
2º - CAPÍTULO: PARTE EXPERIMENTAL

2 - Parte Experimental

2.1 - Materiais e Equipamentos

A célula eletroquímica utilizada para os experimentos foi de três compartimentos (Figura 19A). O eletrodo de trabalho utilizado para os estudos eletroquímicos foi de carbono grafite (Figura 19B), o auxiliar foi uma placa de platina de 2cm² de área aparente (Figura 19C) e como referência foram utilizados prata/cloreto de prata (Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L⁻¹) (Figura 19D) ou calomelano (Figura 19E) saturados.



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, à esquerda de uma lapiseira, e de (E) calomelano.

Outro sistema de célula, composta de um compartimento foi utilizado para detecções de biomoléculas (Figura 20). Uma pipeta Pasteur de plástico foi cortada para que os três eletrodos fossem imersos para a detecção.

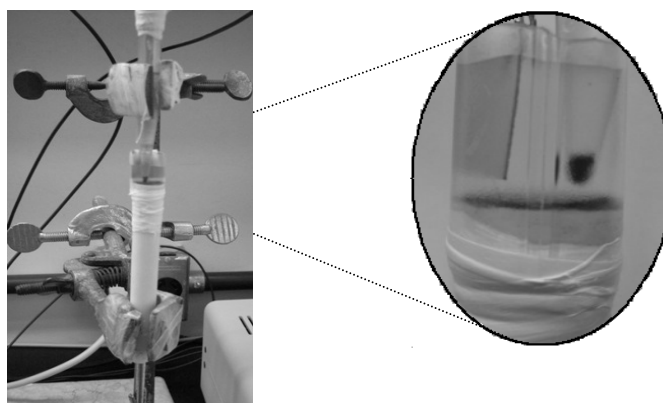


Figura 20 – Sistema de detecção de biomoléculas.

Os eletrodos foram acoplados a um Potenciostato/Galvanostato PAR 273A (Figura 21A) ou a um Potenciostato da CH Instruments Modelo 420A (Figuras 21B e 21C) para realização das medidas. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica foram realizadas em um potenciostato da CH Instruments Modelo 760C.

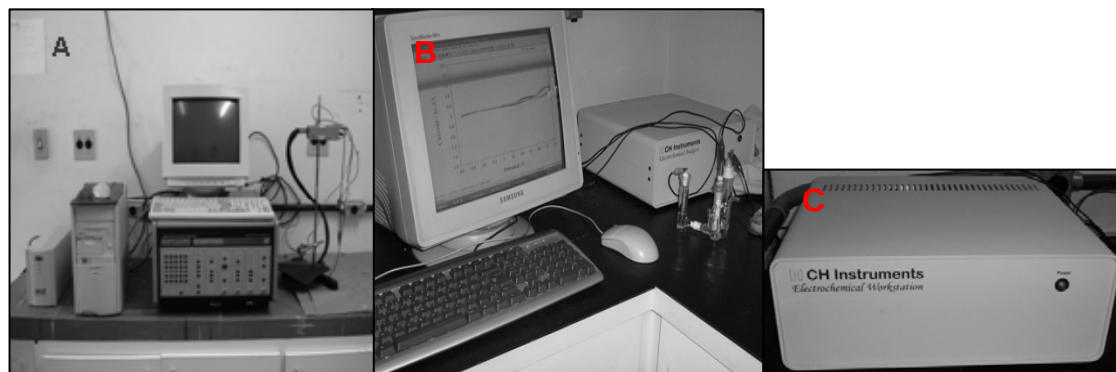


Figura 21 - Potenciostatos utilizados para os experimentos eletroquímicos. (A) PAR 273A e (B e C) CH Instruments 420 e 760A.

Foram utilizados um pHmetro Digital PG1800, para as medidas de pH; ultrapurificador microprocessado Master System Gehaka, para a produção da água deionizada; ultra-som Ultrasonic Cleaner 1450 USC para remoção de partículas dos eletrodos e para preparo de soluções; um espectrofotômetro marca SHIMADZU, modelo UV-1650PC para a quantificação das amostras de DNA; estufa Biopar para a incubação e desnaturação do DNA e centrífuga 5804R, marca Eppendorf para a centrifugação das biomoléculas.

Para caracterização dos filmes foram utilizados o microscópio eletrônico de varredura modelo LEO 940A, marca ZEISS e um microscópio de força atômica Nanoscope IIIa da Digital Instruments (Figura 22).

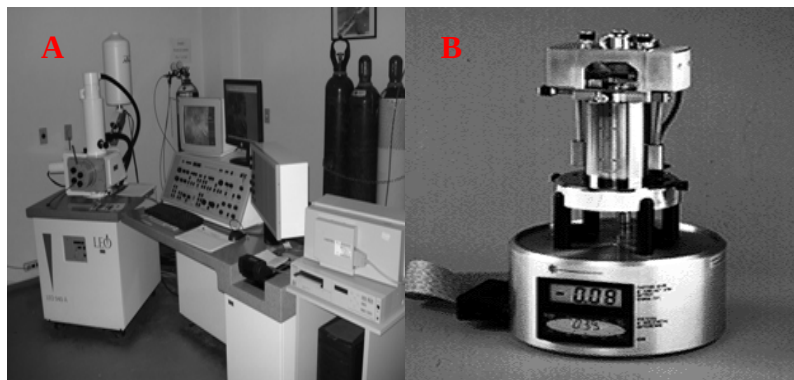


Figura 22 - Equipamentos utilizados para a caracterização morfológica da superfície. (A) microscópio eletrônico de varredura, (B) microscópico de força atômica. As análises de MEV e MFA foram realizadas no Laboratório de Tribologia de Materiais da Faculdade de Engenharia Mecânica/UFU e Instituto de Física USP/São Carlos, respectivamente.

2.2 - Reagentes e Soluções Utilizadas

Reagentes

- Acetato de sódio, $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Pró Análise, 99%, M.M.= 136;
- Ácido 4 – hidroxifenilacético, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, Acros Organics, 98%, M.M.= 152,15;
- Ácido acético, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, Reagen, 97%, $d = 1,05$, M.M.= 102,09;
- Ácido bórico, H_3BO_3 , Vetec, 99,8%, M.M.= 61,83;
- Ácido clorídrico, HCl , Reagen, 36,5-38%, $d = 1,19$, M.M. = 36,43;
- Ácido fosfórico, H_3PO_4 , Reagen, 85%, $d = 1,83$, M.M.= 98;
- Ácido nítrico, HNO_3 , Cinética, 65%, $d = 1,50$, M.M.=63,01;
- Ácido perclórico, HClO_4 , Reagen, 70%, $d = 1,66$, M.M.=100,46;
- Adenosina monofosfato, Acros Organics, 99%;
- Brometo de etídio, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{BrN}_3$, Fluka, 99,999%, M.M. = 394,33;
- Citrato de sódio, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Reagen, 99,9%, M.M.= 294,11;
- Cloreto de potássio, Vetec, 99,5%, KCl , M.M. = 74,55;
- Cloreto de sódio, NaCl , Vetec, 99%, M.M. = 58,44;
- Di-hidrogeno fosfato de sódio, Na_2HPO_4 , Vetec, 99%, M.M.= 141,96;
- Ferricianeto de potássio, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, Reagen, 99%, M.M.= 329,25;

- Ferrocianeto de potássio, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, Vetec, 99%, M.M.= 422,39;
- Guanodina monofosfato, Acros Organics, 99%;
- Hidróxido de sódio, NaOH, Vetec, 98%, M.M.= 40;
- Mono-hidrogeno fosfato de sódio, NaH_2PO_4 , Vetec, 99%, M.M.= 119,98;
- Oligonucleotídeos, Invitrogen Life Technology, 99,999%;
- Gás nitrogênio ultrapuro;
- Grafite em bastão, Alfa Aesar, 99.9995%, diâmetro 6 mm;
- Alumina Buehler, 0,3 μm ;
- Adesivo epóxi 24horas, Araldite.

Soluções

- Solução de ácido perclórico 0,5 mol L^{-1} ;
- Solução de ácido 4-hidroxifenilacético ($2,5 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-2}$ mol L^{-1}) em meio de $HClO_4$ (0,5 mol L^{-1});
- Solução aquosa contendo $K_3Fe(CN)_6$ (5×10^{-3} mol L^{-1}), $K_4Fe(CN)_6$ (5×10^{-3} mol. L^{-1}) e KNO_3 (0,1 mol. L^{-1});
- Solução $4,86 \times 10^{-3}$ mol. L^{-1} de brometo de etídio em metanol;
- Tampão SSC (citrato de sódio 0,3 mol L^{-1} e cloreto de sódio 3 mol L^{-1}), pH 7;
- Tampão acetato de sódio/ácido acético, 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5;
- Tampão fosfato, 0,1 mol L^{-1} , pH = 7,4;
- Tampão universal (ácido bórico, acético e fosfórico), 0,04 mol L^{-1} , pH – 2-12;
- Tampão 1X: Tris-HCl 200 mmol L^{-1} , pH 9.0.
- Suspensão de alumina 0,3 μm em água deionizada.

2.3 – Procedimentos Experimentais

2.3.1 - Limpeza do Material

A vidraria utilizada foi tratada com ácido nítrico concentrado por cerca de 24 horas e a seguir lavada com água deionizada. As soluções adicionadas às células foram borbulhadas com nitrogênio ultra puro por cerca de 40 minutos.

O eletrodo auxiliar de platina foi flambado para retirada de traços de material orgânico que pudessem estar presentes em sua superfície.

O eletrodo de trabalho de grafite foi polido com alumina 3,0 μm e colocado em um aparelho de ultra-som para retirada de resíduos de alumina e depois seco com nitrogênio ultra puro.

2.3.2 - Determinação da Qualidade da Superfície do Eletrodo de Trabalho

Os eletrodos foram acoplados à célula eletroquímica contendo o par redox $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mmol L^{-1} em KNO_3 0,1 mol L^{-1} , faixa de potencial de -0,1 a +0,5V e velocidade de varredura 50 mV s^{-1} conectados ao potenciostato. Foram feitas voltametrias cíclicas analisando-se as reações de oxi-redução do par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Foi utilizada como parâmetro de qualidade do eletrodo de trabalho, a diferença entre os picos de oxidação e redução deste par redox, 60 mV até 100 mV. O eletrodo de grafite com boa resposta na solução contendo o par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ foi lavado com água deionizada e transferido para uma solução de ácido perclórico 0,5 mol L^{-1} , de 0,0 até +1,2 V, 50 mV s^{-1} . Este último procedimento foi utilizado para determinação da linha de base para os eletrodos modificados com filmes poliméricos.

2.3.3 – Formação de Filme Polimérico

O eletrodo de trabalho de grafite foi transferido para uma célula previamente deaerada com solução do monômero 4-HFA em meio de ácido perclórico 0,5 mol L^{-1} . Foram feitas varreduras sucessivas de potencial na faixa de -0,7 V a +1,2 V) e velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Depois o eletrodo modificado foi lavado com água deionizada e seco com nitrogênio. A seguir, foi levado para a célula contendo o

par redox $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, e para célula contendo ácido perclórico para análises eletroquímicas do filme.

Os filmes derivados de 4-HFA foram feitos variando o pH da solução monomérica, utilizando ácido perclórico como eletrólito suporte. O pH foi ajustado com soluções de hidróxido de sódio e ácido perclórico.

Após a eletropolimerização os eletrodos foram utilizados como suporte para a imobilização de biomoléculas.

2.3.4 – Incorporação de Biomoléculas ao Eletrodo Modificado

2.3.4.1 – Imobilização de Nucleotídeos Monofosfatos

Após pré-condicionamento do eletrodo de trabalho (+0,00V a +1,40V) em tampão acetato ou em tampão fosfato, 15 μL das bases nitrogenadas guanosina (GMP) e adenosina (AMP) monofosfato foram imobilizadas sobre a superfície do eletrodo por gotejamento à temperatura ambiente, separadamente. A seguir, o eletrodo de trabalho foi colocado em um dessecador durante 30 minutos, e logo após foi levado à célula eletrolítica contendo o eletrólito utilizado para os estudos de detecção dos nucleotídeos trifosfatos.

2.3.4.2 – Estudo da Variação do pH de Detecção

Foram feitas as otimizações dos picos de potencial e correntes anódicas para a eletrooxidação da AMP e GMP em tampão universal. A série de tampão universal de Britton–Robinson (B–R) [182] de pH 2,0–11,0 constitui-se de uma mistura de ácido acético, fosfórico e bórico a 0,04 mol L^{-1} , ajustada para o pH desejado com 0,20 mol L^{-1} de hidróxido de sódio.

2.3.4.3 – Imobilização de Oligonucleotídeos

A solução de oligonucleotídeos foi preparada em tampão SSC diluída 6 vezes nas concentrações de 6,4. 10^{-2} mmol L^{-1} (poliG, poliA e poliGA) e de 1,8. 10^{-1} mmol L^{-1} (poliC, poliT e poliCT). As sequências usadas foram:

poli(G)- 5'-GGGGGGGGGGGGGGGG-3', poli(A)- 5'-AAAAAAAAAAAAAAAA-3',
 poli(T)- 5'-TTTTTTTTTTTTTTTT-3', poli(C)- 5'-CCCCCCCCCCCCCCCC-3',
 poli(GA)- 5'-GGGGGGGAAAAAAAAA-3', poli(CT)- 5'-TTTTTTTCCCCCCCC-3'.

A imobilização das amostras de oligonucleotídeos sobre eletrodos de grafite modificados com poli(4-HFA), pré-condicionados, foi feita por gotejamento de 20 μL da amostra sobre a superfície do eletrodo, à temperatura de 25 ± 1 °C. O tempo de hibridação das bases foi de 40 minutos. A detecção foi estudada por voltametria de pulso diferencial (VPD) utilizando-se tampão acetato, pH 4,5, como eletrólito.

2.3.5 – Estudos com produto de PCR específico para dengue (DEN-1)

2.3.5.1 – Dosagem de DEN-1

Para a dosagem de DEN-1 foram utilizadas cubetas de quartzo, espectrofotômetro ultravioleta-visível Shimadzu 1650PC e leituras de absorbância em 260 nm. No comprimento de onda de 260 nm, uma unidade de absorbância corresponde a $50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de DNA fita dupla.

2.3.5.2 – Amplificação de DEN-1

Para a produção da sequência específica, DEN-1, a reação em cadeia da polimerase foi feita em um volume final de 25 μL contendo $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dNTPs, $1,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de MgCl_2 , tampão 1X, 10 pmol de oligonucleotídeos. 1 unidade de Taq DNA polimerase, 100 ng de RNA genômico. Todos os reagentes foram obtidos da Invitrogen Life Technology.

O preparo da mistura reacional para RT-PCR e PCR estão descritas abaixo:

Condições da RT (37°C por 1 hora):

Tampão RT = 5 μL

Primer DENV-Geral= CAA TAT GCT GAA ACG CGC GAG AAA CCG = 1 μL

dNTPs = 0,5 μL

Transcriptase reversa (200U) = 1 μL

Inibidor de RNase = 0,25 μL

RNA = 5 μL

DTT = 2,5 μL

H_2O = 4,75 μL

Volume total = 20 μL

A reação de seqüenciamento foi feita no seguinte ciclo de PCR:

As condições da PCR são (94°C , 1 min + 35 ciclos de 94°C ; 30 seg; 64°C , 40 seg; 72°C 5 min).

Tampão Taq = 2,5 μL

MgCl_2 = 0,75 μL

Primer DENV1 (5'-AGC AGC ATC AGG AGC ATG GTC AC-3') = 1 μL

DNA da RT-PCR = 2 μL

dNTPs = 0,5 μL

Taq DNA polimerase = 0,4 μL

H_2O = 13,85 μL

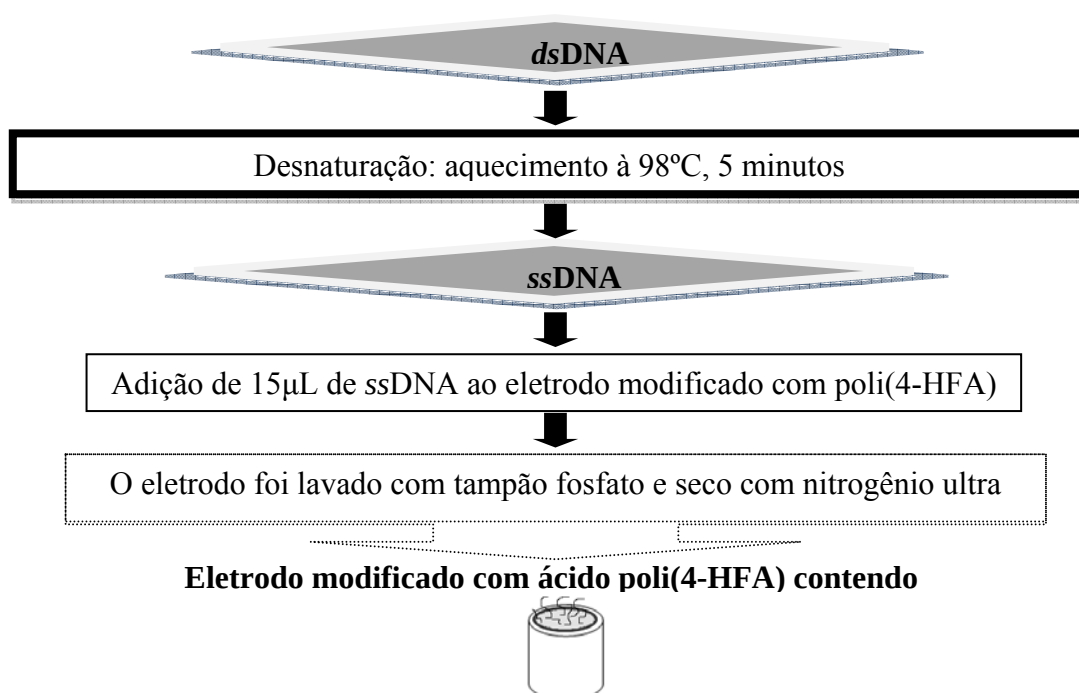
Volume total = 25 μL

O fragmento de DNA obtido (DEN-1), composto de 288 pares de bases, foi utilizado para o desenvolvimento do biossensor. A análise da seqüência nucleotídica foi feita utilizando-se o programa Blast [183].

2.3.5.3 – Detecção da Hibridação

Para as imobilizações de DEN-1, com 288 pares de bases, foram utilizados eletrodos modificados e não-modificados com ácido poli(4-HFA). Para obtenção da linha base, foi aplicado um potencial de oxidação ao eletrodo modificado com ácido poli(4-HFA) utilizando tampão fosfato como eletrólito, antes das imobilizações. De acordo com as etapas abaixo:

PARTE A - Imobilização de ssDNA



PARTE B - Hibridização com o produto de PCR complementar

- a) A estufa foi pré-aquecida a 42°C;
- b) Gotejou-se 20µL do produto de PCR desnaturado ao eletrodo modificado com a ssDNA;
- c) Manteve-se este eletrodo durante 10 minutos na estufa pré-aquecida para permitir a hibridação;
- d) Logo após o evento anterior o eletrodo foi lavado em tampão e seco nas mesmas condições da PARTE A;

PARTE C- Detecção de DEN-1

Após a obtenção dos eletrodos descritos na PARTE A e B:

- a) Foram gotejados aos eletrodos 15µL uma espécie eletroativa capaz de identificar o evento da hibridação;
- b) O sistema foi deixado à temperatura ambiente por 5 minutos;
- c) Os eletrodos modificados foram lavados em tampão e secos, nas mesmas condições da PARTE A;
- d) Os eletrodos foram detectados eletroquimicamente em tampão fosfato utilizando-se VPD.

2.3.6 – Análises das Superfícies

2.3.6.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os eletrodos de grafite e eletrodos de grafite modificados com os filmes poliméricos foram analisados por microscopia eletrônica de varredura.

2.3.6.2 - Microscopia de Força Atômica (MFA)

As microscopias de força atômica foram realizadas seguindo procedimento proposto por Lobo *et al.*, 1999 [184]. A topografia das superfícies dos eletrodos modificados com ácido poli(4-HFA) contendo oligonucleotídeos ou DNA do vírus da

dengue foram feitas no microscópio de força atômica utilizando um cantilever de silicone com uma constante elástica na faixa de 20–100 N m⁻¹ e uma área de varredura de 5x5 μm².

2.3.6.3 - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Os espectros de impedância dos eletrodos de grafite modificados com ácido poli(4-HFA) sem e com bases nitrogenadas do DNA foram realizados usando o mesmo sistema, em uma célula de três compartimentos. As análises foram feitas em 5.0 mmol L⁻¹ do par redox K₄Fe(CN)₆/ K₃Fe(CN)₆ e em 1.0 mol L⁻¹ KCl. O potencial de circuito aberto foi monitorado, e as medidas de impedância foram realizadas após sua estabilização. As medidas para cada eletrodo foram feitas variando a faixa de frequência entre 10⁶ – 10⁻² Hz usando um sinal de excitação senoidal com uma amplitude de excitação de 5 mV. Os espectros de impedância foram ajustados para um circuito elétrico equivalente usando um programa de circuito equivalente da CH Instruments, modelo 760C, versão 6.21.