada varredura, até que haja saturação na superfície do eletrodo. Este crescimento irá ocorrer no mesmo potencial se o sistema for reversível, isto é, se a quantidade de cargas envolvidas nas varreduras catódicas e anódicas forem semelhantes [63,71].

A voltametria é largamente utilizada pelos químicos inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para finalidades não analíticas, incluindo estudos fundamentais de processos de redução e oxidação em vários meios, processos de adsorção em superfícies e mecanismos de transferência de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificadas [70-73].

No processo de eletropolimerização, a espessura do filme pode ser controlada pela variação de potencial ou corrente *versus* tempo ou então através da variação do número e/ou velocidade de varreduras de potencial. Os ânodos mais utilizados são de cromo, ouro, níquel, paládio, titânio, platina, placa de vidro revestida com índio-óxido de estanho, grafite ou carbono vítreo [74].

Uma melhoria instrumental considerável na distinção entre as correntes faradaica e capacitiva foi atingida com o desenvolvimento das técnicas de pulso, principalmente a de pulso diferencial. Neste caso, a instrumentação foi desenvolvida de tal modo que as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial fossem realizados em intervalos de tempo pequenos [75].

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso (Figura 6). Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica e, então, são registradas contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferencial, com a forma de uma curva gaussiana. Esta técnica é mais sensível que a de pulso normal, pois ela possibilita a minimização da contribuição da corrente capacitiva no sinal obtido, pois a corrente capacitiva não depende da concentração da espécie em estudo [76].

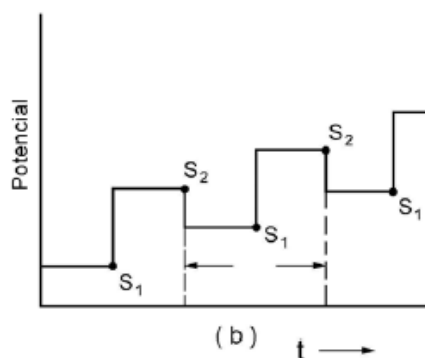


Figura 6 - Representação esquemática de aplicação de potencial em função do tempo em pulso diferencial.

A corrente é amostrada em dois intervalos de tempo, cerca de 15 ms, cada um; o primeiro intervalo imediatamente antes da aplicação do pulso S1 e o segundo próximo do final do pulso S2. O valor final da corrente é a diferença entre esses dois valores medidos ($I = I_{S2} - I_{S1}$) [77].

As diferentes técnicas eletroquímicas podem ser utilizadas para a produção de filmes poliméricos utilizados como plataforma para a imobilização de biomoléculas, visando à construção de um genossensor, um tipo de sensor biológico, os quais são descritos abaixo.

1.3 – Sensores Biológicos

Sensores biológicos ou biossensores são instrumentos analíticos utilizados para detecção de biomoléculas em tempo real. O termo “biossensor” começou aparecer na literatura científica no início de 1970, mas anteriormente já era comercializado e conhecido seu conceito básico. O primeiro biossensor, conhecido como “eletrodo enzimático”, foi demonstrado por Clark e Lions em 1962 [78]. Para o desenvolvimento do mesmo, a enzima glicose oxidase foi acoplada a um eletrodo para medida de pressão parcial de oxigênio (P_{O_2}). Na reação enzimática de oxidação da glicose, ocorre consumo de oxigênio proporcional à concentração do substrato. Esta variação na P_{O_2} era reconhecida pelo eletrodo, o que determinava a quantidade de glicose no meio [79].

Os biossensores combinam a especificidade de um elemento biológico ativo com a sensibilidade de um transdutor físico-químico o qual converte o sinal biológico produzido num sinal (Figura 7), que pode ser elétrico, óptico, térmico e outros [79-83]. O elemento biológico é capaz de reconhecer a presença, atividade ou concentração de um analito específico em solução. Essa interação com o alvo resulta em uma mudança na propriedade da solução que é transformada em sinal pelo transdutor [84,85], que é proporcional à concentração de uma substância química específica ou um grupo de substâncias [79].

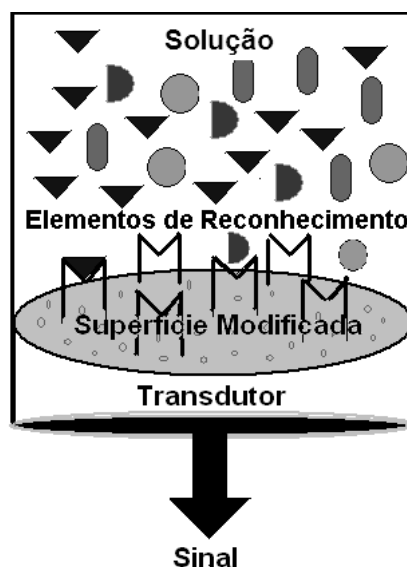


Figura 7 – Esquema de biossensor.

Os transdutores podem ser classificados como eletroquímicos (potenciométricos [66], amperométricos [86] e condutimétricos [87]), térmicos ou calorimétricos [88], ópticos [89] e piezelétricos [20].

Os elementos de reconhecimento podem ser anticorpos, antígenos (imunossensores), fragmentos de DNA (genossensores) ou enzimas (sensores enzimáticos) [90-95]. De acordo com o tipo de interação que ocorre entre as substâncias a serem detectadas e o material biológico, o biossensor é classificado como catalítico (quando uma enzima, por exemplo, catalisa uma reação) ou de afinidade (quando há reconhecimento de um elemento, por exemplo, fragmentos de DNA) [79].

A construção de genossensores, sistemas de detecção altamente seletivos e de fácil manuseio, torna-se um caminho viável para a análise de doenças, como a dengue, onde baixas concentrações do vírus na presença de interferentes requerem alta seletividade do método utilizado, características estas que são encontradas em sistemas eletroquímicos.

1.3.1 – Genossensores Baseados em Detecção Eletroquímica

Os métodos eletroquímicos vêm sendo amplamente utilizados por serem freqüentemente específicos para um estado de oxidação particular de um elemento, além de serem rápidos, simples, de baixo custo, e de servir muito bem para quantificar os eventos de hibridização usando um intercalador eletroativo [96-100].

Desde que o conceito de biossensor eletroquímico de DNA foi introduzido por Millan e Mikkelsen em 1993 [101] vários trabalhos foram realizados em todo o mundo [102-104]. Os genossensores têm sido bastante explorados no desenvolvimento de técnicas para análise e determinação de seqüências alvo do DNA, com a finalidade de diagnóstico de várias doenças [79]. Eles geralmente utilizam guanina ou adenina como biomarcadores, devido ao fato de possuírem menores potenciais de oxidação, além de apresentar maior sensibilidade na oxidação e serem facilmente adsorvidas e oxidadas em eletrodos de carbono [104-106]. O comportamento eletroquímico das fitas simples e duplas de DNA e oligonucleotídeos têm sido caracterizados extensivamente visando à construção de *chips* e sensores que têm sido usados com sucesso para análise de expressão do gene, seqüenciamento de DNA e detecção de polimorfismos [107-113].

Os sensores biológicos também contribuem para determinação de analitos no sangue (por exemplo, glicose, uréia, lactato, colesterol, DNA, antígenos, anticorpos), *screening* de bibliotecas de DNA complementar (cDNA), monitoramento ambiental e análises em alimentos [114-117].

Sensores miniaturizados permitem a utilização de pequenos volumes de amostra. No caso do uso de sensores baseados em métodos eletroquímicos de detecção, a miniaturização possibilita aumento na sensibilidade do sistema devido ao reduzido *background* de corrente [115]. A miniaturização aliada às técnicas de imobilização e detecção das biomoléculas são de fundamental importância para desenvolvimento de um genossensor eletroquímico.

A imobilização de biomoléculas pode ser feita por diferentes processos tais como: adsorção física, ligação covalente, ligação cruzada “*cross-linking*” ou oclusão “*entrapment*” [118,119] (Figura 8), as quais são descritas abaixo:

- *Adsorção*: esta técnica retém a molécula imobilizada através de ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals e formação de complexos de transição de elétrons. Exemplos: celulose, sílica gel, vidro, polímeros [72,94].

- *Ligação covalente*: feita por meio da ligação entre grupos funcionais da molécula biológica de interesse e uma matriz suporte. Esta matriz pode ser um filme polimérico [20].
- *Ligação Cruzada*: ligações cruzadas intermoleculares de biomoléculas pelo uso de reagentes multifuncionais tais como glutaraldeído, hexametileno diisocianato, para a imobilização da molécula em matrizes sólidas [120].
- *Oclusão*: O polímero é preparado em uma solução contendo biomoléculas. As biomoléculas ficam presas dentro da matriz do polímero, durante a polimerização. Poliacrilamida, amido ou nylon, podem ser empregados para aprisionar biomoléculas [121-122].

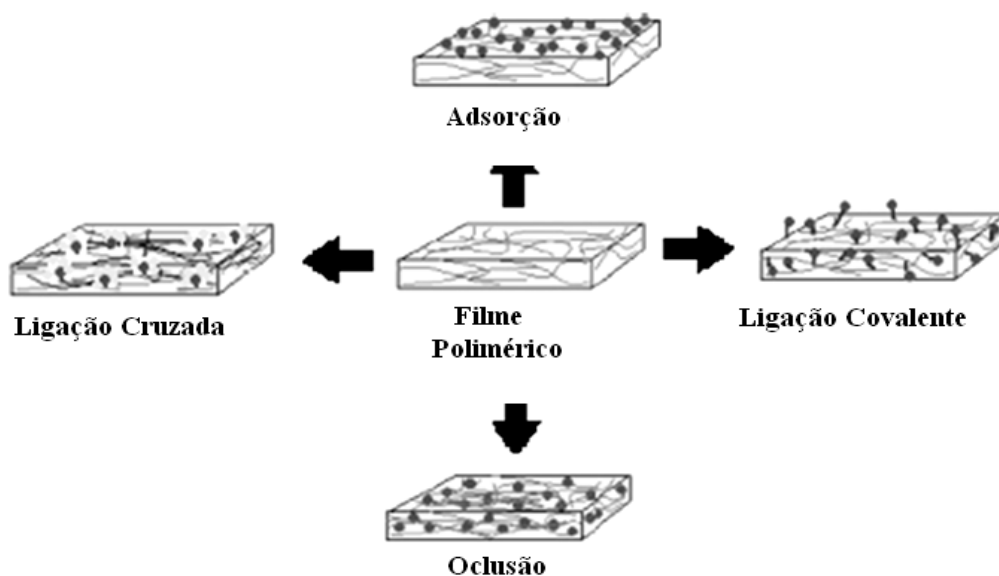


Figura 8 – Métodos de imobilização de biomoléculas em filmes poliméricos.

Um genossensor é desenvolvido pela imobilização de um oligonucleotídeo, produtos da reação em cadeia da polimerase, PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou DNA sobre a superfície de um transdutor para reconhecer a seqüência de DNA complementar através de hibridização.

Nucleotídeos de guanina e adenina (bases purínicas), juntamente com timina e citosina (bases pirimídicas), representam as unidades monoméricas dos ácidos nucleicos componentes do DNA, apresentando grande importância na natureza. Investigações do comportamento eletroquímico destes blocos de construção são importantes para a

compreensão das reações de transferência de elétrons no DNA [106,107]. Estudos mecanísticos do comportamento eletroquímico de bases purínicas e pirimidínicas têm se processado por décadas [94-96,104-108,123-126]. A oxidação de compostos derivados dessas bases tem sido estudada em eletrodos sólidos, principalmente sobre eletrodo de carbono grafite. Isto conduz à possibilidade de detectar voltametricamente a oxidação dessas bases em eletrodos sólidos, confirmando que a guanina e adenina são mais facilmente detectadas que a timina e a citosina [126-128]. Guanina é um usual biomarcador para biossensores [129,130].

O comportamento eletroquímico de fitas simples e duplas de DNA e oligonucleotídeos têm sido caracterizados através de hibridização (Figura 9) [131]. A complementaridade de adenina:timina (A:T) e citosina:guanina (C:G) no pareamento do DNA é a base da especificidade do biorreconhecimento em biossensores de DNA [132]. As bases complementares interagem através de ligações de hidrogênio dando origem a fita dupla. O evento da hibridização é detectado através da mudança de eletroatividade com a formação da dupla-hélice do DNA após a hibridização [130,133-135].

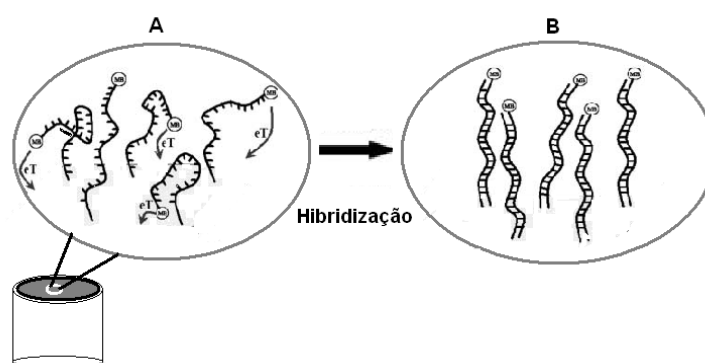


Figura 9 - Esquema da hibridização. **A** representa a imobilização da fita simples; **B** representa a formação da fita dupla de DNA na superfície do EQM.

Uma variedade de pesquisas [136-138] tem explorado a detecção da reação de hibridação por meio do sinal de oxidação direta da base guanina (ver Figura 10) [139], ou indireta, que utiliza ligantes redox-ativos que se ligam mais fortemente com o DNA tais como: intercaladores, complexos catiônicos de metais, ou corantes orgânicos [126-128].

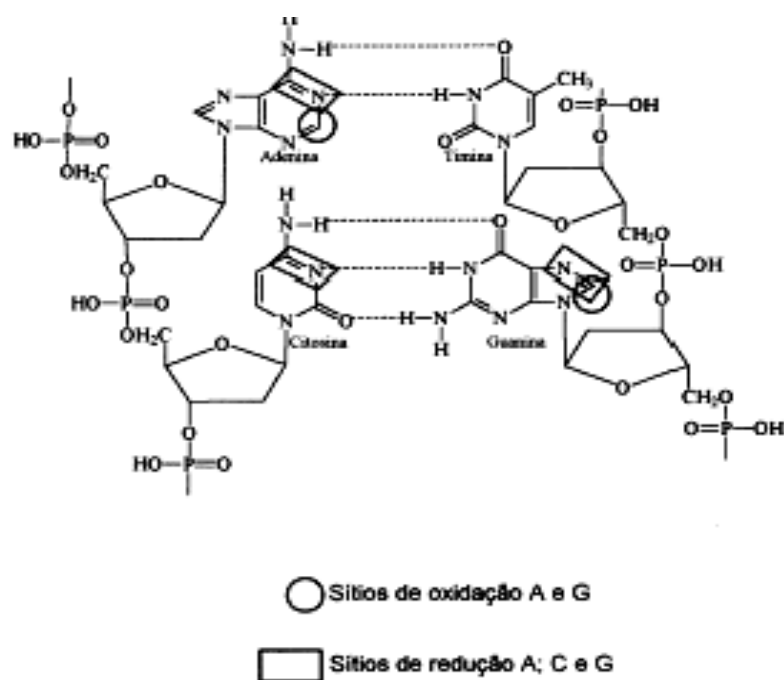


Figura 10 - Pareamento Watson-Crick de bases e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA [140].

Dentre os métodos baseados na utilização de ligantes para detecção eletroquímica do evento da hibridização, o que tem recebido uma atenção especial é o que utiliza indicadores de DNA [136] devido à sua maior seletividade comparada com outros métodos baseados na oxidação direta, pois através desse método é possível fazer a detecção em menores potenciais. A Figura 11 mostra um esquema da detecção eletroquímica baseada nestes ligantes [101].

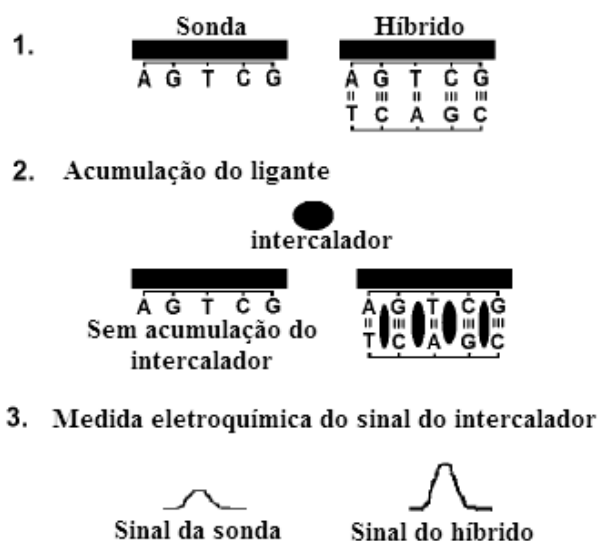


Figura 11 - Esquema da detecção eletroquímica da hibridização do DNA. (1) Pareamento das bases nitrogenadas do DNA, (2) Intercalação e acúmulo do indicador na fita dupla do DNA (3) Sinal obtido.

O eletrodo modificado com o híbrido é imerso na solução contendo o ligante redox por certo período de incubação e após o acúmulo é feita a medida eletroquímica, por exemplo, através da voltametria. Caso a molécula esteja inserida entre a dupla hélice do DNA, é observado um aumento no sinal redox [141-144]. Ao contrário, se a molécula apresenta afinidade através das fita simples do DNA ocorre diminuição no sinal do eletrodo modificado com a sonda [145-147]. Estas mudanças no potencial do pico de corrente para a sonda e moléculas híbridas providenciam a base para a detecção da hibridização baseada na intercalação.

Dentre os vários intercalantes é possível citar vários complexos de metais como fenantrolina, bipyridina de rutênio ou cobalto, agentes anti-cancerígenos tais como, equinomicina ou epirubicina, corantes como o azul de metileno, conhecidos como marcadores da hibridização [141-147].

O brometo de etídio (brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridina, BE) representado na Figura 12, é um importante reagente conhecido como intercalador da fita dupla do DNA e tem sido utilizado para detecções de hibridação com o alvo complementar [135,143].

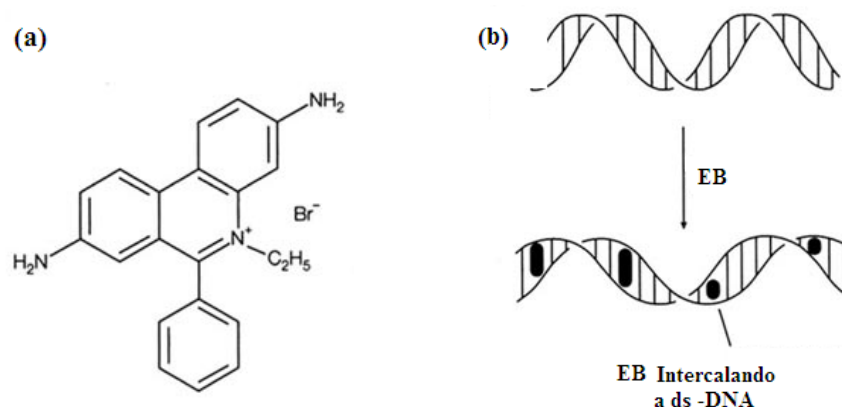


Figura 12 – (a) Brometo de etídio; (b) processo de intercalação da *ds*-DNA.

Geralmente, para aumentar a sensibilidade de detecção, são utilizados mediadores, os quais fazem a intermediação do processo redox e são, em seguida, regenerados. O mediador no seu estado oxidado é capaz de retirar elétrons de resíduos de guanina no DNA. Depois o mediador em seu estado reduzido é oxidado na superfície do eletrodo completando o ciclo redox. É importante ressaltar que o mediador participa de múltiplos ciclos redox, conduzindo a um sinal amplificado e proporcional a quantidade de resíduos de guanina [147,148]. Exemplos de mediadores são os complexos de rutênio II e ósmio II além do ferrocenocarboxialdeído, usados para mediar a eletrooxidação da guanina (Figura 13).

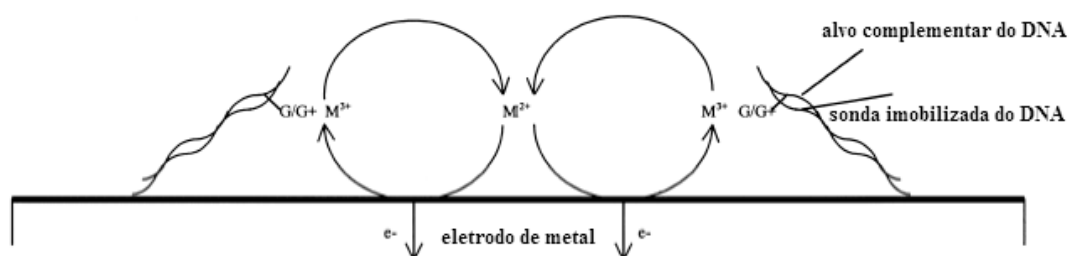


Figura 13 - Representação esquemática da oxidação da guanina mediada por um ligante redox-ativo, $\text{Ru}(\text{bpy})_3$ [148].

Métodos eletroquímicos são promissores para estudos de imobilização e detecção do DNA na superfície de eletrodos sem modificação ou modificados com filmes poliméricos. Combinando o uso de propriedades de polímeros com seqüências de DNA imobilizadas é possível desenvolver um genossensor para detecção da dengue [149-155].

1.4 - Dengue

1.4.1 - Histórico e Definições

A dengue é uma doença causada por um arbovírus chamado *Flaviviridae*, transmitida para o ser humano através do hospedeiro intermediário, o mosquito *Aedes aegypti* (Figura 14) que se desenvolve em áreas tropicais e subtropicais. Esta doença pode até levar a morte e já é considerada uma epidemia no Brasil [156-159].



Figura 14 – Fêmea do mosquito *Aedes aegypti* no momento de uma picada [160].

Os primeiros registros de dengue no mundo foram feitos no fim do século XVIII, no Sudoeste Asiático, em Java, e nos Estados Unidos, na Filadélfia. Mas a Organização Mundial de Saúde (OMS) só a reconheceu como doença, no século XXI. As primeiras referências à dengue no Brasil remontam ao período colonial. Em 1846 foi descrito o primeiro caso de dengue no Brasil, na cidade de Recife. Sete anos depois, em Salvador uma epidemia de dengue levou a 2.000 mortes. Em 1865, a dengue foi considerada como epidêmica, atingindo vários estados, como Rio de Janeiro e São Paulo. Até 1916, São Paulo foi atingido por várias epidemias de dengue [160-162].

A origem do *Aedes aegypti*, inseto transmissor da doença ao homem, é africana. A fêmea é quem se contamina, pois o macho apenas se alimenta de seivas de plantas. A fêmea precisa de uma substância do sangue (a albumina) para completar o processo de amadurecimento de seus ovos. O mosquito apenas transmite a doença, mas não sofre seus efeitos [163].

O *Aedes aegypti*, é um mosquito que se adaptou às áreas urbanas e vive preferencialmente dentro das casas ou perto delas, uma vez que lá encontra melhores condições para sua reprodução: sangue humano e depósitos com água. Pode se proliferar em qualquer lugar que acumule água (caixas d'água, cisternas, latas, pneus, cacos de vidro e vasos de plantas). Já foi detectado que os ovos sobrevivem até dois anos sem contato com a água. Assim que tiverem condições favoráveis eles eclodem e dão continuidade ao ciclo de vida (Figura 15) [162].

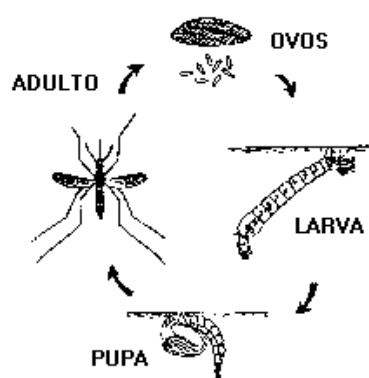


Figura 15 - Ciclo de evolução do *Aedes aegypti*.

No ciclo evolutivo, os mosquitos adultos não apresentam grande dispersão. Os machos costumam permanecer próximos aos criadouros, onde ocorre o acasalamento. As fêmeas apresentam hábitos diurnos e para maturação dos ovos, praticam hematofagia, apresentando de dois a três ciclos gonadotróficos durante a vida e podem por de 100 a 200 ovos por vez. Após a eclosão dos ovos, passam por quatro estágios larvais e a fase final de desenvolvimento aquático é representada pelas pupas. Em condições ótimas, acredita-se que o período larvário pode completar-se em 5 dias, ou estender-se por semanas, em condições inadequadas [161].

Devido à facilidade de disseminação, podemos imaginar o grau de dificuldade para efetivamente combater a doença, o que só é possível com a quebra da cadeia de transmissão, eliminando o mosquito dos locais onde se reproduzem. Assim, a prevenção e as medidas de combate exigem a participação e a mobilização de toda a comunidade a partir da adoção de medidas simples, visando à interrupção do ciclo de transmissão e contaminação. Caso contrário, as ações isoladas poderão ser insuficientes para acabar com os focos da doença [164-166].

O vírus causador da doença possui quatro sorotipos: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4 e dois tipos principais de dengue: a dengue clássica (DF) e a dengue hemorrágica (DHF). A infecção por um dos vírus dá proteção permanente para o mesmo sorotipo e imunidade parcial e temporária contra os outros três. As partículas virais são esféricas e constituem um envelope lipoprotéico, um nucleocapsídeo contendo uma proteína central e uma fita simples de RNA. O tamanho do nucleocapsídeo é de 40-50 nanômetros. A replicação viral é intracelular e intracitoplasmática [167-169].

A dengue clássica manifesta-se geralmente com febre, dores na cabeça, corpo, articulações e por trás dos olhos, podendo afetar crianças e adultos, mas raramente é letal. A dengue hemorrágica é a forma mais severa da doença, pois além dos sintomas citados, é possível ocorrer sangramento, ocasionalmente choque e consequências como a morte [168,169].

1.4.2 – A Dengue no Brasil e no Mundo

A dengue é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A OMS estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da dengue [156-161].

Durante o século XIX a dengue era considerada uma doença esporádica, mas atualmente ela está no *ranking* como a mais importante doença viral causada por mosquito do mundo. Nos últimos 50 anos, a incidência aumentou em 30 vezes. O mapa de regiões endêmicas no mundo está representado na Figura 16. 2,5 bilhões de pessoas vivem em 100 países endêmicos e em áreas onde a virose da dengue pode ser transmitida. Até 50 milhões de infecções ocorrem anualmente com 500.000 casos de DHF e 22.000 mortes principalmente entre crianças [170-171].



Figura 16 - Zonas endêmicas (representadas pelas áreas escuras) de dengue no mundo [172].

Uma pandemia ocorreu em 1998, no qual 1.2 milhões de casos de DF e DHF foram registrados em 56 países em todo o mundo. Dados para 2001-2002 indicaram uma situação de comparável magnitude. Em 2001 as Américas relataram acima de 652.212 casos de dengue, dentre estes 15.500 era de DHF quase duas vezes maior que os casos totais relatados para a mesma região em 1995. O desafio para as agências de saúde nacional e internacional é inverter a tendência de aumento da epidemia de dengue e da incidência de DHF [172,173].

No Brasil, a dengue ocorre principalmente nos meses de janeiro a maio, pelas condições climáticas favoráveis ao mosquito transmissor. Desde quando a doença foi introduzida no país, em todos os anos, há registro de casos de dengue com a ocorrência de vários picos epidêmicos durante esse período, relacionados com a chegada de um novo subtipo do vírus da dengue. Na década de 90, mesmo em anos não epidêmicos, a doença registra uma ocorrência de dezenas de milhares de casos por ano. O último pico epidêmico ocorreu em 2002 em decorrência da introdução do DEN-3, tendo sido registrados 794.219 casos, a maioria deles no Rio de Janeiro. Nos anos seguintes a dispersão do DEN-3 para os demais estados do país tem proporcionado o surgimento de surtos e epidemias, sem atingir os níveis de 2002. No ano de 2006, foram registrados 345.922 casos, sendo as regiões mais acometidas, o Sudeste (141.864) e o Nordeste (105.017 casos). Foram notificados 682 casos de febre hemorrágica da dengue e 76 óbitos [173-175].

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou no período de janeiro a julho de 2007, 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de febre hemorrágica da dengue e a ocorrência de 98 óbitos [173].

Ao compararmos com o ano de 2006, observamos um aumento de 136.488 casos de dengue no país, sendo o mês de março aquele com o maior número de notificações no período, correspondendo a 102.011 casos. É importante destacar que este aumento no número absoluto de casos está relacionado com a ocorrência de epidemias com altas taxas de incidência em alguns estados. Neste caso, destaca-se o ocorrido nos estados do Mato Grosso do Sul, Paraná e Rio de Janeiro que notificaram um excedente de 59.370, 39.391 e 18.181 casos, respectivamente [173].

Outro aspecto epidemiológico relevante em 2007 relaciona-se a concentração de casos de Febre Hemorrágica da Dengue, sendo 68% das notificações nos estados do Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Pernambuco, Mato Grosso do Sul, Amazonas e Piauí. A mesma característica é observada em relação aos óbitos, concentrando-se 50% nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pará e Piauí [173].

As atividades de monitoramento da circulação viral demonstram que o sorotipo DEN-3 continua sendo predominante no país, representando 81% das amostras isoladas. Entretanto, observam-se também, um percentual importante (15,2%) de isolamentos do sorotipo DEN-2, sendo esse sorotipo predominante nos estados do Ceará, Maranhão, Piauí e Roraima. A análise das taxas de incidências por região demonstra alta incidência na região Centro-Oeste e média incidência nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul (Figuras 17 e 18, Tabela 1).

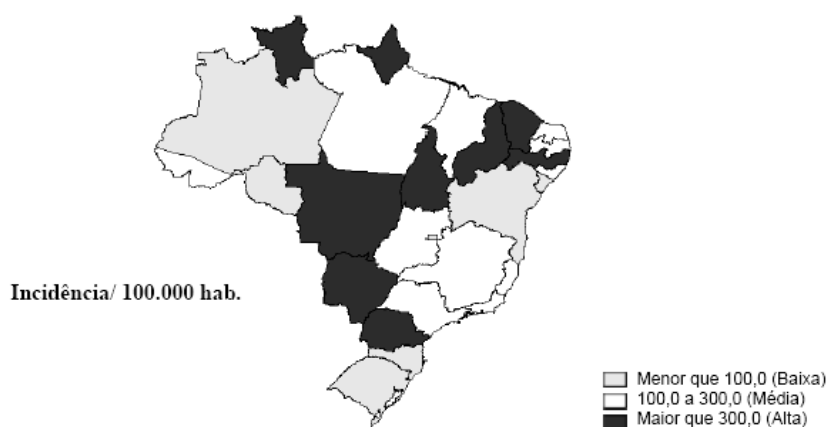


Figura 17 - Distribuição dos Estados por Áreas de Incidência, Brasil, 2007 [173].

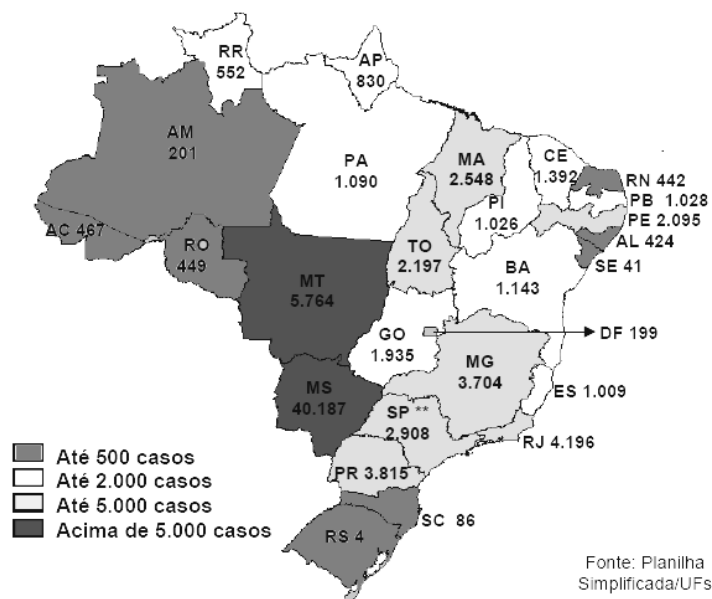


Figura 18 - Distribuição dos casos de dengue notificados no Brasil por Unidade Federativa. [174].

Tabela 1 - Número de casos notificados de dengue de 2000 até 2007 no Brasil [176].

Região	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Norte	30.848	54.048	28.816	41.982	32.878	43.220	33.348	42.015
Nordeste	121.495	167.831	301.375	172.308	37.142	127.057	105.017	131.566
Sudeste	53.657	170.090	387.106	87.325	31.309	35.218	141.864	182.985
Sul	4.760	4.105	7.665	9.999	419	5.146	5.604	47.819
Centro-Oeste	17.197	32.043	69.257	34.524	157.71	37.548	60.089	105.732
Total	227.957	428.115	794.219	346.138	117.519	248.189	345.922	510.117

As regiões mais afetadas em Minas Gerais são: Triângulo Mineiro, Norte e mais recentemente a Região Metropolitana de Belo Horizonte, com aumento do número de casos notificados e confirmados de dengue clássica. Apesar da concentração dos casos nestas áreas, todas as regiões têm apresentado casos confirmados, segundo exames realizados pelo Instituto Otavio Magalhães (IOM/Funed).

Já foram identificados e circularam em Minas Gerais os sorotipos DEN 1, DEN 2 e mais recentemente (a partir de 2002) o DEN 3. Esta circulação de mais de um sorotipo eleva o risco do aparecimento de casos de febre hemorrágica do dengue (DHF). No ano de 2006, nas áreas com transmissão, tem predominado o vírus DEN-3, que está associado à ocorrência de um maior número de casos graves e com complicações.

Neste cenário epidemiológico, tornou-se imperioso que o conjunto de ações que vinham sendo realizadas e outras implantadas, fosse intensificado permitindo um melhor enfrentamento do problema e a redução do impacto da dengue no Brasil. Com esse objetivo, o Ministério da Saúde implantou em 2002 o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Muito embora outras causas tenham influenciado, considera-se que as ações do PNCD, desenvolvidas em parceria com estados e municípios, tenham contribuído na redução de 73,3% dos casos da doença no primeiro semestre de 2004 em relação ao mesmo período do ano anterior [174,175].

1.4.3 – Diagnóstico da Doença

O vírus da dengue é um vírus assintomático por conduzir a dois tipos de dengue (DF e DHF). Ele possui um período de incubação de 4-5 dias, e só depois aparecem os sintomas, que faz com que alguns tipos de diagnósticos sejam inviáveis, visto que é de fundamental importância o rápido diagnóstico da doença [177].

Conjuntamente com a supervisão clínica e epidemiológica, a detecção rápida da dengue e o uso de boas ferramentas para o seu diagnóstico irão proporcionar às autoridades sanitárias informações de tempo úteis sobre a localização do sorotipo do vírus e o rigor da doença com o número de fatalidades, podendo estimar a incidência total de casos [177,178].

Diagnosticar a dengue em um tempo curto serve para evitar epidemias e aumento da taxa de mortalidade da população devido à doença. Investigações para desenvolvimento da vacina [178,179] estão se processando, mais ainda não estão concluídas.

O diagnóstico atual é baseado na RT-PCR durante a manifestação dos sintomas e pela sorologia pós-infecção, embora sejam ambas pouco sensíveis em fases diversas da infecção [156,180]. A sorologia é amplamente aplicada nas rotinas de diagnósticos [166]. A sorologia apresenta desvantagens, primeiro porque ela não permite o diagnóstico precoce em infecções primárias, pois são necessários 4 a 5 dias para o sistema imunológico produzir anticorpos suficientes para serem detectados; e segundo, ela pode conduzir a resultados equivocados em infecções secundárias devido à reatividade cruzada entre os tipos específicos de soros e outros anticorpos flavivírus.

As técnicas baseadas em RT-PCR são mais sensíveis, seletivas e fáceis de carregar informações que ácidos nucleicos convencionais, não sendo limitadas pela fácil contaminação da amostra e necessitam além de muito tempo de alta tecnologia. Essas técnicas têm sido aceitas como novo método para a detecção do vírus da dengue, podendo então serem aliadas a outros métodos para se reduzir o tempo de análise e o alto custo [180,181].

Diante do contexto atual do diagnóstico da dengue, este trabalho visa contribuir para o desenvolvimento de sistema de detecção que possa gerar resultados com rapidez, especificidade, sensibilidade e baixo custo, características encontradas nos genossensores.

Este trabalho mostra pela primeira vez, na literatura aberta, a imobilização e detecção de bases nitrogenadas do DNA, oligonucleotídeos ou produtos de PCR sobre matriz de poli(4-HFA).

1.5 – Objetivos

1.5.1 – Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver eletrodos modificados derivados do monômero ácido 4-hidroxifenilacético modificados com biomoléculas, visando contribuir para o desenvolvimento de genossensores eletroquímicos.

1.5.1 – Objetivos Específicos

1. Formação e caracterização de filmes poliméricos do monômero sobre eletrodo de grafite, levando em consideração fatores como: pH do meio reacional, concentração da solução monomérica, número de ciclos e estudos morfológicos;
2. Incorporação de bases nitrogenadas do DNA, adenina monofosfato e guanosina monofosfato sobre a superfície do eletrodo de grafite sem filme e eletrodo modificado com filmes poliméricos derivados de ácido poli(4-HFA), variando-se o pH do eletrólito utilizado para detecção;
3. Incorporação de oligonucleotídeos ou produtos de PCR de regiões conservadas do vírus da dengue, DEN-1, ao eletrodo de grafite modificado com ácido poli(4-HFA);
4. Estudos da topografia das matrizes poliméricas modificadas com bases nitrogenadas, oligonucleotídeos ou fragmentos de DNA;
5. Detecção do alvo complementar utilizando-se brometo de etídio como indicador da hibridação do fragmento de DNA (DEN-1).