

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Desenvolvimento de Método Eletroanalítico Utilizando
Sensores Eletroquímicos Descartáveis para Detecção do
Biomarcador miRNA-203 Visando o Diagnóstico de Câncer
de Cabeça e Pescoço”**

Wilson Tiago da Fonseca*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA

**Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Coorientador: Prof. Dr. Matias Eliseo Melendez**

***Bolsista CAPES**

**São Carlos - SP
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Wilson Tiago da Fonseca, realizada em 31/07/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Campanhã Vicentini (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes (UFSCar)

Prof. Dr. André Luiz dos Santos (UFU)

Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini (UFPR)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,
Aos meus pais, Wilson Aparecido e Maura Helena,
pelo amor, força, compreensão e apoio.

EPÍGRAFE

“Na vida não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós. Está à tua disposição a potência, o poder de bem realizar, de vencer adversidades, reduzir atritos, convencer nos negócios honestos, melhorar de emprego, ampliar amizades, obter a paz no lar e tudo mais. Quanto mais te convences de que podes ser feliz, de que tens em ti os atributos da paz, ação, resistência e amor, mais as facilidades chegam a ti. No entanto, se preferes viver em lamentações, na recusa à prática do bem, ou no cultivo de vícios, ergues desnecessariamente, barreiras a ti mesmo. Crê em ti mesmo, age e verá os resultados. Quando te esforças a vida também se esforça para te ajudar.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda energia e coragem para superar todas as dificuldades encontradas no meu caminho, possibilitando a conclusão deste Trabalho.

Aos meus pais, Wilson Aparecido e Maura Helena Fonseca por todo apoio, amor, carinho e dedicação. Sem vocês eu não teria conseguido!

Ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria por toda orientação e auxílio durante a realização deste Trabalho. Obrigado por me acompanhar em nossas idas à Barretos e a todos os cafés que tomamos juntos acompanhados daquela conversa agradável e descontraída.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Matias Eliseo Melendez por toda a paciência e colaboração com o Trabalho. Sua ajuda foi muito importante Matias!

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem participar da banca contribuindo bastante para o Trabalho.

À Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters pelo auxílio nos estudos envolvendo as amostras de RNA total.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Cincotto e à Profa. Dra. Bruna Cláudia Lourenção por todo auxílio no desenvolvimento do Trabalho.

Aos Professores do Departamento de Química, em especial aos Profs. Drs. Joaquim de Araújo Nobrega, Romeu Cardozo Rocha Filho e Orlando Fatibello Filho, foi uma honra receber seus ensinamentos que agregaram bastante para minha formação moral e acadêmica.

Às secretárias Ariane, Cristina e Luciani por todos os serviços prestados.

Ao Prof. Dr. André Luiz dos Santos e à Profa. Dra. Regina Massako Takeuchi pela contribuição na minha formação durante a Iniciação Científica e Mestrado. Sem vocês eu não teria chegado até aqui. Muito Obrigado!

Aos amigos do LaBiE, Camila, Grazi, Karla, Taíse, Tássia, Tayane, Thaísa, Sthéfane, Vagner e Wylían. Muito obrigado por me acolher no Grupo sempre ajudando, contribuindo e discutindo, sem esquecer os momentos de descontração e do agradável café. Em especial a Grazi e a Tássia, por todo auxílio, amizade e a oportunidade de trabalharmos juntos.

Aos amigos do LABBES, Ademar, Elson, Índio, Tiago Almeida e Thiago Prado. Muito obrigado por todos reagentes e equipamentos emprestados e pelos momentos descontraídos.

Aos colegas do GQA pelo auxílio e companheirismo durante todos esses anos.

Ao Gabriel por me acolher durante a minha chegada em São Carlos.

Ao pessoal da República “Tarja Preta”, especialmente ao Pio e Raphael pela amizade e companheirismo.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelos recursos concedidos ao LaBiE, sobretudo à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa concedida durante o Doutorado.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste Trabalho. Muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Ampére
a	Amplitude do pulso
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathiona
BQ	Benzoquinona
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CV	Voltametria/Voltamograma Cíclica(o) (do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>)
CE	Célula eletroquímica
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNA _{Cp}	DNA controle positivo
DNA _{Sc}	DNA sonda de captura
DNA _{Sd}	DNA sonda de detecção
DPV	Voltametria/Voltamograma de pulso diferencial (do inglês, <i>Differential pulse voltammetry</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
E_{dep}	Potencial de eletrodeposição
f	Frequência
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, <i>Glassy Carbon Electrode</i>)
GSH	Glutathiona
HEPES	Ácido ((N-(2-hidroietil)piperazina-N'-(2- etanosulfônico))
HQ	Hidroquinona
HRP	Peroxidase de raiz forte (do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>)
I	Corrente
i_p	Corrente de pico

LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MES	ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
miRNA	microRNA
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio) (do inglês, <i>poly(diallyldimethylammonium) chloride</i>)
PM	Partícula magnética
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
SWV	Voltametria/Voltamograma de onda quadrada (do inglês, <i>square wave voltammetry</i>)
SED	Sensor eletroquímico descartável
μ SED	Sensor eletroquímico descartável microfluídico
t_{dep}	Tempo de eletrodeposição
TW20	Tween-20
v	Velocidade de varredura

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequências de bases nitrogenadas das sondas de DNA utilizadas no desenvolvimento do método eletroanalítico.	24
TABELA 2 - Razão entre A_{SPR} e A_{450} e relação com o diâmetro das AuNPs. Fonte: Haiss et. al., 2007 ¹¹¹	51
TABELA 3 - Valores de área eletroativa estimada em cada etapa de modificação do μ SED.	62
TABELA 4 - Faixa avaliada e parâmetros otimizados da SWV.	75
TABELA 5 - Métodos eletroanalíticos reportados para detecção de miRNA.....	82

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - A) Superior: SED fabricado em folhas de poliéster. Inferior: SED contendo um arranjo de oito células eletroquímicas, Fonte: Afonso *et al.*, 2016⁷⁵. B) SED fabricado em papel filtro, Fonte: de Oliveira *et al.*, 2019⁷⁶. C) μ SED magnético contendo um arranjo de oito WEs, Fonte: de Oliveira *et al.*, 2018⁷⁷.9
- FIGURA 2 - Representação esquemática da diversidade de moléculas que podem ser ancoradas na superfície de PMs. Fonte: KUDR, Jiri *et al.*, 2018⁸⁷ 12
- FIGURA 3 - Representação esquemática do biossensor eletroquímico magnético para a detecção de miRNA. Fonte: Z. Wang *et al.*, 2013⁹² 13
- FIGURA 4 - Etapas de amplificação envolvidas na determinação cronoamperométrica de microRNA através de ensaios de hibridização. Fonte: H. Yin *et al.*, 2012¹⁰⁵ 16
- FIGURA 5 - Ilustração esquemática das etapas envolvidas na fabricação do biossensor eletroquímico para detecção de miRNA-155 em amostras de soro humano. Fonte: J. Zhang and X. Hun, 2019¹⁰⁶ 18
- FIGURA 6 - Síntese das AuNPs decoradas com glutathiona (AuNPs-GSH). 26
- FIGURA 7 - Etapas envolvidas na síntese das AuNPs: A) Aquecimento sob agitação até ebulição. B) Adição da solução de citrato de sódio. C) Interrupção do aquecimento e formação das AuNPs..... 27
- FIGURA 8 - Etapas envolvidas na formação das AuNPs_{Sd}. A) AuNPs. B) Adição da DNA_{Sd}. C) Centrifugação das AuNPs_{Sd}. D) Adição de BSA. E) AuNPs_{Sd} finalizada. 28
- FIGURA 9 - Representação esquemática das etapas envolvidas na formação das PM_{Sc}. A) Suspensão de PMs. B) Separação magnética. C) PMs separadas. D) Adição de EDC às PMs. E) Formação do intermediário *o*-aciluréia na superfície das PMs. F) Adição da sonda de DNA_{Sc}. G) Adição de BSA às PM_{Sc}. 30
- FIGURA 10 - Fotografia do separador magnético utilizado na bioconjugação das PMs com a DNA_{Sc}..... 31

FIGURA 11 - Representação esquemática das etapas envolvidas na formação do bioconjugado. A) Hibridização das PM_{Sc} com a DNA_{Cp} . B) Formação das $PM_{Sc}-DNA_{Cp}$ e C) $PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Ssd}$. D) Adição do $PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Ssd}$ ao WE. E) Registro de sinal através da técnica de SWV..... 33

FIGURA 12 – Representação esquemática das etapas envolvidas na formação do bioconjugado $PM-DNA_{Sc}-DNA_{Cp}-HRP$. A) Adição de EDC às PMs. B) Formação do intermediário o-aciluréia na superfície das PMs. C) Hibridização da DNA_{Sc} com o DNA_{Cp} . D) Formação da $DNA_{Sc}-DNA_{Cp}$. E) Imobilização da $DNA_{Sc}-DNA_{Cp}$ nas PMs. F) formação do bioconjugado $PM-DNA_{Sc}-DNA_{Cp}-HRP$ 35

FIGURA 13 - Representação esquemática da fabricação dos SEDs. A) Recorte do adesivo de baixa aderência com impressora de recorte. B) Remoção das partes recortadas indesejadas. C) Serigrafia dos eletrodos com tinta de carbono. D) Pintura dos REs utilizando tinta de Ag/AgCl. E) Remoção do adesivo. F) SED sem adesivo vinílico. G) Adição de máscara de cartão polaseal. H) Aquecimento do SED em prensa térmica. I) Formação da máscara hidrofóbica. J) Adição de ímãs de neodímio na parte de trás dos WEs. K) Fotografia do SED finalizado. 38

FIGURA 14 - A) Representação esquemática da construção do μ SED. B) μ SED finalizado com os conectores de entrada e saída da solução no sistema microfluídico. 39

FIGURA 15 - Etapas envolvidas na modificação dos WEs com a DNA_{Sc} : A) Arranjo de 8 WEs contendo o CE. B) Adição de PDDA ao WE. C) Adição das AuNPs ao WE. D) Ligação amida formada entre as AuNPs e a DNA_{Sd} . E) Bloqueio com BSA. 41

FIGURA 16 - Ilustração das etapas envolvidas na detecção eletroquímica do miRNA-203 via marcação com HRP. A) μ SED- DNA_{Sd} . B) Incubação das $PM_{Sc}-DNA_{Cp}$ com o μ SED- DNA_{Sd} . C) Registro de sinal através da técnica de Amperometria..... 43

FIGURA 17 - Fotografia do sistema microfluídico empregado para a detecção eletroquímica de miRNA-203 empregando a enzima HRP como marcador eletroquímico. Fonte: de Oliveira, T. R. 2019¹¹⁰. 44

FIGURA 18 - Foto do sistema eletroquímico utilizado para a detecção de miRNA-203 nas amostras de RNA total utilizando o SED. 46

FIGURA 19 - Espectros de UV-vis registrados para as AuNPs e AuNPs-GSH.	50
FIGURA 20 - A) MEV realizada para as AuNPs previamente sintetizadas. B) Histograma de distribuição de tamanho das AuNPs.....	52
FIGURA 21 – Imagens de MET realizadas para os bioconjugados: A) PM _{Sc} , B) AuNP _{Ssd} , C) PM _{Sc} -DNA _{Cp} -AuNP _{Ssd} e D) Ampliação de C).....	54
FIGURA 22 - Análise de EDX para os bioconjugados: A) PM _{Sc} , B) AuNP _{Ssd} e C) PM _{Sc} -DNA _{Cp} -AuNP _{Ssd}	55
FIGURA 23 - A) Medidas de CV registradas com solução aquosa de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,5 mol L ⁻¹ para as 8 CEs do SED ($n = 8$), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ de 0,0 a +0,6 V. B) i_{pa} registradas para cada CE dos 3 SEDs.....	57
FIGURA 24 – Medidas de CV registradas em solução de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ , KCl 0,5 mol L ⁻¹ pH = 8,0 utilizando o SED em diferentes valores de v . Inserido: i_{pa} versus $v^{1/2}$, $r^2 = 0,997$	58
FIGURA 25 - Imagens de MEV registradas para o WE do SED em diferentes ampliações: A) 100 × e B) 2000 ×.....	60
FIGURA 26 - Voltamogramas cíclicos registrados com solução de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L ⁻¹ , KCl 0,5 mol L ⁻¹ pH = 8,0 após cada etapa de construção do μ SED-DNA _{Ssd} , $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$..	62
FIGURA 27 - Imagens de MEV registradas dos WE em cada etapa de fabricação do μ SED: A) μ SED (sem modificação), B) μ SED-PDDA, C) μ SED-PDDA-AuNPs e D) Ampliação de C).....	64
FIGURA 28 - Esquema do ciclo catalítico da enzima HRP na superfície do WE após a incubação com PM _{Sc} -HRP-DNA _{Cp} no μ SED-DNA _{Ssd} . HRP _{red} = enzima HRP reduzida (forma nativa), HRP _{ox} = HRP oxidada.....	65
FIGURA 29 - Amperogramas registrados em diferentes concentrações de DNA _{Cp} utilizando o μ SED. Vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$, $E = -0,25 \text{ V}$, solução de detecção H ₂ O ₂ 0,2 mmol L ⁻¹ e HQ 2,0 mmol L ⁻¹	67
FIGURA 30 – Medidas de DPV registradas na ausência e presença de AuNPs em HCl 0,2 mol L ⁻¹ 1:1 (v/v). $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $v = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ e $a = 40 \text{ mV s}^{-1}$..	70

- FIGURA 31 - A) Medidas de SWV registradas com as AuNPs em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando diferentes valores de t_{dep} . $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. B) i_p medida para diferentes valores de E_{dep} e t_{dep} 71
- FIGURA 32 - A) SWV registrados com AuNPs em HCl utilizando diferentes valores de f . $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120\text{s}$, $a = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. B) $-i_{pAu}$ para os diferentes valores f 72
- FIGURA 33 - A) Medidas de SWV registradas com AuNPs em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando diferentes valores de a . $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120\text{s}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. B) $-i_{pAu}$ para os diferentes valores de a 73
- FIGURA 34 - A) SWV registradas com as AuNPs em HCl utilizando diferentes valores de ΔE_s . $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120\text{s}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$. B) $-i_{pAu}$ para os diferentes valores ΔE_s 74
- FIGURA 35 – SWV registrados com HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ na (–) ausência de DNA_{Cp} e em diferentes concentrações de DNA_{Cp} para a formação do bioconjugado: (–) $0,5$ e (–) $10,0 \text{ pmol L}^{-1}$. $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$ 76
- FIGURA 36 – Representação esquemática do processo de hibridização da DNA_{Sc} com o miRNA-203 seguido da ligação com a DNA_{Sd} 78
- FIGURA 37 - A) SWV registrados em diferentes concentrações de DNA_{Cp} empregando HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$. B) Curva analítica obtida a partir dos dados de A)..... 80
- FIGURA 38 - Concentrações encontradas de miRNA-203 nas amostras de linhagens celulares Jurkat, SCC25-A e SCC25-B. 86
- FIGURA 39 - Concentrações encontradas de miRNA-203 obtidas com o método proposto e os resultados obtidos por RT-PCR nas amostras de linfonodos de pacientes com CCP..... 87

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ELETROANALÍTICO UTILIZANDO SENSORES ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR MIRNA-203 VISANDO O DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO. Um grande esforço tem sido realizado no desenvolvimento de novos métodos analíticos para a detecção de biomarcadores visando o diagnóstico de câncer. Diante disso, neste trabalho foi desenvolvido um método eletroanalítico empregando sensores eletroquímicos descartáveis (SEDs) de baixo custo para o diagnóstico precoce de câncer de cabeça e pescoço (CCP) de forma simples, rápida e precisa. Os SEDs foram fabricados utilizando uma impressora de recorte para artesanato e materiais descartáveis, tais como folhas de poliéster (transparência para impressora a laser), adesivos de vinil, máscaras de polaseal (plástico para plastificação), tintas condutora de carbono e Ag/AgCl. Todos os eletrodos presentes no SED foram fabricados empregando a técnica de serigrafia, os quais foram utilizados para a detecção do biomarcador microRNA-203 (miRNA-203) relacionado ao CCP. O método analítico para a detecção de miRNA-203 foi desenvolvido utilizando uma sequência de DNA sonda de captura (DNA_{Sc}) a qual foi imobilizada em partículas magnéticas (PMs) para captura do miRNA-203 (PM_{Sc}) por meio de ensaios de hibridização resultando na formação do bioconjugado PM_{Sc} -miRNA-203, após a captura do miRNA-203 uma sequência de DNA sonda de detecção (DNA_{Sd}) complementar à DNA_{Sc} foi imobilizada em nanopartículas de ouro ($AuNPs_{Sd}$) permitindo a sua ligação na região terminal da DNA_{Sc} formando o bioconjugado PM_{Sc} -miRNA203- $AuNPs_{Sd}$. O bioconjugado formado foi caracterizado utilizando as técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Microscopia Eletrônica de Transmissão, e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X. O sinal analítico foi obtido empregando a técnica de Voltametria de Onda Quadrada (SWV) e solução de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ como eletrólito de suporte. Após a otimização dos parâmetros da SWV, o método foi aplicado em amostras de RNA total extraído de linhagens celulares e de linfonodos de pacientes com CCP cedidas pelo Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Amor de Barretos-SP. O método eletroanalítico desenvolvido apresentou uma curva analítica com faixa linear de $1,0$ a $500,0 \text{ fmol L}^{-1}$, coeficiente de correlação linear de $0,997$ e limite de detecção de $0,52 \text{ fmol L}^{-1}$. O método proposto diferenciou indivíduos saudáveis e pacientes portadores de CCP por meio da quantidade de miRNA-203 encontrada nas amostras de linfonodos e apresentou-se como um método alternativo de baixo custo bastante atrativo para o diagnóstico precoce de CCP de forma simples, rápida e precisa o que pode vir a contribuir para um tratamento mais efetivo aos pacientes portadores da doença.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ELECTROANALYTICAL METHOD USING DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR MIRNA-203 BIOMARKER DETECTION AIMING DIAGNOSIS OF HEAD AND NECK CANCER. A great effort has been made in the development of new analytical methods for biomarker detection aiming at the diagnosis of cancer. Therefore, in this work it was developed an electroanalytical method using low-cost disposable electrochemical sensors (DESSs) for the early diagnosis of head and neck cancer (HNC) in a simple, fast, and accurate way. The DESSs were fabricated using a craft cutter printer and disposable materials, such as polyester sheets (transparency film for laser printers), vinyl adhesives, laminating pouch masks, carbon conductive and Ag/AgCl inks. All electrodes present in the DES were fabricated employing the screen printing technique, which were used for the detection of the microRNA-203 biomarker (miRNA-203) related to the HNC. The analytical method for the miRNA-203 detection was developed using a capture probe DNA sequence (DNA_{Cp}) which was immobilized in magnetic particles (MPs) to capture miRNA-203 (MP_{Cp}) through hybridization assays resulting in the formation of the bioconjugate MP_{Cp} -miRNA-203, after the capture of miRNA-203 a detection probe DNA sequence (DNA_{Dp}) complementary to DNA_{Cp} was immobilized on gold nanoparticles (AuNPs_{Dp}) allowing its binding in the terminal region of DNA_{Cp} forming the bioconjugate MP_{Cp} -miRNA203- AuNPs_{Dp} . The bioconjugate formed was characterized using the techniques Scanning Electron Microscopy, Transmission Electron Microscopy and, Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy. The analytical signal was obtained using the Square Wave Voltammetry (SWV) technique and a 0.2 mol L^{-1} HCl solution as a supporting electrolyte. After the optimization of the SWV parameters, the method was applied in samples of total RNA from cell lines and lymph nodes of patients with HNC provided by the Molecular Oncology Research Center of the Barretos Cancer Hospital. The electroanalytical method developed presented an analytical curve with a linear range from 1.0 to $500.0 \text{ fmol L}^{-1}$, linear correlation coefficient of 0.997, and limit of detection of 0.52 fmol L^{-1} . The proposed method differentiated healthy individuals and patients with HNC through the amount of miRNA-203 found in the lymph node samples and was presented as an alternative method of low cost, very attractive for the early diagnosis of HNC in a simple, fast and, precise way, which could contribute to a more effective treatment to patients with the disease.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1 - INTRODUÇÃO	2
1.1 - Câncer de cabeça e pescoço	2
1.2 - Biomarcadores.....	4
1.2.1 - Métodos de detecção de miRNAs	6
1.3 - Sensores eletroquímicos descartáveis (SEDs)	7
1.4 - Partículas Magnéticas (PMs) em métodos eletroanalíticos.....	11
1.5 - AuNPs para detecção eletroquímica de biomoléculas	15
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	20
2 - OBJETIVO	21
2.1 - Objetivo geral.....	21
2.2 - Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 3: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	23
3.1 - Reagentes e soluções.....	23
3.2 - Materiais e instrumentação.....	24
3.3 - Síntese das AuNPs decoradas com glutaniona	26
3.4 - Síntese das AuNPs estabilizadas com citrato.....	27
3.4.1 - Bioconjugação das AuNPs com DNA _{Sd}	28
3.5 - Modificação das partículas magnéticas (PMs) com a sonda de DNA de captura (DNA _{Sc})	29
3.5.1 - Ensaio de hibridização para a quantificação do miRNA-203 utilizando as AuNPs	32
3.5.2 - Ensaio de hibridização para a quantificação do miRNA-203 utilizando a enzima HRP	34
3.6 - Construção dos SEDs	37
3.6.1 - Construção dos SEDs microfluídicos (μ SEDs)	39

3.6.2 - Modificação dos μ SEDs com a sonda de DNA	40
3.6.3 - Medidas eletroquímicas com os μ SEDs.....	42
3.6.4 - Medidas eletroquímicas com os SEDs.....	45
3.7 - Análise das amostras de linhagens celulares e linfonodos	47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 - Caracterização espectroscópica das AuNPs e AuNPs-GSH.....	50
4.1.1 - Caracterização microscópica das AuNPs.....	51
4.1.2 - Caracterização microscópica do bioconjugado PM_{Sc} - DNA_{Cp} - $AuNPs_{Sd}$...	53
4.1.3 - Caracterização eletroquímica e morfológica do SED	57
4.2 - Caracterização eletroquímica e morfológica do μ SED- DNA_{Sd}	60
4.2.1 - Detecção de miRNA-203 utilizando o μ SED- DNA_{Sd}	64
4.3 - Estudos eletroquímicos preliminares com as AuNPs empregando os SEDs.....	69
4.4 - Otimização dos parâmetros eletroquímicos da SWV	70
4.5 - Detecção do biomarcador miRNA-203.....	75
4.6 - Construção da curva analítica.....	79
4.7 - Quantificação de miRNA-203 em amostras de linhagens de células e linfonodos.....	85
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES.....	89
5 - CONCLUSÕES.....	90
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Câncer de cabeça e pescoço

O câncer pode ser definido como um grupo de mais de 100 doenças, as quais provocam o crescimento desordenado de células, invadindo tecidos e órgãos. Quando estas células são divididas aceleradamente, elas tendem a ser bastante agressivas e sem controle ocasionando o surgimento de tumores, os quais podem espalhar-se para diversas regiões do corpo. Os tipos de câncer estão relacionados com os diversos tipos de células do corpo, por exemplo, se iniciam em tecidos epiteliais tais como mucosas ou pele, são chamados de carcinomas. Ao passo que se o surgimento ocorre em tecidos conjuntivos, como por exemplo, cartilagem, músculo ou osso, são denominados sarcomas¹. Em alguns casos, as células cancerígenas geneticamente instáveis podem se adaptar aos tecidos distantes do tumor primário resultando no espalhamento da doença, esse processo é conhecido como metástase².

Os números de casos de câncer vêm crescendo cada vez mais em todo o mundo, em 2015 a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou o câncer como a primeira ou segunda causa de mortes em pessoas com menos de 70 anos de idade em mais de 90 países³. No Brasil, a estimativa para o ano de 2020 é de mais de 309 mil casos de câncer em homens e mais de 316 mil novos casos em mulheres, sem relatar os casos de câncer de pele não melanoma. Os tumores da cavidade oral, laringe, lábios, faringe, tireoide e cavidade nasal são agrupados como cânceres de cabeça e pescoço (CCP). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou para 2020 a ocorrência de mais de 11 mil novos casos de câncer da cavidade oral, 6.470 de laringe e 11.950 de tireoide¹.

Alguns fatores podem contribuir para o desenvolvimento do CCP, tais como: alimentação pobre em nutrientes sem o consumo de frutas e vegetais⁴,

consumo de álcool e tabaco^{5,6}, higiene bucal deficiente^{7,8} e a presença de agentes infecciosos, como por exemplo, o vírus do papiloma humano^{9,10}. Além disso, o histórico familiar também pode contribuir para o surgimento do CCP¹¹. Diante disso, nota-se a importância de desenvolver novos métodos analíticos para contribuir no diagnóstico de CCP.

O diagnóstico de CCP tem sido normalmente realizado empregando exames de imagens tais como: ultrassonografia¹², endoscopia¹³, tomografia computadorizada¹⁴ e ressonância magnética¹⁵. Estas técnicas são ferramentas importantes no diagnóstico e tratamento da doença, contudo, alguns desses exames podem ser invasivos gerando desconforto aos pacientes e exposição a radiações ionizantes o que pode provocar danos à saúde dos mesmos. Além disso, em alguns casos é bastante difícil realizar o diagnóstico de câncer com exames de imagens devido à localização do tumor o que dificulta a realização tanto de exames de imagens quanto a biópsia, impossibilitando o diagnóstico da doença em estágios iniciais.

Portanto, nota-se a relevância de estudar este tipo de neoplasia maligna contribuindo para o desenvolvimento de novos métodos de análises complementares aos exames de imagens a fim de realizar um diagnóstico precoce, rápido, seguro e não invasivo, possibilitando a melhora no diagnóstico e acompanhamento da doença gerando qualidade de vida das pessoas portadoras de CCP. Neste sentido, é de suma importância a utilização de novas ferramentas de diagnóstico, como, a utilização de biomarcadores entre eles proteínas e microRNAs (miRNAs) a fim de contribuir para o diagnóstico da doença.

1.2 - Biomarcadores

A utilização de biomarcadores em análises clínicas tem sido bastante realizada para o diagnóstico de várias doenças através do seu emprego em etapas pré-clínicas¹⁶. O biomarcador pode ser mensurado e utilizado para auxiliar no diagnóstico ou estágio de doenças uma vez que o mesmo é um composto ou parâmetro biológico que indica um estado patológico ou normal do indivíduo¹⁷. Alguns exemplos de biomarcadores são proteínas¹⁸ incluindo anticorpos¹⁹, DNA (do inglês, *Deoxyribonucleic acid*)²⁰, RNA (do inglês, *Ribonucleic Acid*)²¹ e miRNA²².

Os miRNAs podem ser definidos como uma classe de fragmentos de RNA não-codificantes normalmente com 21 a 25 nucleotídeos, que possuem função reguladora da expressão do gene²³. Essas moléculas também apresentam um papel relevante em vários processos relacionados ao câncer dos quais se destacam a apoptose, diferenciação, proliferação, controle do ciclo celular, metabolismo e migração^{24,25,26}. Assim, nota-se a relevância da utilização dos miRNAs em análises clínicas e a sua utilização como biomarcadores de várias doenças.

Alguns estudos têm demonstrado a utilização de miRNAs com bastante eficácia como biomarcadores para câncer²⁷, evidenciando o seu emprego no diagnóstico de vários tipos de câncer²⁸, tais como: colorretal²⁹, mama³⁰, próstata³¹, pâncreas³², endométrio³³, boca³⁴, estômago³⁵ e CCP³⁶. Além disso, os miRNAs também podem ser empregados como biomarcadores no diagnóstico de outros tipos de doenças, como por exemplo, artrite reumatoide³⁷, fibrose hepática³⁸ e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)³⁹.

Apesar da ampla utilização de biomarcadores em etapas pré-clínicas para o diagnóstico de várias doenças, poucos biomarcadores apresentam elevada confiabilidade nos resultados clínicos o que impossibilita o uso de alguns

biomarcadores em exames de rotina na maioria dos casos⁴⁰. Este fato faz com que não seja comum a detecção de um determinado biomarcador para realizar o diagnóstico preventivo em análises clínicas de rotina. No entanto, a realização de análises clínicas empregando miRNAs pode ser uma estratégia bastante promissora para o diagnóstico de doenças como o câncer, pois estes têm se mostrado como excelentes biomarcadores possibilitando sua detecção de forma menos invasiva, sendo possível realizar o diagnóstico de câncer com uma pequena quantidade de amostra de sangue sem a necessidade de hospitalização do indivíduo²⁸.

O miRNA-203 tem se demonstrado importante nos estudos relacionados ao CCP, pois além de poder ser utilizado como biomarcador este miRNA também tem apresentado atividade como supressor de tumor sendo um miRNA bastante importante no tratamento de pacientes portadores da doença⁴¹. Diante disso, de Carvalho *et al.*⁴² realizaram estudos demonstrando a utilização do biomarcador miRNA-203 no diagnóstico de CCP por meio da análise de amostras de linfonodos obtidas de pacientes empregando a técnica de qRT-PCR (do inglês, *Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Neste trabalho, o miRNA-203 mostrou-se seletivo indicando a viabilidade da utilização desse miRNA como biomarcador para o diagnóstico de CCP. As amostras de linfonodos foram coletadas em diferentes momentos durante o acompanhamento do paciente desde o estágio inicial da doença passando pelo planejamento da terapia até a vigilância dos pacientes. Os resultados demonstraram que o miRNA-203 pode ser bastante útil em análises clínicas com o objetivo de orientar o tratamento de pacientes com CCP.

1.2.1 - Métodos de detecção de miRNAs

O método corrente para a detecção miRNAs envolve o emprego da técnica de *Northern blotting*^{43,44,45} e reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)^{46,47,48}. Entretanto, a técnica de *Northern blotting* apresenta análises demoradas, com baixa sensibilidade e rendimento, além deste método ser semi-quantitativo. As análises utilizando RT-PCR normalmente necessitam de uma etapa de isolamento dos miRNAs, purificação, e inversão da transcrição para cDNA (do inglês, *Complementary Deoxyribonucleic Acid*) previamente a etapa de amplificação via reação em cadeia de polimerase empregando as bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G), além da utilização da enzima transcriptase reversa. Além disso, os equipamentos empregados para execução desta técnica apresentam um custo relativamente elevado e devido a sua complexidade não possui larga aplicação em análise de rotina em laboratórios de análises clínicas.

Diante disso, vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a detecção de miRNAs, dentre eles destacam-se os que empregam as técnicas de eletroforese capilar⁴⁹ e em microchip⁵⁰, luminescência enzimática⁵¹, ressonância de plasma de superfície⁵², eletroquimiluminescência⁵³ e fluorescência⁵⁴. Estes métodos apresentam como vantagem principal à elevada sensibilidade e baixos limites de detecção, entretanto, a complexa instrumentação e o custo elevado dos reagentes são desvantagens que tornam inviável o emprego destes métodos em alguns casos. Além disso, a maioria desses métodos utiliza dispositivos que não são descartáveis, tornando difícil a portabilidade dos mesmos e a utilização em análises *point-of-care*, ou seja, análises no ponto de atendimento.

Portanto, o desenvolvimento de novos dispositivos descartáveis para o diagnóstico de CCP através da detecção e quantificação de biomarcadores miRNAs

é de extrema importância, a fim de possibilitar um diagnóstico precoce, rápido, preciso, simples e de baixo custo, não permitindo o avanço da doença. Vários trabalhos têm demonstrado a detecção de biomarcadores miRNAs por meio da utilização de estratégias analíticas com detecção eletroquímica destes biomarcadores⁵⁵. As técnicas eletroquímicas comumente empregadas para detecção de miRNAs são amperometria, voltametria, potenciometria, condutometria e espectroscopia de impedância eletroquímica⁵⁵.

No entanto, vários trabalhos descritos na literatura não realizam o emprego de sensores eletroquímicos descartáveis (SEDs) o que pode ser uma desvantagem para um método com aplicação em diagnóstico de câncer, uma vez que as amostras biológicas requerem plataformas descartáveis e portáteis visando minimizar problemas de contaminação, reduzir o custo dos sensores e garantir portabilidade.

1.3 - Sensores eletroquímicos descartáveis (SEDs)

Os SEDs têm sido utilizados na detecção e determinação de vários tipos de analitos, tais como íons metálicos⁵⁶, compostos orgânicos⁵⁷, herbicidas⁵⁸, carboidratos⁵⁹, anticorpos⁶⁰, DNA⁶¹ e RNA⁶². Além de apresentarem como principal vantagem o fato de serem descartáveis, os SEDs apresentam ainda várias características atrativas tais como: baixo custo, baixo consumo de amostra (μL), fácil miniaturização, portabilidade, utilização em análises *point-of-care*⁶³, possibilidade de modificação com diversos compostos, medidas rápidas⁶⁴, simples utilização, fácil preparo e fabricação em grande escala⁶⁵. Assim, nota-se o quanto é atrativo utilizar SEDs em métodos eletroanalíticos e desenvolver novas técnicas de

fabricação desse tipo de sensor eletroquímico em virtude das suas inúmeras vantagens.

Os SEDs são normalmente fabricados empregando as técnicas de sputtering⁶⁶, impressão a jato de tinta⁶⁷ e serigrafia⁶⁸. Os materiais comumente empregados nestas técnicas para a fabricação dos eletrodos são metais^{69,70,66} e materiais a base de carbono^{71,72,73}. Os eletrodos podem ser fabricados em uma diversidade de substratos apresentando destaque para os sensores fabricados em materiais poliméricos⁷⁴ e a base de papel⁷⁵. O nosso grupo de pesquisa tem realizado um grande esforço no desenvolvimento de vários tipos de SEDs com diversas aplicações e formatos utilizando a técnica de serigrafia. A FIGURA 1 apresenta alguns tipos de SEDs desenvolvidos pelo grupo.

Na FIGURA 1-A (parte superior) é apresentado um SED fabricado em folhas de poliéster (transparências para impressora a laser) utilizando tinta condutora de carbono para confecção dos eletrodos de trabalho (WE, *do inglês Working Electrode*) e contra eletrodo (CE), e uma tinta de Ag/AgCl para a fabricação do pseudo-eletrodo de referência (RE, *do inglês Reference Electrode*). Na parte inferior da FIGURA 1-A, observa-se um SED constituído por um arranjo de oito sensores no mesmo dispositivo, todos com os WEs, CEs e REs devidamente separados e isolados com uma máscara de polaseal⁷⁴, ou seja, neste tipo de SED é possível utilizar oito células eletroquímicas simultaneamente obtendo oito réplicas em cada medida.

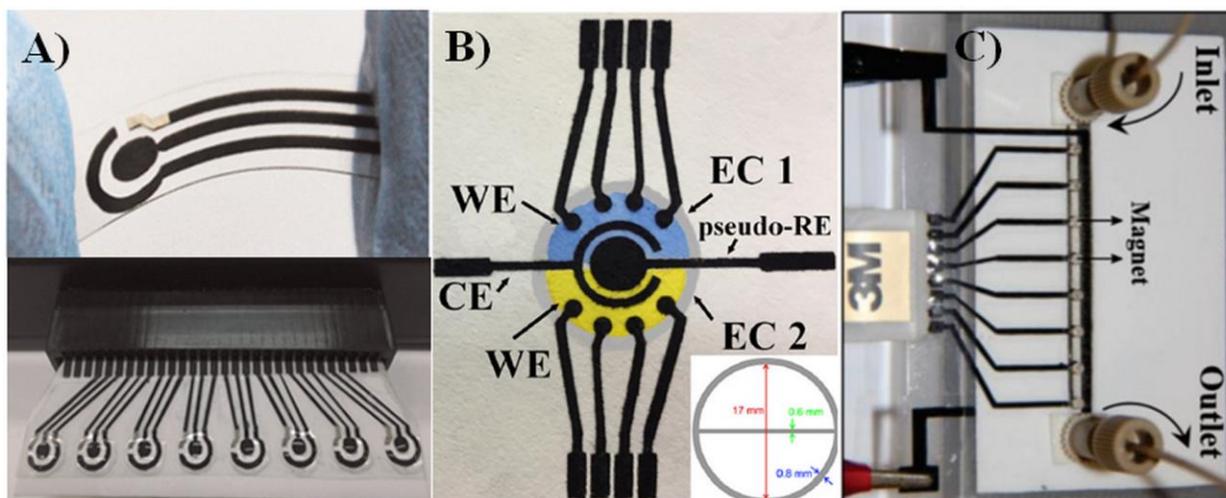


FIGURA 1 - A) Superior: SED fabricado em folhas de poliéster. Inferior: SED contendo um arranjo de oito células eletroquímicas, Fonte: Afonso *et al.*, 2016⁷⁴. B) SED fabricado em papel filtro, Fonte: de Oliveira *et al.*, 2019⁷⁵. C) μ SED magnético contendo um arranjo de oito WEs, Fonte: de Oliveira *et al.*, 2018⁷⁶.

A técnica de serigrafia também permite a fabricação de SEDs utilizando papel filtro como substrato (FIGURA 1-B) e parafina para a criação de barreiras hidrofóbicas de forma simples, rápida e com baixo custo. Este tipo de SED fabricado em papel é composto de duas células eletroquímicas cada uma com quatro WEs e sendo os CE e RE compartilhados com as duas células eletroquímicas possibilitando a quantificação simultânea de ácido ascórbico (AA), paracetamol (PAR) e cafeína (CAF) em amostras de formulações farmacêuticas de forma rápida, simples e com baixo custo⁷⁵.

Os autores realizaram as medidas eletroquímicas adicionando 5,0 μ L de eletrólito de suporte em cada célula eletroquímica do SED empregando a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) para as medidas do branco analítico. Posteriormente, foram adicionados 3,0 μ L da solução da amostra contendo AA em uma das células eletroquímicas (EC 1, ver FIGURA 1-B) e na outra célula eletroquímica (EC 2, ver FIGURA 1-B) adicionaram-se 3,0 μ L da solução da amostra contendo PAR e CAF e as medidas de SWV foram realizadas possibilitando a quantificação dos analitos por meio dos

sinais analíticos apresentados nos voltamogramas de SWV referentes aos picos de oxidação dos analitos.

Também é possível empregar materiais de baixo custo e a técnica de serigrafia para a fabricação de SEDs para aplicações em microfluídica (μ SEDs) conforme apresenta a (FIGURA 1-C). Neste trabalho, os autores desenvolveram um μ SED para a detecção de *Salmonella typhimurium* (*S. typhi*) em amostras de leite. A *S. typhi* foi capturada magneticamente e separada das amostras utilizando partículas magnéticas (PMs) modificadas com anticorpos monoclonais anti-Salmonella seguido pela adição de um anticorpo policlonal anti-Salmonella marcado com nanopartículas de ouro (AuNPs) formando um bioconjugado. Após a captura e marcação, o bioconjugado foi injetado no μ SED e capturado na superfície do WE, através de ímãs posicionados externamente atrás dos WEs. A detecção eletroquímica de *S. typhi* foi realizada indiretamente através da resposta eletroquímica do ouro oriunda das AuNPs medindo padrões e amostras simultaneamente no mesmo μ SED⁷⁶.

Diante disso, nota-se a versatilidade da utilização de SED para a detecção eletroquímica direta ou indireta de diversos analitos em diferentes tipos de amostras, o que torna bastante atrativo o emprego destes sensores para a detecção de miRNAs. Entretanto, para a análise de amostras que contém miRNAs é bastante importante o emprego de sensores com elevada sensibilidade e baixos limites de detecção (LD), tornando necessário a combinação dos SEDs com outros materiais, como por exemplo o emprego de PMs.

1.4 – Partículas Magnéticas (PMs) em métodos eletroanalíticos

As PMs são partículas normalmente formadas por óxido de ferro^{77,78,79}, as quais podem apresentar estruturas na forma de magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$)⁸⁰ com tamanhos que variam da escala nanométrica à micrométrica⁸¹. As PMs têm sido amplamente empregadas em vários métodos eletroanalíticos pois elas possibilitam a captura e separação de inúmeras biomoléculas em solução tais como: proteínas e peptídeos⁸², ácidos nucleicos (como por exemplo RNA e DNA)⁸³, células⁸⁴ e oligonucleotídeos⁸⁵. Além disso, as PMs também podem ser empregadas para imobilização de polímeros e compostos contendo grupos funcionais como tosil, amino, carboxílicos, aldeído, epóxido e éster NHS (N-Hidroxisuccinimida)⁸⁶.

A FIGURA 2 ilustra a diversidade de moléculas que podem ser imobilizadas na superfície de PMs. As PMs também possuem várias características atrativas, como por exemplo a elevada capacidade para a pré-concentração de analitos, separação, lavagem, marcação e amplificação de sinal⁸⁷. As PMs possibilitam a captura do analito presente na amostra e através do uso de separadores magnéticos é possível separar as PMs com o analito do sobrenadante, permitindo ressuspender as PMs para uma nova suspensão contendo um volume final menor de solução do que a solução inicial da amostra, permitindo a pré-concentração do analito de forma bastante eficiente.

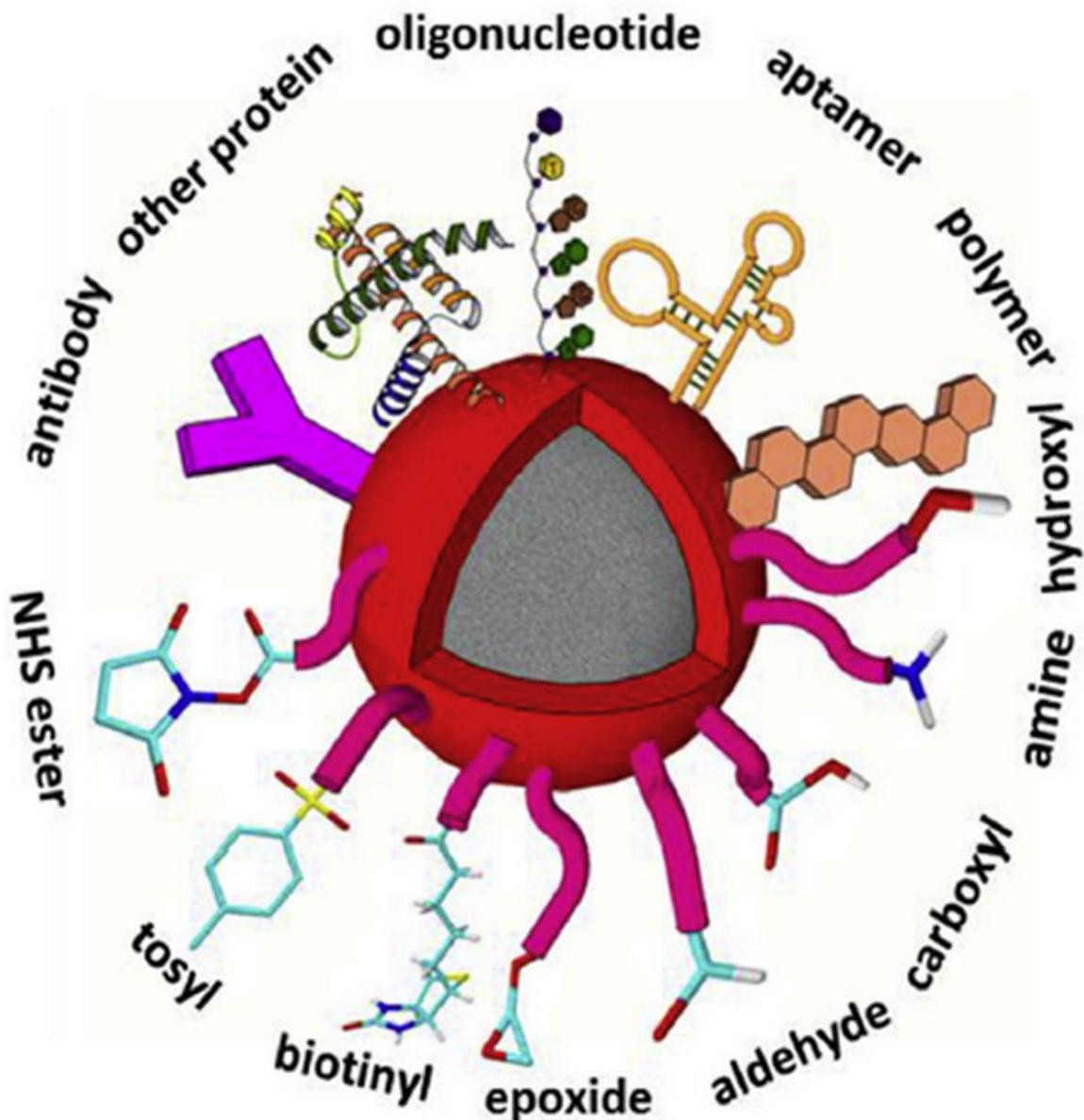


FIGURA 2 - Representação esquemática da diversidade de moléculas que podem ser ancoradas na superfície de PMs. Fonte: KUDR, Jiri *et al.*, 2018⁸⁶.

Estas características são de extrema importância nos métodos eletroanalíticos, pois além de minimizar problemas de interferência essas propriedades também possibilitam a melhora na sensibilidade e a obtenção de baixos valores de LD podendo alcançar valores na ordem de amol L^{-1} ,⁸⁸ uma vez que as PMs conjugadas com biomoléculas podem ser utilizadas para pré-concentrar o analitos que se encontram diluídos nas amostras possibilitando a ressuspensão das

PMs em um volume menor do que o da solução de origem. Além disso, o processo de lavagem é de suma importância para a eliminação de interferentes evitando a formação de ligações não específicas com outras biomoléculas presentes no meio^{89,90}.

Portanto, as PMs têm sido amplamente utilizadas no desenvolvimento de vários métodos eletroanalíticos a fim de realizar a detecção e quantificação de miRNAs em amostras biológicas. No trabalho de Z. Wang *et al.*⁹¹, os autores desenvolveram um biossensor eletroquímico para a detecção ultrasensível ($LD = 0,22 \text{ amol L}^{-1}$, $2,2 \times 10^{-19} \text{ mol L}^{-1}$) e específica do miRNA hsa-miR-200a em amostras de saliva utilizando PM modificadas com sondas de captura e um eletrodo de ouro magnético visando o diagnóstico de câncer de boca com faixa linear de 1 amol L^{-1} a 10 fmol L^{-1} . A FIGURA 3 apresenta as etapas envolvidas na construção do biossensor e o procedimento analítico para a detecção do miRNA nas amostras de saliva. Os autores utilizaram uma sonda de captura (C_p , Capture probe) funcionalizada com biotina para ser imobilizada na superfície das PM modificadas com estreptavidina e uma segunda sonda (S_p , signal probe) também biotinizada conforme pode ser observado na FIGURA 3.

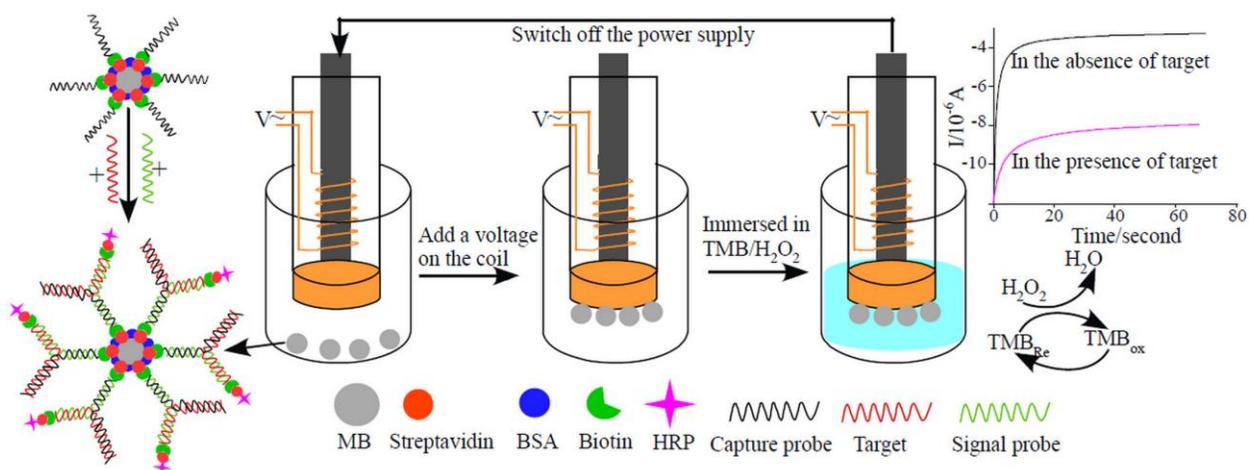


FIGURA 3 - Representação esquemática do biossensor eletroquímico magnético para a detecção de miRNA. Fonte: Z. Wang *et al.*, 2013⁹¹.

Na ausência do miRNA alvo (T, target) presente nas amostras de saliva as duas sondas não estão hibridizadas. No entanto, na presença do T, a C_p pode ser hibridizada com o T e a S_p formando uma estrutura ternária na forma de “Y” na superfície das MBs (do inglês, *Magnetic Beads*). Este bioconjugado formado pode então ser capturado pela streptavidina contendo a enzima HRP (do inglês, *horseradish peroxidase*) através da S_p biotinilada resultando na formação de MBs (PMs) marcadas com HRP (MBs-HRP), as quais podem catalisar efetivamente a oxidação da 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) mediada por H_2O_2 . As MBs-HRP foram atraídas para a superfície do WE por meio de um campo magnético eletrogerado possibilitando a realização das medidas eletroquímicas através da imersão do WE em uma solução de TMB contendo H_2O_2 , a HRP presente nas MBs catalisa a oxidação do TMB (TMB_{ox}) resultando em um aumento da corrente conforme pode ser observado na FIGURA 3 referente a redução do TMB_{ox} .

Assim, nota-se a relevância de utilizar PMs em métodos eletroanalíticos para a detecção de biomoléculas em virtude das diversas vantagens que este material proporciona ao método, sobretudo os baixos valores de LD e a possibilidade de realizar etapas de lavagens minimizando problemas provocados por interferentes nas medidas eletroquímicas. Entretanto, além da utilização de PMs em alguns casos também é necessário a utilização de outros materiais para o desenvolvimento dos métodos eletroanalíticos, como por exemplo a utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs).

1.5 - AuNPs para detecção eletroquímica de biomoléculas

As AuNPs tem sido amplamente empregadas tanto como marcadores eletroquímicos quanto para imobilização de vários tipos de biomoléculas tais como anticorpos⁹², bactérias⁹³, células cancerígenas⁹⁴, proteínas⁹⁵, DNA⁹⁶ e miRNA⁹⁷, visando o diagnóstico e prevenção de doenças, a ampla utilização das AuNPs nesses métodos eletroanalíticos pode ser justificada pela sua compatibilidade com as biomoléculas⁹⁸. Assim, nota-se a diversidade de biomoléculas que podem ser imobilizadas na superfície das AuNPs tornando viável a sua aplicação no desenvolvimento de vários métodos eletroanalíticos.

As AuNPs podem ser modificadas com finas camadas orgânicas através da sua funcionalização com diversos grupos funcionais, como, grupos carboxílicos⁹⁸, permitindo a imobilização de biomoléculas (por exemplo anticorpos) covalentemente ou através de interações eletrostáticas⁹⁹. Além disso, as AuNPs também podem ser empregadas para a imobilização de sequências de DNA^{100,101,102}. Portanto, as AuNPs têm sido aplicadas em diversos tipos de sensores eletroquímicos para a detecção e quantificação de miRNAs em vários tipos de amostras biológicas visando o diagnóstico de doenças como câncer⁵⁵.

Diante disso, H. Yin *et al.*¹⁰³ propuseram um biossensor amperométrico para a detecção do miRNA-21 empregando AuNPs e um GCE (do inglês, *Glassy Carbon Electrode*) modificado com nanofolhas de grafeno com o intuito de realizar o diagnóstico de câncer de fígado, as etapas envolvidas na construção do biossensor são apresentadas na FIGURA 4. Neste trabalho, inicialmente as AuNPs foram modificadas com um LNA (do inglês, *Locked Nucleic Acid*) e uma sequência de DNA biotinizada. Paralelamente, o GCE foi modificado com grafeno e uma sonda de MB (do inglês, *Hairpin Molecule Beacon*) possibilitando a hibridização com o miRNA. Em seguida, as AuNPs previamente modificadas com LNA e uma

sequência de DNA biotinizada foram adicionadas ao eletrodo e adicionou-se estreptavidina-HRP, a qual se ligou à biotina que estava localizada na região terminal da sonda de DNA biotinizada presente nas AuNPs.

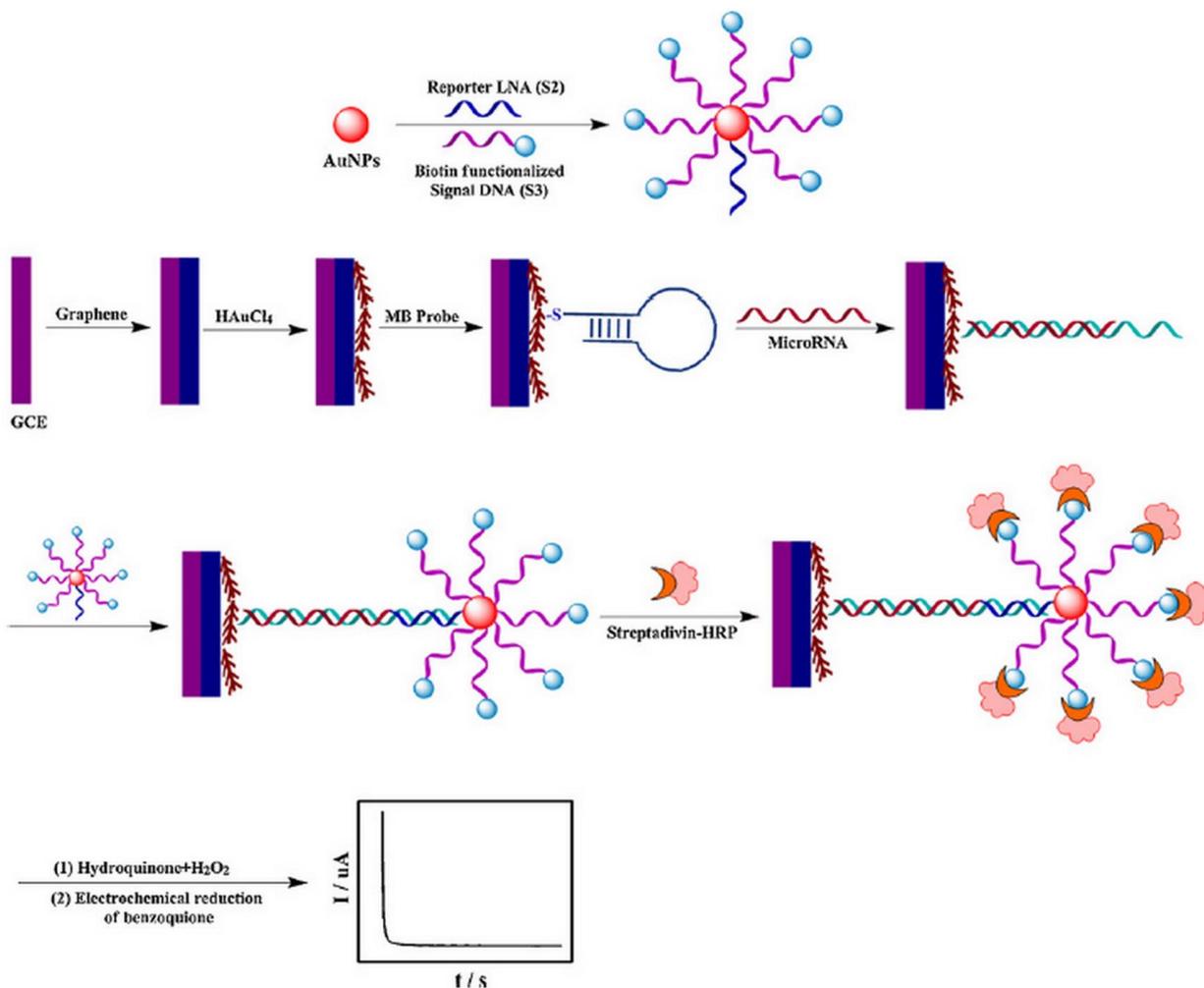


FIGURA 4 - Etapas de amplificação envolvidas na determinação cronoamperométrica de microRNA através de ensaios de hibridização. Fonte: H. Yin *et al.*, 2012¹⁰³.

Assim, a detecção eletroquímica foi realizada utilizando uma solução mista de hidroquinona e H₂O₂ através da redução da benzoquinona que gerou uma resposta de corrente em função do tempo. Este biossensor apresentou uma excelente seletividade e elevada sensibilidade com LD igual a 0,06 pmol L⁻¹, o qual

foi aplicado com sucesso na detecção do miRNA-21 em amostras de células de pacientes saudáveis e portadores de câncer de fígado.

J. Zhang e X. Hun¹⁰⁴ desenvolveram um biossensor eletroquímico para a detecção do miRNA-155 utilizando WEs modificados com nanofolhas de carbeto de molibdênio (Mo_2C), AuNPs e sondas de DNA *hairpin* conforme é apresentado na FIGURA 5. A FIGURA 5-a é ilustrado o eletrodo de carbono vítreo sem modificação, modificado com AuNPs (FIGURA 5-b), após a modificação com Mo_2C (FIGURA 5-c) e com AuNPs e Mo_2C (FIGURA 5-d).

O processo de modificação do WE foi realizado através da eletrodeposição de ouro coloidal sobre um eletrodo de carbono vítreo modificado com Mo_2C (FIGURA 5-d) seguido da adição de uma sonda de DNA *hairpin* com grupos tióis (H1). Posteriormente, foi realizada a incubação do biossensor com o biomarcador miRNA-155 e outra sequência de DNA *hairpin* marcada com ferroceno carboxílico (H2-Fc) (FIGURA 5-f) e realizaram-se as medidas eletroquímicas utilizando a técnica de DPV (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*).

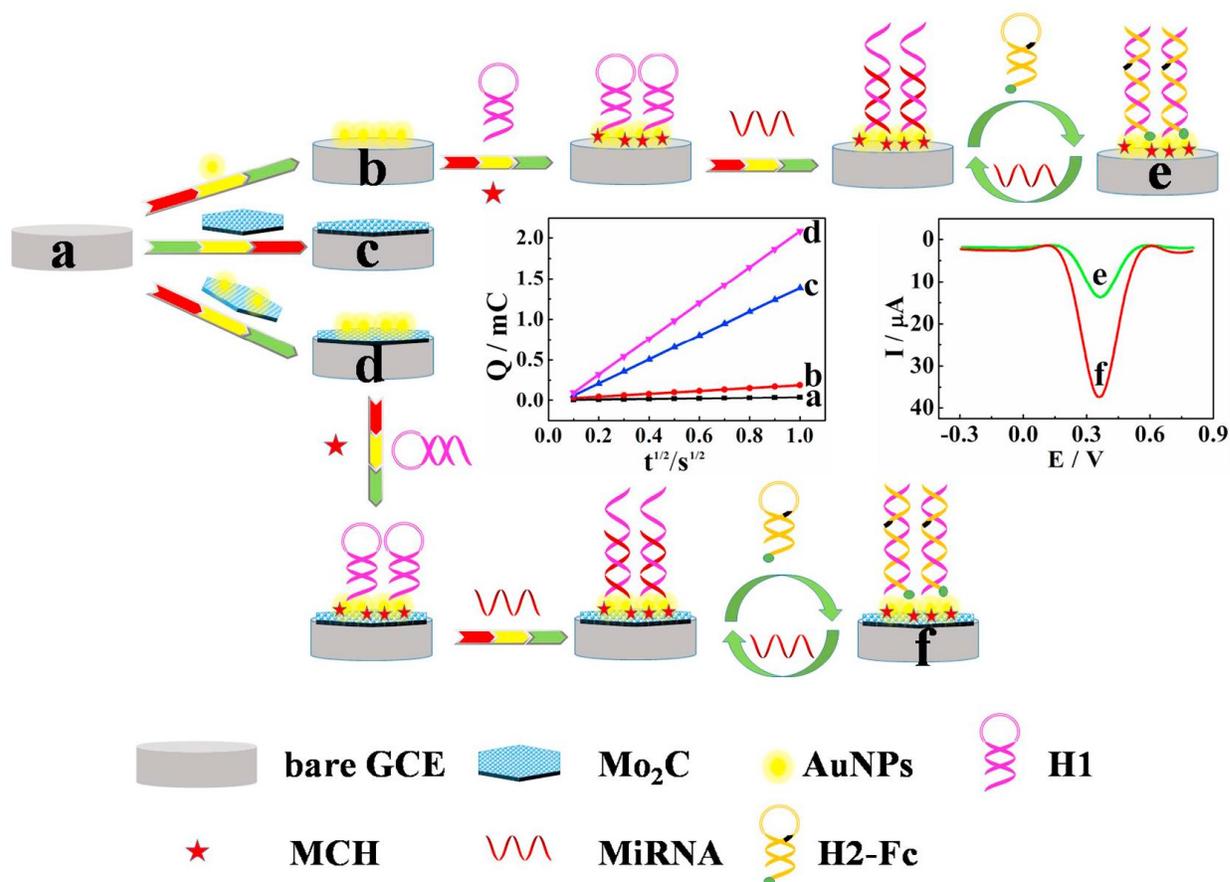


FIGURA 5 - Ilustração esquemática das etapas envolvidas na fabricação do biossensor eletroquímico para detecção de miRNA-155 em amostras de soro humano. Fonte: J. Zhang and X. Hun, 2019¹⁰⁴.

A resposta eletroquímica teve um aumento linear com o aumento da concentração do miRNA-155 em um intervalo de concentração de $0,1 \text{ fmol L}^{-1}$ a $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$, o valor de LD obtido foi de $0,033 \text{ fmol L}^{-1}$. O método eletroanalítico foi empregado para a quantificação do miRNA-155 em amostras de soro humano, apresentando resultados satisfatórios na análise das amostras. O método para a detecção de miRNA-155 apresenta um valor de LD significativamente baixo para a detecção deste biomarcador em amostra de soro humano. Contudo, este método apresenta a mesma limitação dos métodos previamente citados, ou seja, a utilização de um sensor não descartável. Além disso, o preparo do Mo₂C envolve a utilização de uma grande quantidade de solvente orgânico (dimetilformamida), o que pode

gerar uma grande quantidade de resíduos durante a realização das análises das amostras.

Portanto, o desenvolvimento de novos métodos eletroanalíticos baseados no uso de SEDs, com baixos valores de LD, pouca geração de resíduos e que sejam portáteis a fim de que seja possível a realização de análises *point-of-care* e consequentemente um diagnóstico rápido, preciso e de baixo custo é altamente desejável.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2 - OBJETIVO

2.1- Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um método eletroanalítico utilizando sensores eletroquímicos descartáveis (SEDs) para a detecção do biomarcador miRNA-203 em amostras de linhagens de células e linfonodos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP) visando o diagnóstico da doença.

2.2- Objetivos específicos

Desenvolver SEDs e μ SEDs utilizando a técnica de serigrafia e materiais descartáveis de baixo custo;

Sintetizar AuNPs estabilizadas com grupos citrato (AuNPs) e funcionalizadas com glutathione (AuNPs-GSH) e realizar a bioconjugação com sondas de DNA.

Avaliar as condições experimentais para captura do biomarcador miRNA-203 utilizando sondas de DNA, PM e AuNPs;

Caracterizar os SEDs e μ SEDs e os bioconjugados formados antes e após a captura do miRNA-203;

Aplicar o método eletroanalítico na determinação de miRNA-203 em amostras de RNA total extraído de linhagens celulares e de linfonodos obtidas de indivíduos saudáveis e portadores de CCP.

Verificar os resultados encontrados na quantificação de miRNA-203 com o método de RT-PCR.

CAPÍTULO 3: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 - Reagentes e soluções

Os reagentes, todos de grau analítico, utilizados foram: ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES), ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado (99,9%), citrato trissódico, albumina de soro bovino (BSA, do inglês, *bovine serum albumin*), poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA, do inglês, *poly(diallyldimethylammonium) chloride*), ((N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), L-glutationa reduzida (GSH), ácido ferroceno monocarboxílico, enzima horseradish peroxidase (HRP), N-hidroxisuccinimida (NHS), Tween 20 (TW20), peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 30%) e hidroquinona (HQ) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio dibásico, cloreto de potássio, cloreto de sódio, ácido nítrico, ácido clorídrico, metanol e hidróxido de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

A solução aquosa de tampão borato 0,05 mol L⁻¹ (pH 9,0) foi preparada utilizando ácido bórico e cloreto de potássio ambos 0,05 mol L⁻¹. O Tampão HEPES 10,0 mmol L⁻¹ pH 7,0 foi preparado contendo NaCl 100,0 mmol L⁻¹, KCl 25,0 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 10,0 mmol L⁻¹. O tampão fosfato salino (PBS) 10,0 mmol L⁻¹ foi preparado com Na₂HPO₄ 10,0 mmol L⁻¹, KH₂PO₄ 1,8 mmol L⁻¹, KCl 2,7 mmol L⁻¹ e NaCl 137,0 mmol L⁻¹. O pH de todas as soluções tampão foi ajustado utilizando soluções diluídas de HCl ou NaOH. A solução tampão PBS contendo TW20 0,05 % (m/v) (PBS-TW20) foi preparada diluindo o TW20 em solução de PBS. A solução de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L⁻¹ pH = 8,0 foi preparada em uma solução aquosa de KCl 0,5 mol L⁻¹.

Todas as sondas de DNA foram obtidas da IDT Síntese Biotecnologia (Belo Horizonte, MG, Brasil), foram utilizadas as sondas de DNA: de captura (DNA_{Sc}), detecção (DNA_{Sd}) e controle positivo (DNA_{Cp}).

A TABELA 1 apresenta as sequências de bases nitrogenadas de cada sonda de DNA utilizada.

TABELA 1 - Sequências de bases nitrogenadas das sondas de DNA utilizadas no desenvolvimento do método eletroanalítico.

Nome	Sequência
DNA_{Sc}	5'-NH ₂ -GACCGCTAGTGGTCCTAAACATTTTTCACAACATGATACGGTC-3'
DNA_{Sd}	5'-NH ₂ -GACCGTATCATGTT-3'
DNA_{Cp}	5'-GTGAAATGTTTAGGACCACTAG-3'

As soluções contendo DNA e BSA foram todas preparadas em PBS 10,0 mmol L⁻¹, ao passo que as soluções de EDC e NHS foram preparadas em tampão MES 50,0 mmol L⁻¹ pH 5,6 imediatamente antes da utilização. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q (Millipore, Bedford, USA) com resistividade não inferior a 18,2 MΩ cm.

3.2 - Materiais e instrumentação

Todos os materiais empregados na fabricação de SEDs, como adesivo vinílico, folha de poliéster (folha de transparência para impressoras a laser), cartão adesivo dupla face e polaseal (plástico para plastificação) foram adquiridos em lojas locais. As tintas de carbono (C2030519P4) e Ag/AgCl (C2130905D3) foram obtidas da Gwent Electronic Materials Co., Ltd., Reino Unido. As partículas magnéticas (MPs) funcionalizadas com grupos carboxílicos (concentração de

partículas: 20 mg mL⁻¹) foram adquiridas da Polysciences, Inc. (Nº de produto 86011-10, Warrington, PA, EUA).

Todos os estudos eletroquímicos foram realizados utilizando o multipotenciostato Dropsens modelo μ Stat 8000 (Astúrias, Espanha) conectado a um computador gerenciado pelo software DropView 8000, os voltamogramas de onda quadrada (SWV) obtidos foram corrigidos pela linha de base empregando o mesmo software. As medidas de SWV foram realizadas em uma faixa de potencial de +1,10 a -0,15 V, *vs.* tinta Ag / AgCl, com uma frequência (f) aplicada de 30 Hz, amplitude (a) e incremento de potencial (ΔE_s) iguais a 40 e 4 mV, respectivamente. No sistema microfluídico empregaram-se uma bomba de seringa (New Era Pumping System NE-1000, USA) e uma válvula cromatográfica manual (Rheodyne 9725i, Thermo Scientific, USA). Todos os ensaios de hibridização foram realizados utilizando um termo-shaker para microtubos da marca Boeco, modelo TS 100 (Hamburgo, Alemanha).

O pH de todas as soluções foi ajustado empregando um pHmetro Digimed DM20 (Digimed, Brasil). As medidas espectrofotométricas das AuNPs foram realizadas empregando um espectrofotômetro Shimadzu modelo 2550, acoplado a um microcomputador. As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das AuNPs foram obtidas utilizando um microscópio de emissão de campo FEI Inspect F50 (FE-SEM). As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e análise de Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) foram obtidas com um microscópio eletrônico de transmissão JEOL, operando a 200 kV.

Para a fabricação dos SEDs foi empregada uma impressora de recorte Silhouette™ modelo Cameo (Silhouette, Brasil) gerenciada pelo software Silhouette Studio v. 3.8, a qual permitiu desenhar e cortar os adesivos vinílicos e polaseal nos formatos desejados. Os μ SEDs foram fabricados utilizando um plotter

de recorte (F1 Suprimentos, Brasil) para o recorte do cartão adesivo dupla face além da utilização de um plotter de recorte Silhouette para o recorte dos demais materiais utilizados na construção dos sensores.

3.3- Síntese das AuNPs decoradas com glutaniona

No desenvolvimento do método eletroanalítico empregaram-se dois tipos de AuNPs, AuNPs estabilizadas com citrato (descritas como AuNPs) e funcionalizadas com glutatona (AuNPs-GSH). A síntese das AuNPs-GSH foi realizada de acordo com o procedimento desenvolvido por Zheng e Huang⁹⁸. Para isso, 79,0 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 30,8 mg de glutatona foram pesadas. Posteriormente, 2,0 mL de ácido acético concentrado e 12,0 mL de metanol foram adicionados à mistura e uma solução de NaBH_4 foi preparada diluindo 120,0 mg de NaBH_4 em 6,0 mL de água ultrapura, a qual foi adicionada lentamente à solução anterior sob rápida agitação durante 2 h. Na FIGURA 6 é apresentado a formação das AuNPs-GSH.

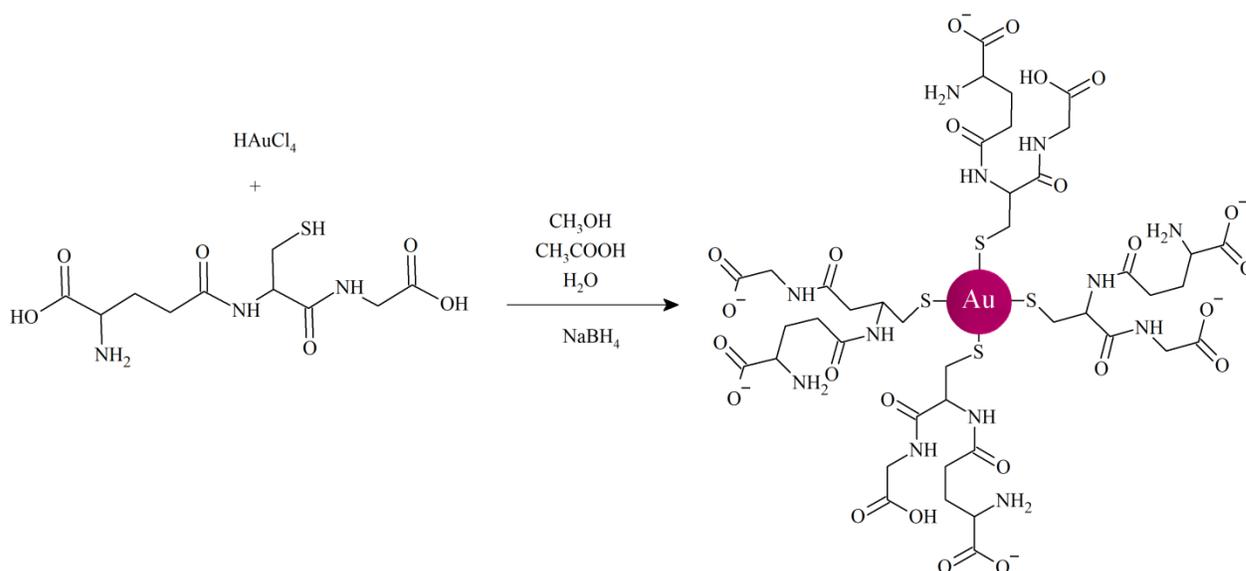


FIGURA 6 - Síntese das AuNPs decoradas com glutatona (AuNPs-GSH).

A suspensão foi filtrada com uma membrana de filtração molecular de 50 kDa (previamente lavada com uma solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹) e realizou-se a centrifugação a 3500 rpm. As AuNPs-GSH formadas foram lavadas quatro vezes com água ultrapura e ressuspensando as mesmas em 15 mL de uma solução aquosa de tampão HEPES 20,0 mmol L⁻¹ (pH = 8,0). Posteriormente, as AuNPs-GSH foram armazenadas a 4 °C e protegidas da luz.

3.4 - Síntese das AuNPs estabilizadas com citrato

As AuNPs estabilizadas com citrato foram sintetizadas conforme procedimento proposto por J. TURKEVICH *et al.*¹⁰⁵, em que o citrato tem a função de agente redutor, estabilizante, além de fornecer carga negativa para a superfície das AuNPs prevenindo a aglomeração de partículas¹⁰⁶. Inicialmente, um volume de 200 mL de HAuCl₄.3H₂O 0,01 % m/v preparado em água ultrapura foi aquecido sob agitação vigorosa até a solução entrar em ebulição (FIGURA 7-A).

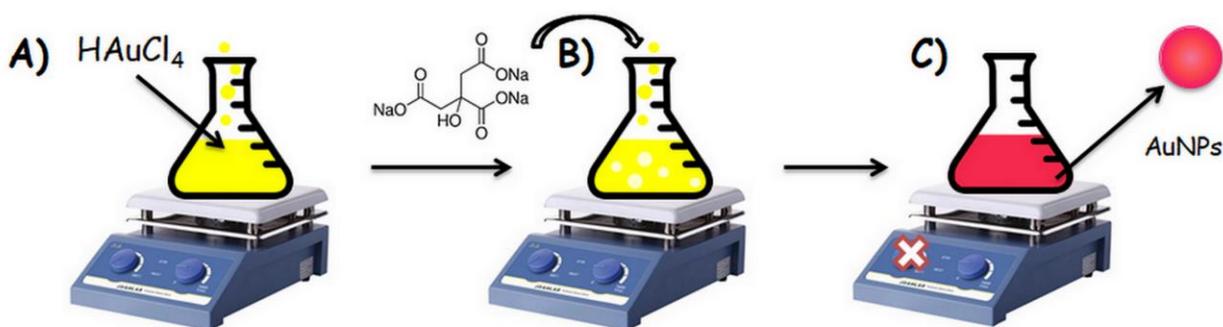


FIGURA 7 - Etapas envolvidas na síntese das AuNPs: A) Aquecimento sob agitação até ebulição. B) Adição da solução de citrato de sódio. C) Interrupção do aquecimento e formação das AuNPs.

Posteriormente, 5,0 mL de uma solução de citrato de sódio 40,0 mmol L⁻¹ foram adicionados rapidamente à solução (FIGURA 7-B) e a

mistura foi agitada até apresentar uma coloração vermelho pálido (FIGURA 7-C). A agitação foi realizada sem aquecimento até a suspensão atingir a temperatura ambiente. Todas as AuNPs sintetizadas foram protegidas da luz e armazenadas a uma temperatura de 4 °C.

3.4.1 - Bioconjugação das AuNPs com DNA_{Sd}

Inicialmente, 150,0 µL de uma solução de DNA sonda de detecção (DNA_{Sd}) 3,0 µmol L⁻¹ preparada em tampão HEPES 10,0 mmol L⁻¹ pH 7,0 foram adicionados em 850,0 µL de uma suspensão de AuNPs estabilizadas com citrato pH 9,0 (ajustado com uma solução aquosa de tampão borato 50,0 mmol L⁻¹) (FIGURA 8-A e 8-B) a fim de realizar a desprotonação do citrato e estabilização de mais cargas negativas na superfície das AuNPs¹⁰⁶.

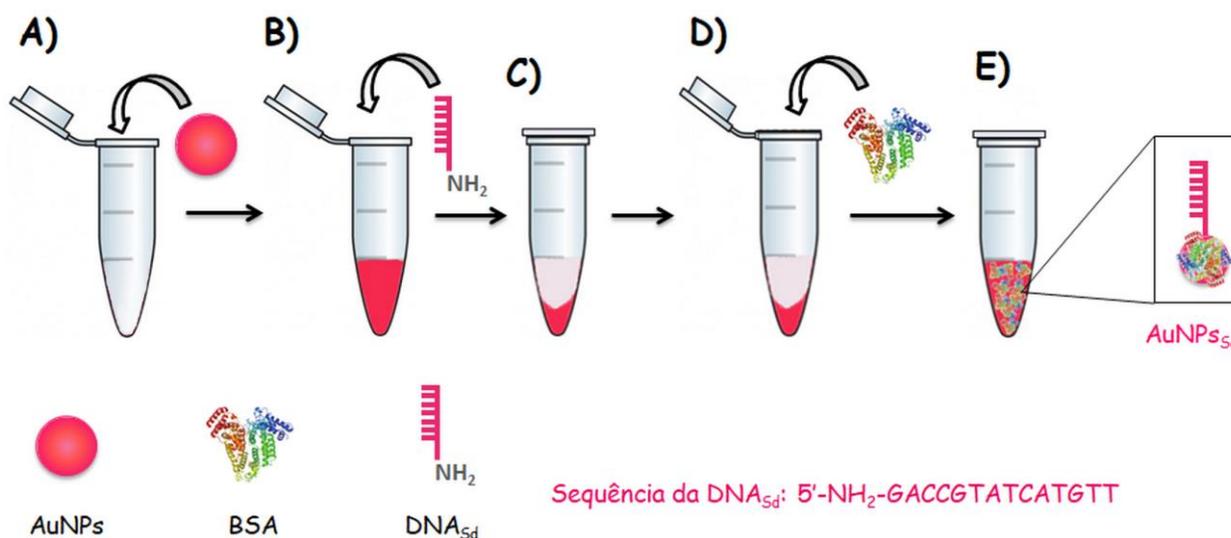


FIGURA 8 - Etapas envolvidas na formação das AuNPs_{Sd}. A) AuNPs. B) Adição da DNA_{Sd}. C) Centrifugação das AuNPs_{Sd}. D) Adição de BSA. E) AuNPs_{Sd} finalizada.

Em seguida, a dispersão foi mantida sob agitação suave durante 18 h a fim de obter as AuNPs bioconjugadas com a DNA_{Sd} (AuNPs_{Sd}) através da interação

eletrostática entre os grupos NH_2 oriundos do espaçador 5AmMC6¹⁰⁷ presentes na região terminal da DNA_{sd} (carga positiva) e as AuNPs (carga negativa)¹⁰¹. Em seguida, a dispersão AuNPs_{sd} foi centrifugada por 20 min a 14.000 rpm (FIGURA 8-C), o sobrenadante foi removido e adicionou-se, para lavagem, 1,0 mL de PBS 10,0 mmol L^{-1} pH 7,0 às AuNPs_{sd} agitando a mistura em um vórtex durante 1 min (esta etapa foi repetida duas vezes). Posteriormente, 100,0 μL de uma solução de BSA 5% foram adicionados à solução AuNPs_{sd} e esta solução foi agitada por 30 min a 800 rpm em thermo-shaker. A FIGURA 8 apresenta a ilustração de todas as etapas envolvidas na formação das AuNPs_{sd} .

Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação e lavagem com 1,0 ml de PBS 10,0 mmol L^{-1} pH 7,0 por mais duas vezes. Enfim, as AuNPs_{sd} foram ressuspensas em 1,1 mL de PBS 10,0 mmol L^{-1} pH 7,0 e realizou-se a agitação em vórtex por 5 min. Após todo o procedimento de bioconjugação, todas as AuNPs_{sd} foram armazenadas a 4 °C e protegidas da luz.

3.5 - Modificação das partículas magnéticas (PMs) com a sonda de DNA de captura (DNA_{sc})

As PMs (20,0 mg mL^{-1}) foram agitadas em banho ultrassônico durante 10 min e um volume igual a 98,0 μL da suspensão foi retirado realizando a separação magnética das PMs durante 5 min (veja a FIGURA 9-B) utilizando um separador magnético. O sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 0,6 mL de uma solução tampão MES 50,0 mmol L^{-1} pH 5,2. Esta suspensão foi submetida à agitação em vórtex e as PMs foram separadas magneticamente por mais 5 min e o sobrenadante foi removido sendo esta etapa repetida mais duas vezes.

Em seguida, 1,0 mL de uma solução de EDC 3,2 mg mL⁻¹ diluído em tampão MES 50,0 mmol L⁻¹ pH 5,2 foi adicionado às MPs mantendo-as sob agitação suave durante 30 min à temperatura ambiente (FIGURA 9-D). A suspensão foi separada magneticamente, o sobrenadante foi removido e 0,6 mL de tampão MES 50,0 mmol L⁻¹ pH 5,2 foram adicionados e realizou-se a agitação em vórtex por 5 s sendo esta etapa repetida mais uma vez. O EDC tem a função de ativar os grupos carboxila presentes na superfície das PMs resultando na formação de um intermediário *o*-aciluréia instável e bastante reativo¹⁰⁸ conforme apresentado na FIGURA 9-E.

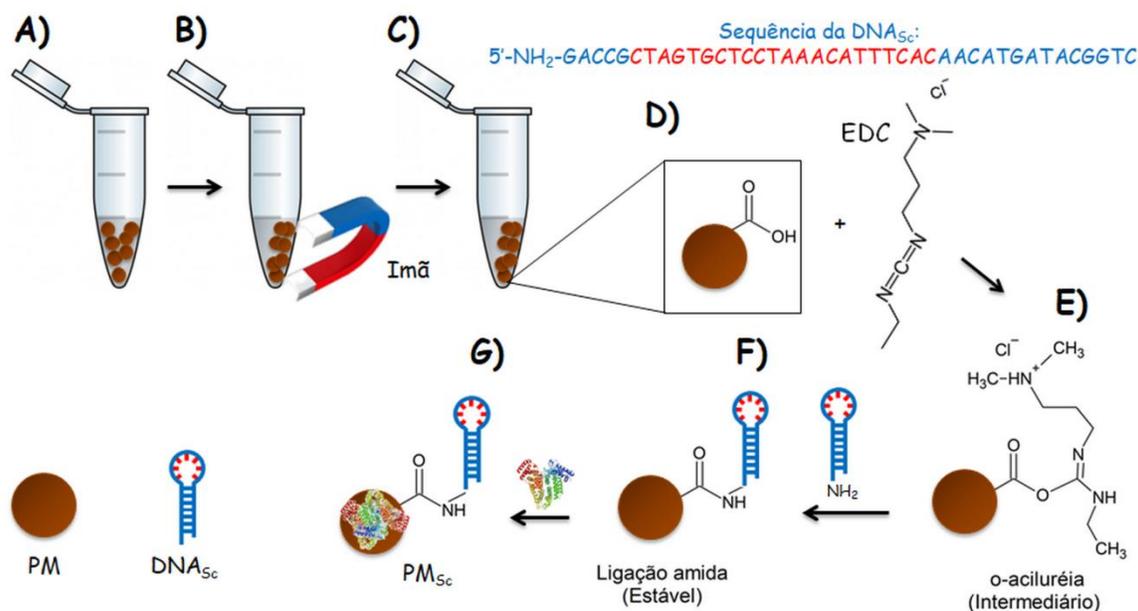


FIGURA 9 - Representação esquemática das etapas envolvidas na formação das PM_{Sc}. A) Suspensão de PMs. B) Separação magnética. C) PMs separadas. D) Adição de EDC às PMs. E) Formação do intermediário *o*-aciluréia na superfície das PMs. F) Adição da sonda de DNA_{Sc}. G) Adição de BSA às PM_{Sc}.

A suspensão de PMs foi separada magneticamente, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 10,0 µL de uma solução de DNA_{Sc} 3,0 µmol L⁻¹ e 990,0 µL de PBS 10,0 mmol L⁻¹ pH 7,0 (FIGURA 9-F). Esta mistura foi mantida sob agitação suave através de um agitador de tubos rotativo (fabricação do grupo de

pesquisa) durante 24 h a fim de obter a suspensão de PMs bioconjugadas com a DNA_{Sc} (PM_{Sc}). A sonda de DNA_{Sc} contém grupos NH₂ na região terminal da sequência o que torna possível a reação de amidização¹⁰⁸ entre o intermediário *o*-aciluréia e a DNA_{Sc} ancorando a DNA_{Sc} na superfície das PMs resultando na formação das PM_{Sc} conforme apresentado na FIGURA 9-F.

Posteriormente, as PM_{Sc} foram lavadas utilizando 0,6 mL de PBS-TW20 e foram realizadas quatro lavagens com 0,6 mL de PBS-TW20-BSA (FIGURA 9-G). As PM_{Sc} formadas foram ressuspensas em 1,0 mL de glicina 1,0 mol L⁻¹ pH 8,0 e realizou-se a agitação da mistura durante 30 min com o objetivo de evitar ligações não específicas através do bloqueio dos sítios de ligação livres (FIGURA 9-G). A suspensão de PM_{Sc} foi lavada três vezes com a solução de PBS-TW20-BSA e ressuspensas em 1,0 mL de PBS-TW20-BSA. A FIGURA 10, apresenta o separador magnético empregado na lavagem das PMs e dos bioconjugados formados.

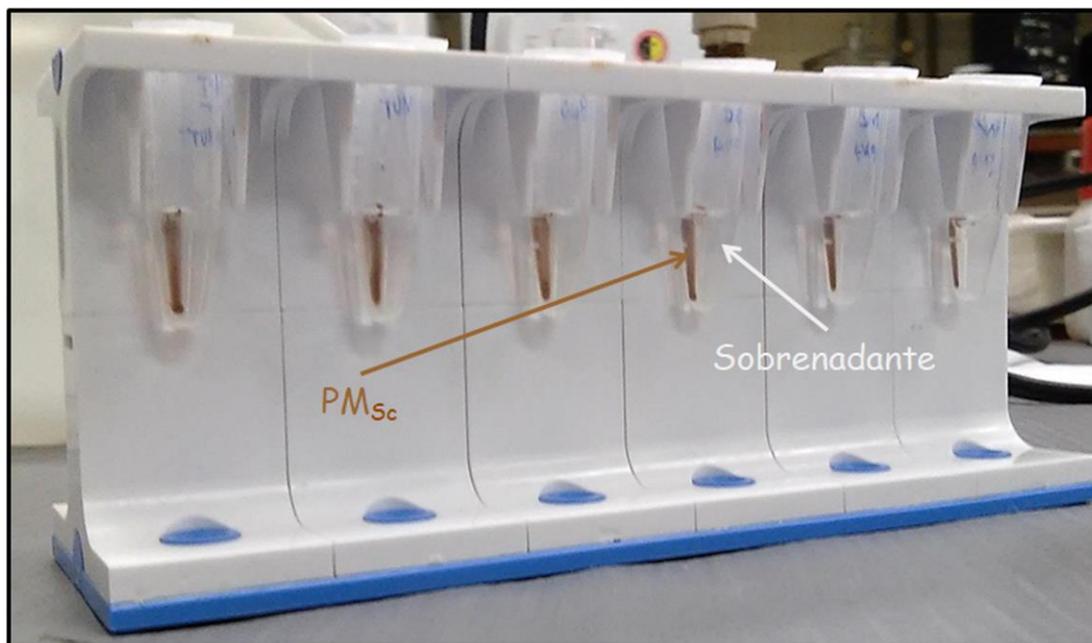


FIGURA 10 - Fotografia do separador magnético utilizado na bioconjugação das PMs com a DNA_{Sc}.

Após a finalização do procedimento de bioconjugação das PMs com a DNA_{Sc}, as PM_{Sc} foram armazenadas a 4 °C e protegidas da luz. Posteriormente, realizaram-se os ensaios de hibridização a fim de promover a captura e detecção do biomarcador miRNA-203.

3.5.1 - Ensaio de hibridização para a quantificação do miRNA-203 utilizando as AuNPs

Todos os ensaios de hibridização para a captura do miRNA-203 foram realizados utilizando uma solução padrão de DNA_{Cp} como controle positivo para o miRNA-203. A DNA_{Cp} possui a mesma sequência do miRNA-203 com exceção das bases uracila (U) que são substituídas por bases timina (T) o que não interfere no desenvolvimento do método de hibridização uma vez que a DNA_{Sc} foi projetada com as sequências de bases que se ligam tanto com a DNA_{Cp} quanto com o miRNA-203. Neste estudo, um volume de 10,0 µL contendo a dispersão de PM_{Sc} foi adicionado a 0,5 mL de uma solução contendo a DNA_{Cp} preparada em tampão HEPES 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 (contendo NaCl 100,0 mmol L⁻¹, KCl 25,0 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 10,0 mmol L⁻¹) e a mistura foi mantida sob agitação em thermo-shaker a 85 °C por um período de 15 min a 800 rpm conforme apresentado na FIGURA 11-A.

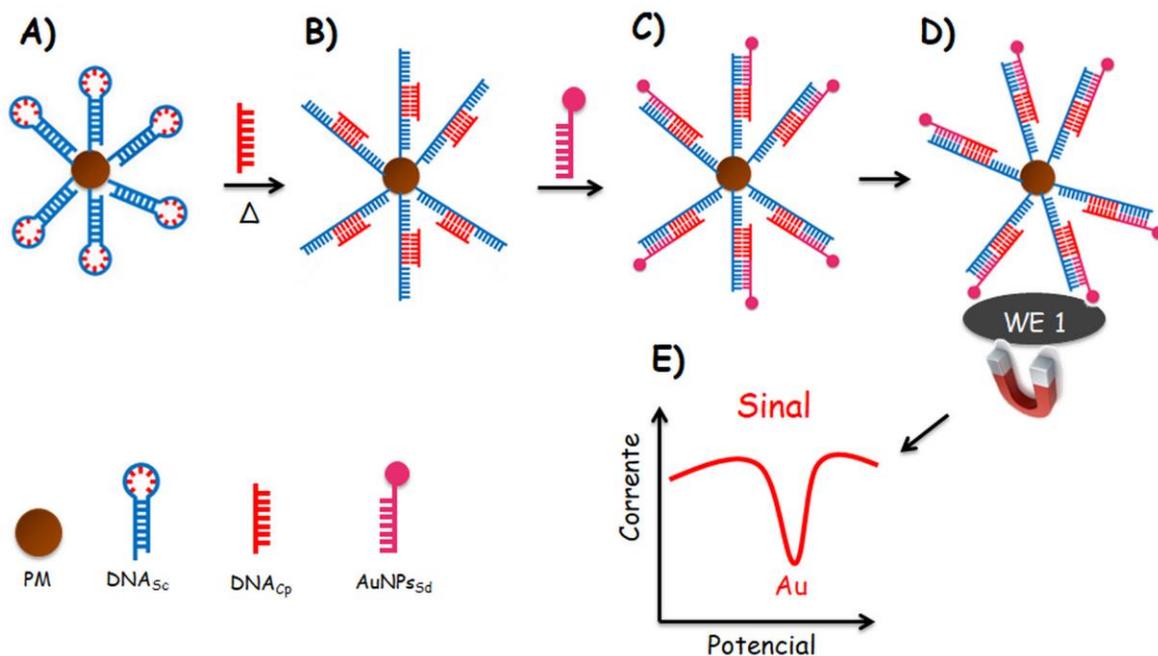


FIGURA 11 - Representação esquemática das etapas envolvidas na formação do bioconjugado. A) Hibridização das PM_{Sc} com a DNA_{Cp}. B) Formação das PM_{Sc}-DNA_{Cp} e C) PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNP_{Ssd}. D) Adição do PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNP_{Ssd} ao WE. E) Registro de sinal através da técnica de SWV.

Em seguida, a solução foi mantida sob agitação suave durante 1 h à temperatura ambiente a fim de realizar a formação do bioconjugado PM_{Sc}-DNA_{Cp} (FIGURA 11-B), seguida da separação magnética e lavagem com PBS 10,0 mmol L⁻¹ pH 7,0 por três vezes. Posteriormente, adicionaram-se 0,25 mL da dispersão contendo as AuNP_{Ssd} à dispersão do bioconjugado e a mistura foi agitada a 800 rpm durante 1 h. A dispersão formada contendo o bioconjugado PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNP_{Ssd} (FIGURA 11-C) foi lavada com a solução de PBS-TW20-BSA e em seguida com PBS pH 7,0.

Finalmente o bioconjugado foi ressuspensionado em 0,25 mL de PBS pH 7,0 e 10,0 µL deste bioconjugado foram adicionados ao WE do SED (FIGURA 11-D) para a realização das medidas eletroquímicas a fim de obter o sinal analítico oriundo da redução eletroquímica do Au através da técnica de SWV conforme é apresentado na FIGURA 11-E. A FIGURA 11-D ilustra a adição do

bioconjugado apenas em um dos WE (WE 1), contudo, o procedimento foi aplicado em todos os oito WEs do SED. Este procedimento foi utilizado para a realização de todas as medidas eletroquímicas utilizando as AuNPs como marcador eletroquímico a fim de promover a captura, detecção e quantificação de miRNA-203.

Além da detecção eletroquímica do biomarcador miRNA-203 utilizando as AuNPs, outra estratégia de detecção foi avaliada empregando a enzima HRP como marcador eletroquímico, a qual é apresentada na próxima Seção.

3.5.2 - Ensaio de hibridização para a quantificação do miRNA-203 utilizando a enzima HRP

Inicialmente, foram adicionados em microtubos 100,0 μL da solução estoque de PMs previamente agitadas em banho ultrassônico por 10 min. Posteriormente, elas foram lavadas com 200,0 μL de tampão MES 0,05 mol L^{-1} (pH 5,2) e separadas magneticamente durante 2 min e em seguida o sobrenadante foi descartado. Este procedimento foi repetido por três vezes. Na sequência foram adicionados aos microtubos contendo as PMs 100,0 μL do tampão MES 0,05 mol L^{-1} (pH 5,2) e 200,0 μL de uma solução de EDC utilizando a mesma solução tampão (FIGURA 12-A). A mistura foi agitada utilizando um agitador do tipo vortex durante 2 min e agitador giratório por 30 min a fim de ativar os grupos carboxilas (-COOH) presentes na superfície das PMs formando o intermediário *o*-aciluréia¹⁰⁸ conforme apresentado na (FIGURA 12-B). Posteriormente, as PMs foram separadas magneticamente e lavadas com tampão MES 0,05 mol/L pH 5,2 descartando o sobrenadante (este procedimento foi repetido duas vezes).

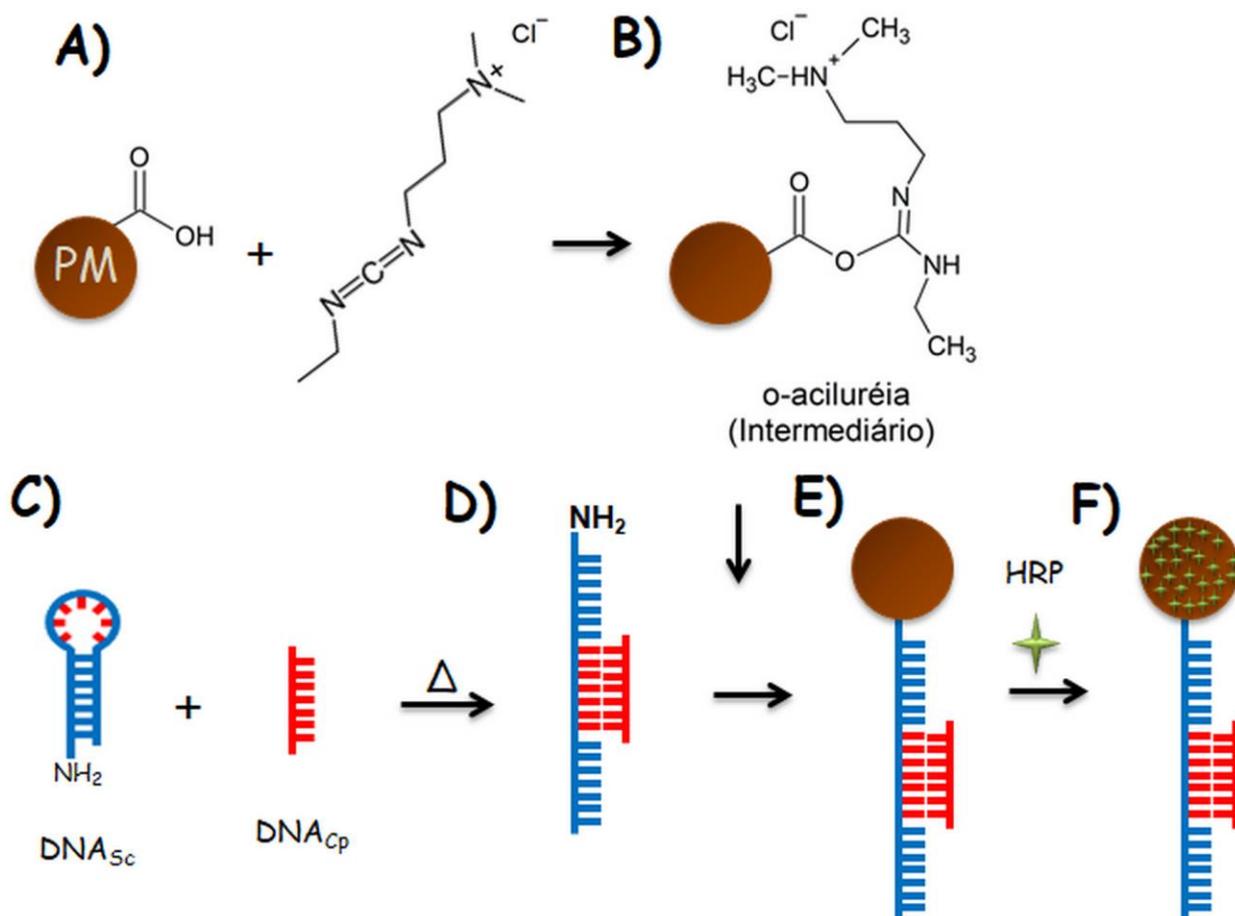


FIGURA 12 – Representação esquemática das etapas envolvidas na formação do bioconjugado $\text{PM}-\text{DNA}_{\text{Sc}}-\text{DNA}_{\text{Cp}}-\text{HRP}$. A) Adição de EDC às PMs. B) Formação do intermediário o-aciluréia na superfície das PMs. C) Hibridização da DNA_{Sc} com o DNA_{Cp} . D) Formação da $\text{DNA}_{\text{Sc}}-\text{DNA}_{\text{Cp}}$. E) Imobilização da $\text{DNA}_{\text{Sc}}-\text{DNA}_{\text{Cp}}$ nas PMs. F) formação do bioconjugado $\text{PM}-\text{DNA}_{\text{Sc}}-\text{DNA}_{\text{Cp}}-\text{HRP}$.

Paralelamente a preparação das PMs, foi realizada o preparo das soluções de DNA_{Sc} e DNA_{Cp} em tampão HEPES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 contendo $\text{NaCl } 100,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{KCl } 25,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{MgCl}_2 \text{ } 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A mistura contendo $0,25 \text{ mL}$ da solução de DNA_{Cp} e $0,25 \text{ mL}$ da DNA_{Sc} foi aquecida a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min (FIGURA 12-C) utilizando um thermo-shaker com agitação suave. Posteriormente, a mistura foi deixada até alcançar a temperatura ambiente e em seguida a mesma foi colocada em agitador rotatório durante 24 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, este procedimento foi realizado previamente a cada estudo a fim de realizar a hibridização entre a DNA_{Sc} e a DNA_{Cp} ($\text{DNA}_{\text{Sc}}-\text{DNA}_{\text{Cp}}$) (FIGURA 12-D). A

captura da DNA_{Sc}-DNA_{Cp} na solução padrão foi realizada utilizando as PMs para a preparação do bioconjugado PM-DNA_{Sc}-DNA_{Cp}-HRP. Para isto, foram adicionados 250,0 µL da solução de DNA_{Sc}-DNA_{Cp} à solução e agitou-se a mesma em vortex e em agitador rotatório durante 24 h a 37 °C a fim de realizar a formação do bioconjugado PM-DNA_{Sc}-DNA_{Cp} (FIGURA 12-E). Posteriormente, a suspensão foi separada magneticamente e lavada com 200,0 µL de uma solução tampão PBS-TW20 pH 7,0 descartando o sobrenadante.

Em seguida, foram adicionados 240,0 µL de uma solução da enzima HRP 5,0 mg mL⁻¹ (preparada em PBS) em 760,0 µL de tampão PBS-TW20-BSA, esta solução foi adicionada ao bioconjugado PM-DNA_{Sc}-DNA_{Cp} deixando a mistura em agitador giratório por 18 h, este procedimento permite a conjugação da enzima HRP às PMs resultando na formação do bioconjugado PM-DNA_{Sc}-DNA_{Cp}-HRP (FIGURA 12-F). Após a agitação, foi realizada a separação magnética do bioconjugado lavando-o com 200,0 µL PBS-TW20-BSA (procedimento realizado por 4 vezes, descartando o sobrenadante).

Posteriormente, adicionaram-se à suspensão 200,0 µL de glicina 1,0 mol L⁻¹ (pH 8,0) e agitou-se a suspensão no vortex e após no agitador giratório durante 30 min a temperatura ambiente. Após isso, foi feita a lavagem (com tampão PBS-TW20-BSA) e realizou-se a separação magnética. Enfim, foi realizada a ressuspensão do bioconjugado com 100,0 µL de uma solução tampão PBS-TW20-BSA.

3.6 - Construção dos SEDs

Os SEDs foram fabricados utilizando a técnica de serigrafia com procedimento análogo ao descrito por Afonso *et al.*⁷⁴ conforme apresentado na FIGURA 13. Todos os eletrodos dos SEDs no caso WE (3 mm de diâmetro), CE e RE foram fabricados concomitantemente conforme apresenta a FIGURA 13. Para isto, inicialmente um adesivo vinílico foi recortado empregando um plotter de recorte para artesanato, impressora de recorte, (FIGURA 13-A) no formato elaborado com auxílio do software Silhouette. Após o recorte no formato desejado, as áreas recortadas foram retiradas conforme apresentado na FIGURA 13-B.

Posteriormente, foi realizada a serigrafia empregando uma tinta condutora de carbono possibilitando a deposição da tinta de carbono na área recortada (FIGURA 13-C), a qual foi curada a 90 °C durante 30 min. Em seguida, realizou-se a pintura do pseudo-eletrodo de referência (RE) com uma tinta de Ag/AgCl (FIGURA 13-D) que foi curada a 60 °C por 30 min. O adesivo vinílico foi retirado (FIGURA 13-E e 13-F) e uma máscara hidrofóbica foi criada (FIGURA 13-G) utilizando cartão polaseal previamente recortado com a impressora de recorte no formato adequado a fim de possibilitar o isolamento dos contatos elétricos e delimitação das áreas eletroativas de cada eletrodo dos SEDs. Os SEDs contendo o cartão polaseal foram colocados em uma prensa térmica com temperatura igual a 120 °C durante 200 s (FIGURA 13-H) possibilitando o isolamento dos contatos elétricos e delimitação da área eletroativa dos eletrodos (FIGURA 13-I).

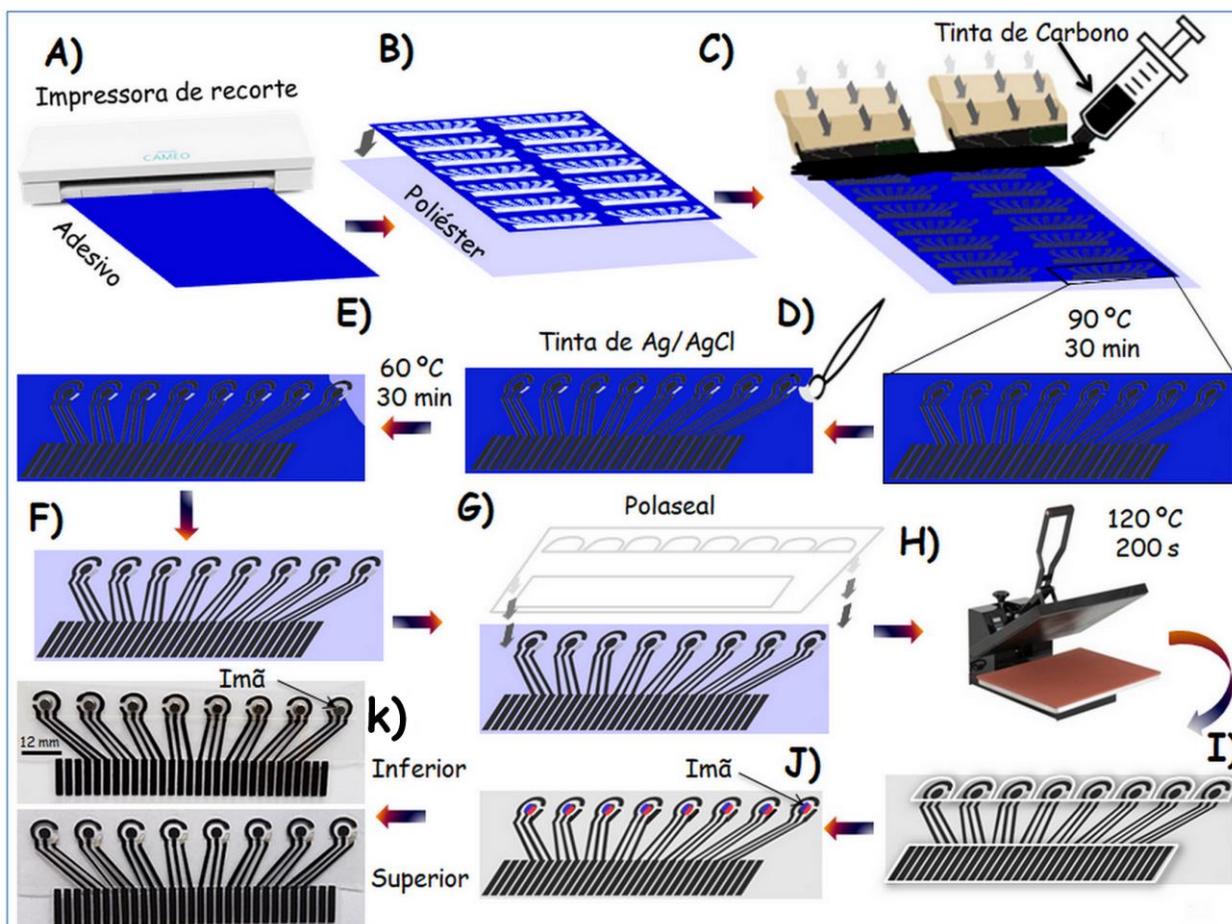


FIGURA 13 - Representação esquemática da fabricação dos SEDs. A) Recorte do adesivo de baixa aderência com impressora de recorte. B) Remoção das partes recortadas indesejadas. C) Serigrafia dos eletrodos com tinta de carbono. D) Pintura dos REs utilizando tinta de Ag/AgCl. E) Remoção do adesivo. F) SED sem adesivo vinílico. G) Adição de máscara de cartão polaseal. H) Aquecimento do SED em prensa térmica. I) Formação da máscara hidrofóbica. J) Adição de ímãs de neodímio na parte de trás dos WEs. K) Fotografia do SED finalizado.

Posteriormente, todos os SEDs foram lavados com água ultrapura e secados a temperatura ambiente, em seguida adicionaram-se ímãs de neodímio na parte de trás de cada WE do SEDs (FIGURA 13-J) com auxílio de uma fita adesiva dupla face previamente fixada na parte de trás do SED. Este procedimento foi adotado para a fabricação de todos os SEDs utilizados neste trabalho.

3.6.1 - Construção dos SEDs microfluídicos (μ SEDs)

Os SEDs microfluídicos (μ SEDs) foram fabricados em um arranjo contendo oito WEs (diâmetro de 2 mm) de acordo com o procedimento descrito por De Oliveira *et al.*¹⁰⁹. O desenho e formato dos WEs, CE e RE foram feitos de maneira análoga a fabricação dos SED (Seção 3.6) utilizando adesivo vinílico e impressora de recorte da marca Silhoutte Studio com formato adequado para fabricação dos μ SEDs. O procedimento de fabricação e o tempo de cura da tinta de carbono e tinta de Ag/AgCl foi o mesmo utilizado anteriormente para a fabricação dos SEDs.

Após a serigrafia de todos os eletrodos foi realizada a montagem dos μ SEDs, para isto, empregou-se um cartão adesivo dupla-face de poliestireno, o qual foi recortado utilizando o plotter de recorte possibilitando a formação do canal microfluídico e ao mesmo tempo o isolamento dos contatos elétricos dos eletrodos, uma vez que o cartão foi montado de forma a permanecer apenas a área exposta dos WEs e RE (FIGURA 14-A e 14-B). A FIGURA 14 apresenta as etapas envolvidas na montagem do μ SEDs.

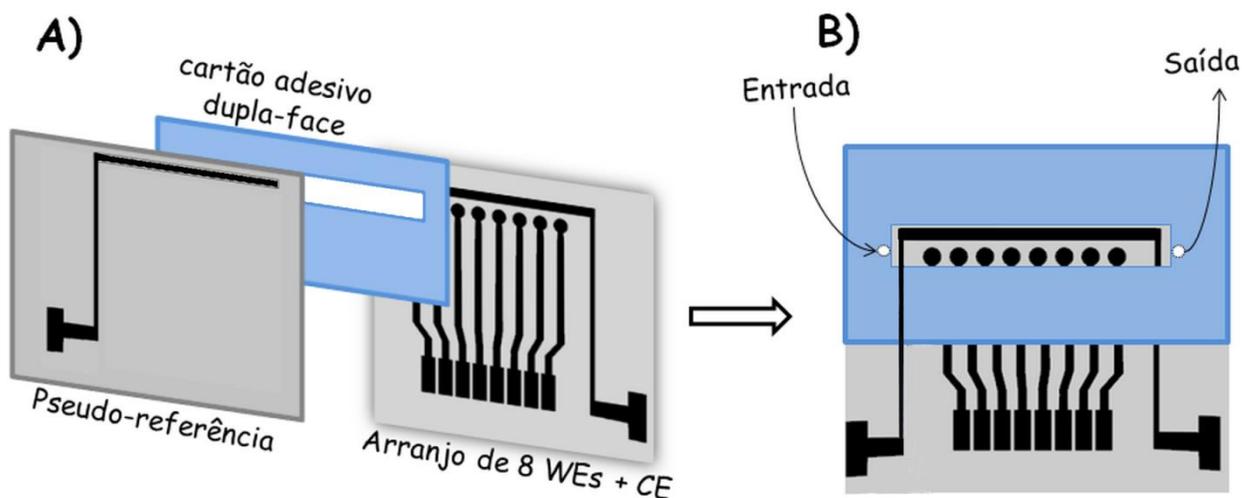


FIGURA 14 - A) Representação esquemática da construção do μ SED. B) μ SED finalizado com os conectores de entrada e saída da solução no sistema microfluídico.

Na FIGURA 14-A é possível observar a montagem do μ SED em que o RE é colado na parte superior do cartão adesivo dupla-face e o arranjo de 8 WEs contendo o CE é colado na parte inferior do cartão. Posteriormente, são feitos dois furos no μ SED (FIGURA 14-B), de modo que seja possível conectá-lo à bomba microfluídica (bomba de seringa) através de conectores a base de poliéter-éter-cetona (PEEK) de 0,2 mm, os quais foram fixados com uma fita adesiva 3M Comman permitindo a entrada e saída da solução através do canal microfluídico com dimensões de 35 mm de comprimento por 4 mm de largura e 0,3 mm de espessura, com um volume interno total igual a 42,0 μ L.

3.6.2 - Modificação dos μ SEDs com a sonda de DNA

O arranjo contendo os 8 WEs presentes no μ SED foi modificado com a DNA_{Sd}. Para isto, os WEs foram lavados com água ultrapura e secados a temperatura ambiente, em seguida, a modificação de cada WE foi realizada utilizando a técnica *Layer-by-layer (LbL)* através da utilização de PDDA e AuNPs-GSH, possibilitando a formação de camadas do polycation PDDA e AuNPs-GSH sobre os WEs seguida da imobilização covalente da DNA_{Sd} empregando uma solução mista contendo EDC e NHS de maneira análoga ao procedimento descrito por de Oliveira *et al.*¹⁰⁹ realizado para a modificação dos WEs (serigrafados com tinta de carbono) com moléculas de anticorpos. A FIGURA 15 apresenta todas as etapas envolvidas na modificação dos WEs com a sonda de DNA_{Sd} originando o μ SED-DNA_{Sd}.

Inicialmente, os WEs foram colocados sobre placas de Petri contendo papel umedecido com água ultrapura a fim de manter a umidade durante o processo

de modificação. Para isto, foram adicionados 5,0 μL de PDDA 2,0 mg mL^{-1} contendo NaCl 50,0 mmol L^{-1} aos WEs (FIGURA 15-B).

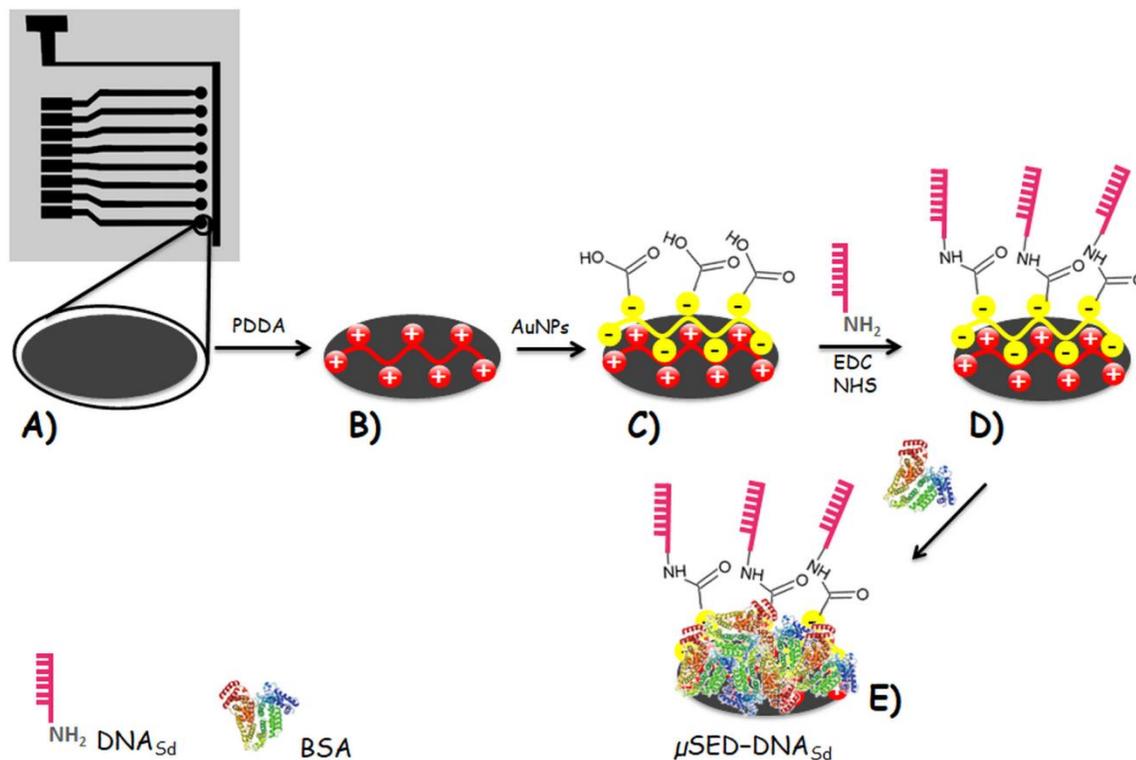


FIGURA 15 - Etapas envolvidas na modificação dos WEs com a DNA_{Sc} : A) Arranjo de 8 WEs contendo o CE. B) Adição de PDDA ao WE. C) Adição das AuNPs ao WE. D) Ligação amida formada entre as AuNPs e a DNA_{Sd} . E) Bloqueio com BSA.

Após 20 min o excesso de solução foi retirado por retropipetagem e adicionaram-se 5,0 μL de uma suspensão de AuNPs-GSH (preparadas em tampão HEPES 20,0 mmol L^{-1} pH 8,0) aos WEs deixando-os por 20 min (FIGURA 15-C). A ligação entre as AuNPs-GSH e a DNA_{Sd} foi formada por meio de uma ligação amida empregando os reagentes EDC e NHS após a adição das AuNPs, uma vez que as AuNPs apresentam grupos carboxílicos em sua superfície e a DNA_{Sd} apresenta um grupo amino na região 5' da sequência de bases da DNA_{Sd} . Assim, um volume de 5,0 μL da solução mista de EDC 0,4 mol L^{-1} e NHS 0,1 mol L^{-1} foi adicionado aos WEs. Após 10 min, os eletrodos foram lavados cuidadosamente mergulhando-

os três vezes em um béquer contendo água ultrapura. Posteriormente, os WEs foram secos utilizando papel absorvente e adicionaram-se 5,0 μL de uma solução estoque da DNA_{sd} 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ aos WEs, os quais foram mantidos por 18 h a 4 $^{\circ}\text{C}$ a fim de realizar a imobilização da DNA_{sd} sobre os WEs (FIGURA 15-D).

Em seguida, os WEs foram lavados com uma solução de PBS-TW20 pH 7,4 cuidadosamente e adicionaram-se 5,0 μL de uma solução de BSA 2,0 % m/m preparada em solução de PBS pH 7,4 mantendo-os por 1 h (FIGURA 15-E). Posteriormente, os WEs foram novamente lavados cuidadosamente com a solução de PBS-TW20 pH 7,4 e o excesso de solução foi retirado com papel absorvente deixando-os secar à temperatura ambiente.

Todo o processo de modificação dos WEs com a DNA_{sd} foi realizado previamente a montagem do dispositivo ($\mu\text{SED-DNA}_{\text{sd}}$) utilizando o cartão adesivo dupla-face para formação do canal microfluídico e isolamento dos contatos elétricos dos eletrodos.

3.6.3 - Medidas eletroquímicas com os μSEDs

As medidas eletroquímicas foram realizadas utilizando um Multi Pontensiostato Portátil Dropsens modelo μSTAT 8000 conectado a um computador gerenciado pelo programa DropView 8400. Para a caracterização dos eletrodos e estimativa da área eletroativa dos mesmos foi empregado a técnica de voltametria cíclica (CV, do inglês *Cyclic Voltammetry*) e uma solução de ácido ferroceno monocarboxílico pH = 8,0 preparada em KCl 0,5 mol L^{-1} , com um intervalo de potencial de 0,0 a +0,6 V.

As medidas eletroquímicas em fluxo foram realizadas utilizando a técnica de amperometria. Inicialmente, o $\mu\text{SED-DNA}_{\text{sd}}$ contendo o arranjo de

8 WEs modificados com a DNA_{sd} foi condicionado empregando uma solução carreadora de PBS-TW20 pH 6,5 com vazão de $100,0 \mu\text{L min}^{-1}$ por aproximadamente 5 min antes da injeção do bioconjugado $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-HRP-DNA}_{\text{Cp}}$. Posteriormente, a dispersão de $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-HRP-DNA}_{\text{Cp}}$ foi injetada no sistema microfluídico preenchendo todo o canal microfluídico com a mesma. O fluxo foi interrompido durante 1 h, a fim de proporcionar a hibridização entre o complexo $\text{PM-DNA}_{\text{Sc}}\text{-DNA}_{\text{Cp}}\text{-HRP}$ e a DNA_{sd} presente na superfície dos WEs (FIGURA 16-A) com a formação de uma estrutura sobre os WEs com a sequência $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-HRP-DNA}_{\text{Cp}}\text{-DNA}_{\text{sd}}$ conforme é apresentado na FIGURA 16-B.

O fluxo foi novamente iniciado através da passagem da solução carreadora removendo as PMs não conjugadas do canal microfluídico. Posteriormente, a etapa de detecção foi realizada empregando a técnica de Amperometria em fluxo através da aplicação de um potencial igual a $-0,25 \text{ V}$ vs. pseudo-referência de Ag/AgCl utilizando uma solução de PBS como eletrólito de suporte.

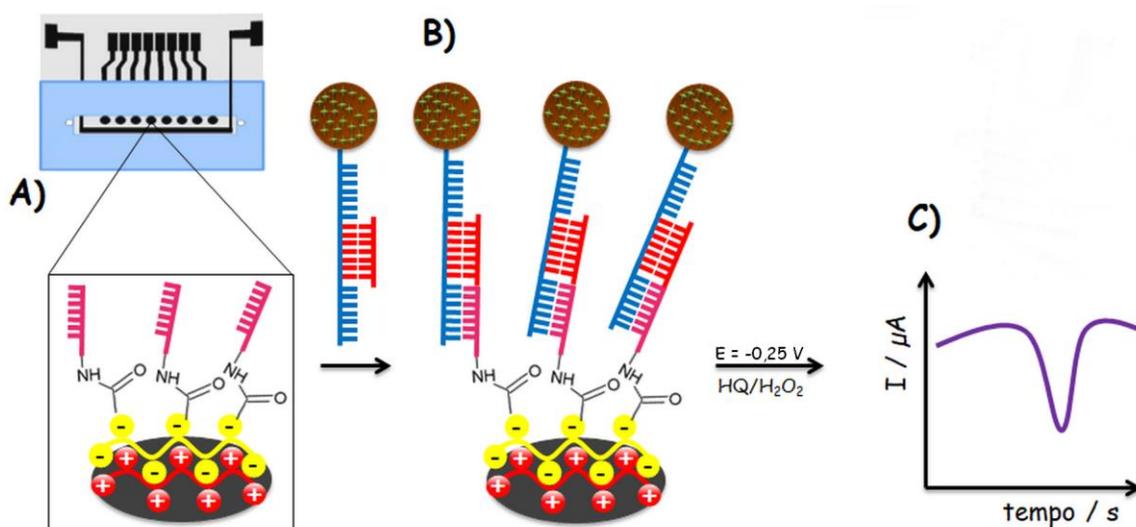


FIGURA 16 - Ilustração das etapas envolvidas na detecção eletroquímica do miRNA-203 via marcação com HRP. A) $\mu\text{SED-DNA}_{\text{sd}}$. B) Incubação das $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-DNA}_{\text{Cp}}$ com o $\mu\text{SED-DNA}_{\text{sd}}$. C) Registro de sinal através da técnica de Amperometria.

A detecção do DNA_{Cp} foi realizada indiretamente pela resposta eletroquímica do marcador (HRP) presente nas PMs. Para isto, foi injetada no sistema microfluídico uma solução contendo H₂O₂ 0,2 mmol L⁻¹ e HQ 2,0 mmol L⁻¹, previamente preparada em tampão PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 6,5 desaerada com gás N₂, utilizando uma alça de amostragem de 100,0 µL. Assim, foi possível obter um sinal analítico utilizando o mediador redox HQ e substrato H₂O₂, uma vez que a quinona (Q) formada foi reduzida na superfície eletródica originando o sinal analítico (FIGURA 16-C) proporcional à concentração do DNA_{Cp} presente no bioconjugado. A FIGURA 17 apresenta o sistema microfluídico utilizado para a detecção do miRNA-203 utilizando os µSED contendo a bomba de seringa, injetor, µSED e o multipotenciostato.

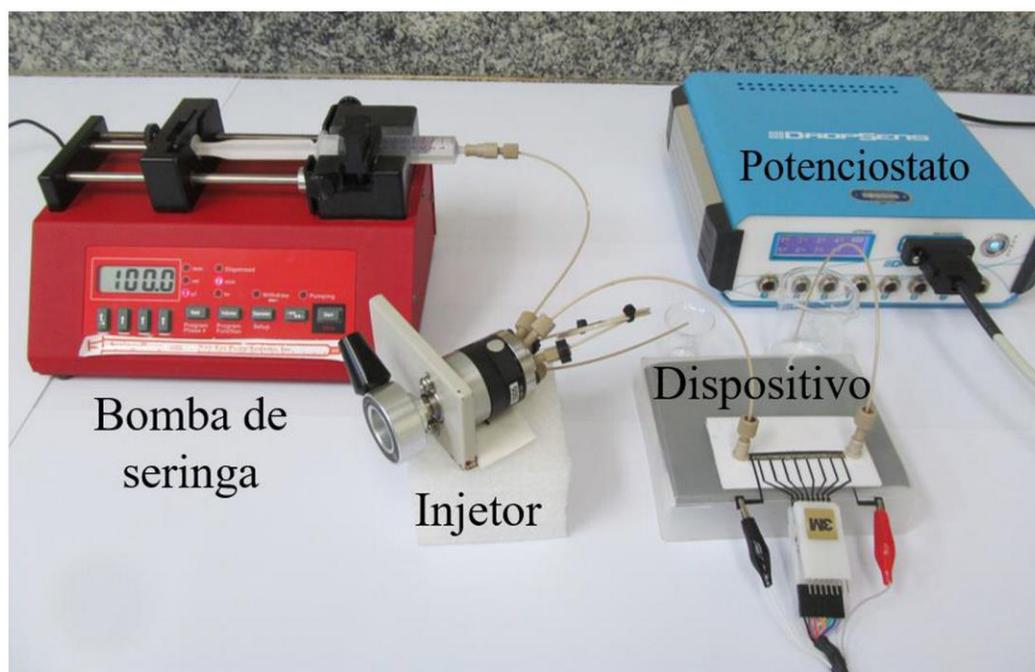


FIGURA 17 - Fotografia do sistema microfluídico empregado para a detecção eletroquímica de miRNA-203 empregando a enzima HRP como marcador eletroquímico. Fonte: de Oliveira, T. R. 2019¹¹⁰.

A bomba de seringa foi conectada à válvula injetora e ao μ SED através de tubos PEEK permitindo o carregamento das soluções aquosas até o canal microfluídico do μ SED. O sistema microfluídico utilizado foi o mesmo proposto por de Oliveira, T. R. *et al.*¹¹⁰.

Além do sistema microfluídico, também foi empregado outro tipo de sistema para a detecção eletroquímica de miRNA-203 de forma mais simples sem a utilização da bomba de seringa e gás N_2 conforme é apresentado na próxima Seção.

3.6.4 - Medidas eletroquímicas com os SEDs

A caracterização dos eletrodos, estudos de repetitividade e estimativa da área eletroativa dos eletrodos foi realizada utilizando uma solução de ácido ferroceno monocarboxílico pH = 8,0 preparada em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e a técnica de CV, aplicando um intervalo de potencial de 0,0 a +0,6 V durante as medidas de CV.

Os estudos eletroquímicos envolvendo a detecção de miRNA-203 foram realizados empregando a técnica de SWV. Na otimização dos parâmetros da SWV utilizaram-se $75,0 \mu\text{L}$ de uma suspensão de AuNPs preparada em solução aquosa de HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ 1:1 (v/v) a qual foi adicionada diretamente em cada célula eletroquímica do SED de uma única vez para a realização das medidas eletroquímicas. Os parâmetros eletroquímicos otimizados da SWV foram: potencial de eletrodeposição (E_{dep}), tempo de eletrodeposição (t_{dep}), frequência (f), amplitude de pulso (a) e incremento de potencial (ΔE_s). Na FIGURA 18 é apresentado todo o sistema utilizado no método eletroanalítico utilizando os SEDs para a detecção de miRNA-203.

O sistema eletroquímico apresentado na FIGURA 18 foi utilizado para a realização de todas as medidas eletroquímicas empregando o método eletroanalítico proposto para a quantificação de miRNA-203 com os SEDs. Para os estudos uma alíquota de 10,0 μL da dispersão contendo o bioconjugado $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-DNA}_{\text{Cp}}\text{-AuNPs}_{\text{Sd}}$ foi adicionada em cada WE do arranjo de 8 eletrodos do SED (ver FIGURA 11-D) para a medida eletroquímica visando obter o sinal analítico (ver FIGURA 11-E) referente ao processo redox do ouro presente nas AuNPs_{Sd} ligadas na sequência da região terminal da DNA_{Sc} ancorada nas PMs.

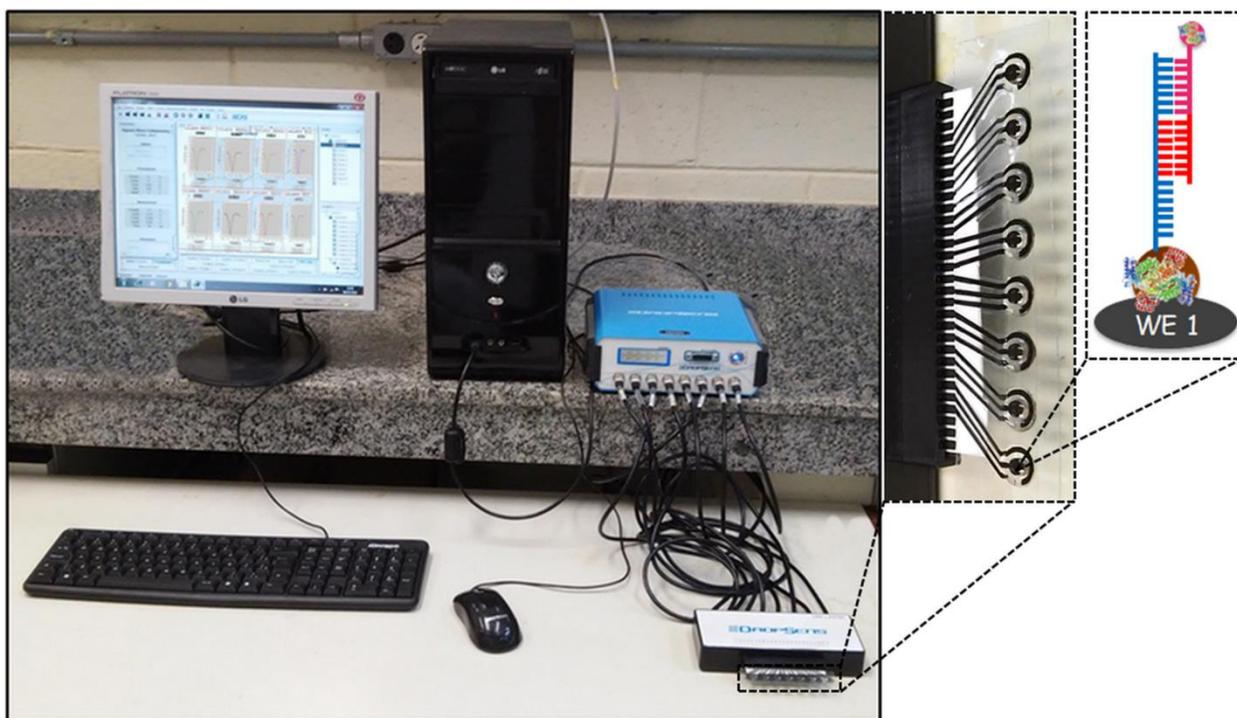


FIGURA 18 - Foto do sistema eletroquímico utilizado para a detecção de miRNA-203 nas amostras de RNA total utilizando o SED.

Do lado oposto de cada WE foi posicionado um ímã de neodímio de forma a permitir a captura e retenção do bioconjugado sobre a superfície de cada WE. Assim, após 5 min o excesso de solução foi retirado com papel absorvente e adicionaram-se 75,0 μL de uma solução de HCl 0,2 mol L^{-1} à cada célula eletroquímica do SED para atuar como eletrólito de suporte nas medidas

eletroquímicas. Posteriormente, foi aplicado um potencial de +1,25 V *vs.* pseudo-referência de Ag/AgCl durante 120 s e registraram-se os SWVs com varredura de +1,1 a -0,15 V.

3.7 - Análise das amostras de linhagens celulares e linfonodos

A quantificação de miRNA-203 foi realizada em amostras de RNA total obtidas de linhagens celulares e de linfonodos de pacientes com CCP, a sequência de miRNA-203 quantificada nas amostras foi a seguinte: 5'-GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG-3'. Todas as amostras foram fornecidas pelo Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) da Fundação Pio XII do Hospital de Amor (HA) de Barretos através da colaboração do Dr. Matias Eliseo Melendez e Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters seguindo todos os procedimentos éticos. O Prof. Ronaldo C. Faria do DQ/UFSCar possui parceiras já firmadas e aprovadas no comitê de ética da UFSCar sob número CAAE 53407516.4.1001.5504.

Todas as amostras de RNA total extraído de linhagens celulares e linfonodos de pacientes com CCP foram estocadas a -20 e -80 °C, respectivamente. As amostras foram descongeladas antes da realização de cada medida e foram analisadas utilizando o método eletroanalítico proposto e por RT-PCR realizado no HA. Todas as amostras foram diluídas em tampão HEPES 10,0 mmol L⁻¹ pH 7,0 para uma concentração final de RNA total igual a 0,1 pg L⁻¹ previamente a realização dos ensaios de hibridização.

Uma alíquota de 10,0 µL contendo a dispersão de PM_{Sc} foi adicionada a um volume de 0,5 mL da amostra. A mistura foi mantida sob agitação a 800 rpm durante 15 min a 85 °C (FIGURA 11-A) utilizando um thermo-shaker. Em seguida,

a mistura foi mantida sob agitação por 1 h em temperatura ambiente e realizou-se a separação magnética do bioconjugado PM_{Sc} -mRNA203 seguida da lavagem com PBS por três vezes. Posteriormente, 0,25 mL da dispersão de $AuNPs_{Sd}$ foram adicionados ao bioconjugado (PM_{Sc} -mRNA203) e a mistura foi agitada por 1 h a 800 rpm (FIGURA 11-B). O bioconjugado PM_{Sc} -mRNA203- $AuNPs_{Sd}$ foi lavado com solução de PBS-TW20-BSA e, em seguida com PBS. Posteriormente, o bioconjugado foi redisperso em 0,25 mL de PBS.

Para a realização das medidas eletroquímicas, foram adicionados 10,0 μ L do bioconjugado em cada WE do SED. Após 5 min, a solução em excesso foi removida por capilaridade empregando um papel absorvente e foram adicionados 75,0 μ L de solução de HCl 0,2 mol L^{-1} a cada célula eletroquímica para atuar como eletrólito de suporte e, em seguida, foi realizada a medida eletroquímica empregando a técnica de SWV (FIGURA 11-E).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Caracterização espectroscópica das AuNPs e AuNPs-GSH

As AuNPs e AuNPs-GSH foram caracterizadas empregando a espectroscopia de UV-vis realizando a varredura de 300 a 750 nm, diluindo as mesmas em água ultrapura previamente as medidas. A FIGURA 19 apresenta os espectros UV-vis obtidos para as AuNPs e AuNPs-GSH.

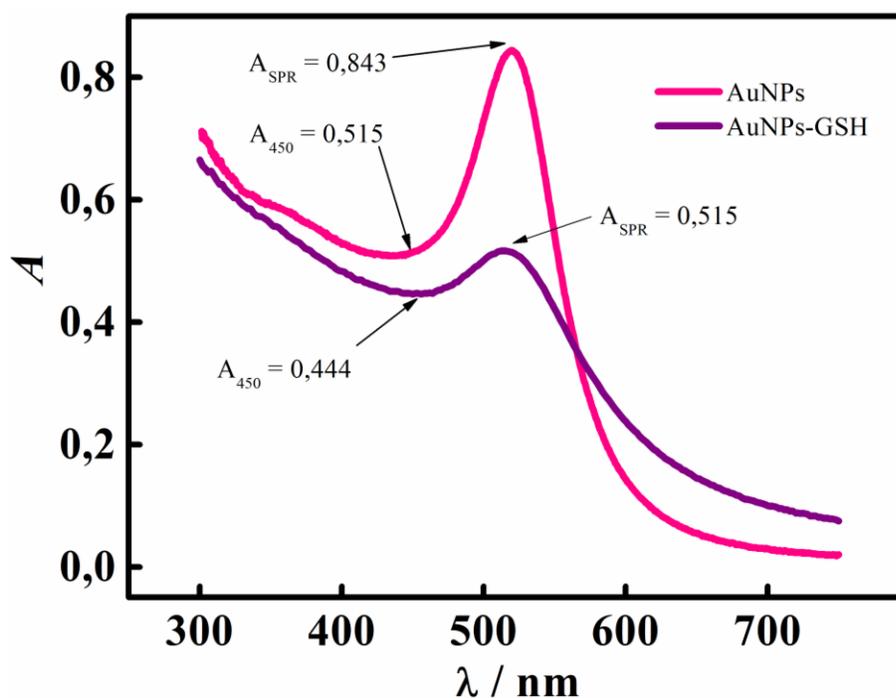


FIGURA 19 - Espectros de UV-vis registrados para as AuNPs e AuNPs-GSH.

Na FIGURA 19 observa-se que a AuNPs (linha rosa) apresenta absorvância no pico de ressonância do plasma de superfície (A_{SPR} , do inglês *Absorbance at the surface plasma resonance*) igual a 0,843 e absorvância em 450 nm (A_{450}) igual a 0,515, ao passo que o espectro de UV-vis (linha púrpura) registrado para a AuNPs-GSH apresentou A_{SPR} e A_{450} iguais a 0,515 e 0,444, respectivamente. Para estimar o diâmetro das AuNPs o valor de A_{SPR} foi dividido pela A_{450} tanto para as AuNPs quanto para as AuNPs-GSH de acordo com o

método proposto por Haiss *et. al.*¹¹¹. Nesse método, é possível estimar o diâmetro das AuNPs por meio de uma relação matemática em que os autores relacionam o diâmetro das AuNPs com a razão entre A_{SPR} e A_{450} conforme apresenta a TABELA 2.

TABELA 2 - Razão entre A_{SPR} e A_{450} e relação com o diâmetro das AuNPs. Fonte: Haiss *et. al.*, 2007¹¹¹.

A_{SPR}/A_{450}	Diâmetro / nm	A_{SPR}/A_{450}	Diâmetro / nm
1,10	3	1,61	14
1,19	4	1,65	16
1,27	5	1,69	18
1,33	6	1,73	20

Os valores obtidos de A_{SPR}/A_{450} para as AuNPs e AuNPs-GSH foram iguais a 1,61 e 1,16. Assim, os diâmetros estimados para as AuNPs e AuNPs-GSH utilizando este método foram de aproximadamente 14 e 4 nm, respectivamente. Para as AuNPs-GSH foi considerado o diâmetro igual a 4 nm, este valor está associado a razão A_{SPR}/A_{450} igual a 1,19 e este é o valor mais próximo de 1,16 dos valores apresentados na TABELA 2. As AuNPs apresentam tamanhos de aproximadamente 20 nm¹⁰⁵ ao passo que as AuNPs-GSH caracterizadas por Mani *et al.*¹¹² resultaram em tamanhos médios iguais a 5 nm. Assim, observa-se que os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados na literatura com valores de tamanho de partículas próximos aos previamente descritos.

4.1.1 - Caracterização microscópica das AuNPs

Para obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das AuNPs, uma gota da suspensão das AuNPs foi adicionada à superfície de uma placa de silício oxidado (Si/SiO₂) com dimensões aproximadas de

5 x 5 x 1 mm. Após secagem à temperatura ambiente, a placa foi fixada em um stub com uma fita condutora à base de carbono, que também foi utilizada para fazer contato elétrico entre a superfície da placa de Si/SiO₂ e do stub. A FIGURA 20-A apresenta a imagem de MEV obtida para as AuNPs ao passo que a FIGURA 20-B apresenta o gráfico de distribuição de tamanho das AuNPs.

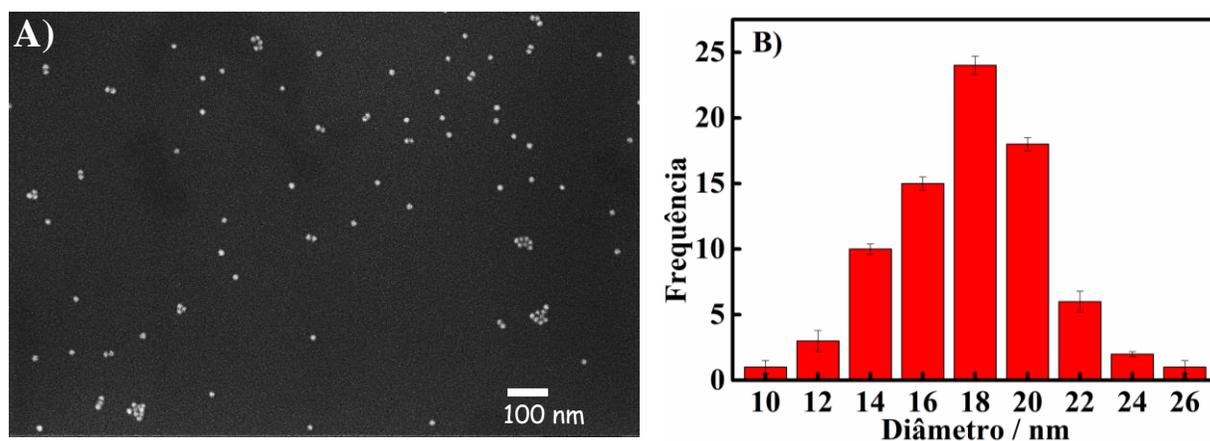


FIGURA 20 - A) MEV realizada para as AuNPs previamente sintetizadas. B) Histograma de distribuição de tamanho das AuNPs.

A FIGURA 20-B, mostra um tamanho médio de 18 nm para as AuNPs sintetizadas o que indica que o resultados obtidos experimentalmente estão concordantes com os apresentados na literatura, uma vez que a síntese proposta por J. TURKEVICH *et al.*¹⁰⁵ resulta em um tamanho médio de AuNPs igual a 20 nm, ou seja, um valor bastante próximo ao encontrado experimentalmente demonstrando que o resultado encontrado está de acordo com o apresentado na literatura.

4.1.2 - Caracterização microscópica do bioconjugado PM_{Sc} -DNA $_{Cp}$ -AuNPs $_{Sd}$

Para observar a estrutura e morfologia do material bioconjugado obtido, foram realizadas medidas de MET empregando um grid de cobre recoberto com filme fino de carbono. Para isto, o grid foi imerso em uma suspensão contendo o bioconjugado, em seguida, o grid foi retirado da suspensão deixando-o em dessecador por 24 h. Este procedimento foi repetido para todos os bioconjugados previamente as análises de MET. Na FIGURA 21 são apresentadas as imagens de MET obtidas para os bioconjugados: PM_{Sc} , AuNPs $_{Sd}$ e PM_{Sc} -DNA $_{Cp}$ -AuNPs $_{Sd}$.

Na FIGURA 21-A é possível observar as imagens de MET obtidas para as PM_{Sc} com tamanho de aproximadamente 1,0 μm , este tamanho está próximo ao informado pelo fabricante para PMs (sem modificação) que apresenta um diâmetro médio de 1,5 μm ¹¹³. A imagem de MET registrada para as AuNPs $_{Sd}$ (FIGURA 21-B) apresenta as AuNPs com diâmetros de aproximadamente 18 nm, tamanho que já foi observado pelas análises de MEV realizadas para as AuNPs sem modificação (ver Seção 4.1.1).

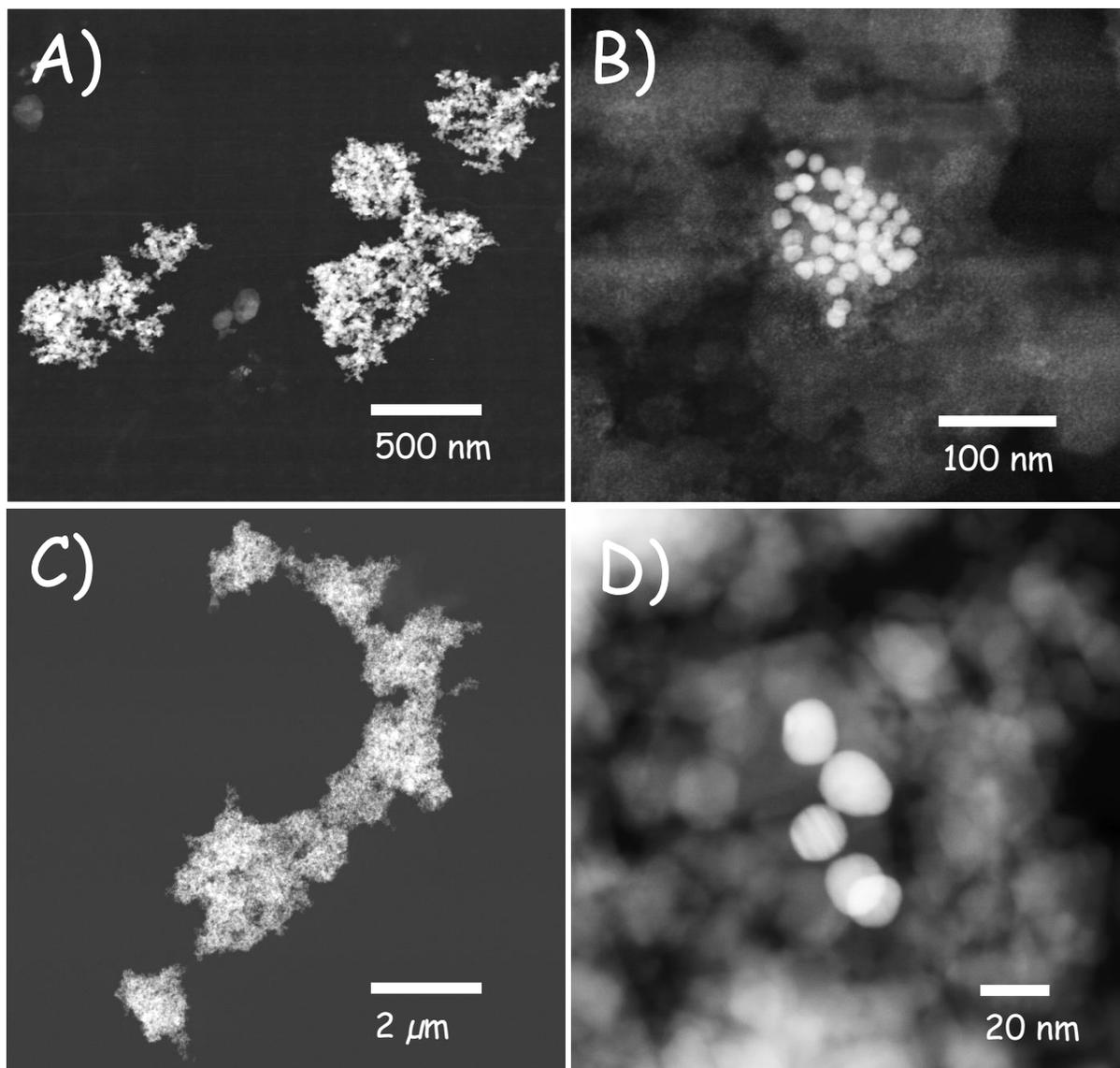


FIGURA 21 – Imagens de MET realizadas para os bioconjugados: A) PM_{Sc} , B) $AuNPs_{Sd}$, C) $PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Sd}$ e D) Ampliação de C).

Comparando as imagens obtidas para o bioconjugado $PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Sd}$, FIGURA 21-C e 21-D, é possível observar a presença de AuNPs com diâmetro de aproximadamente 18 nm (FIGURA 21-D) indicando que o processo de hibridização foi realizado com sucesso. Entretanto, foram realizadas medidas de EDX a fim de confirmar a presença das AuNPs no bioconjugado. A FIGURA 22 apresenta as medidas de EDX realizadas para as PM_{Sc} , $AuNPs_{Sd}$ e $PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Sd}$.

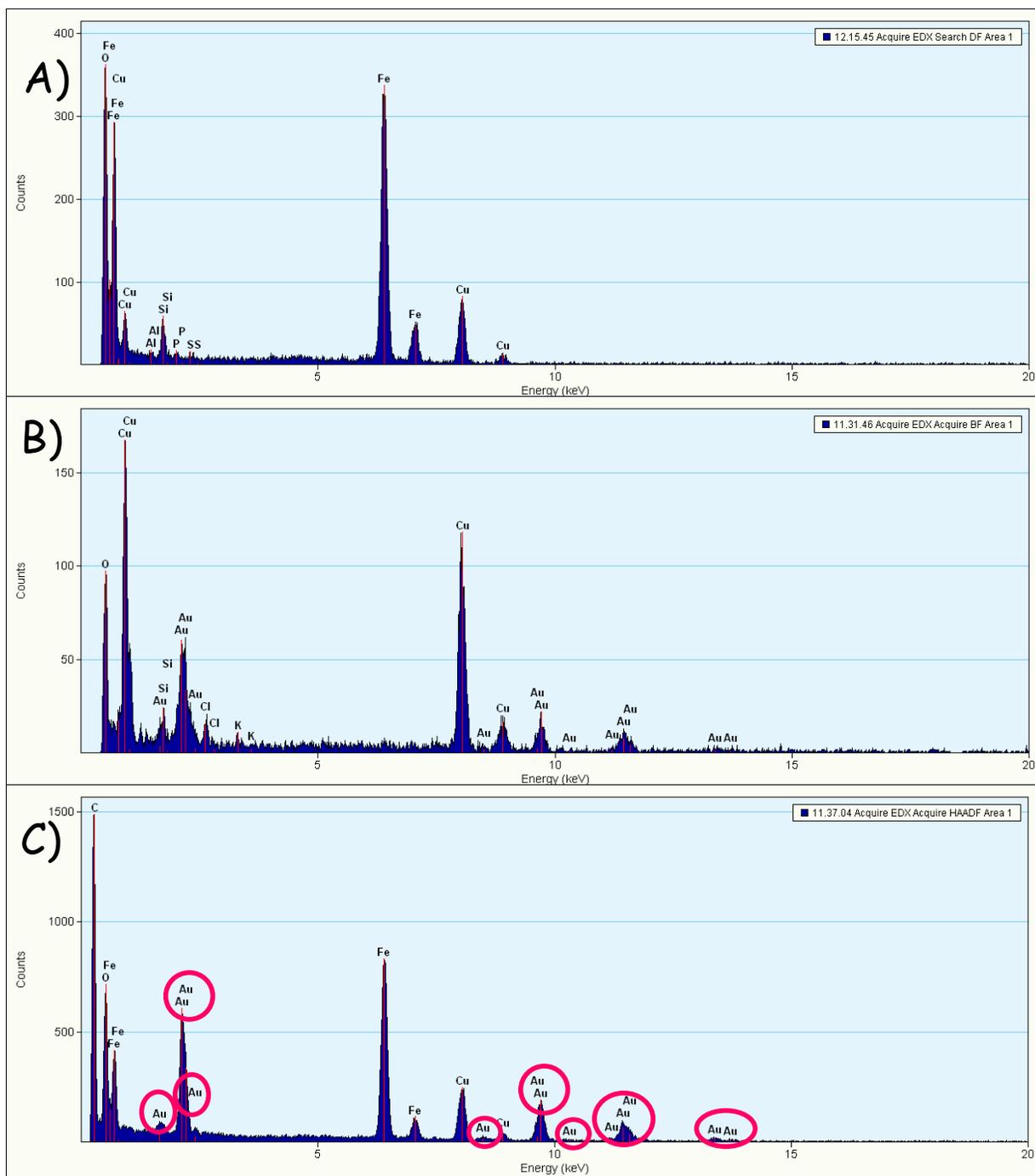


FIGURA 22 - Análise de EDX para os bioconjugados: A) PM_{Sc}, B) AuNPs_{Sd} e C) PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Sd}.

Na FIGURA 22-A é possível observar picos bastante intensos de Fe e O na medida de EDX realizada para as PM_{Sc}, as PMs obtidas comercialmente são compostas de mais de 90 % de óxido de ferro¹¹³ e portanto espera-se o registro de

elevados sinais tanto de Fe quanto de O nas análises de EDX realizadas para este material. A medida de EDX realizada para as AuNPs_{Sd} apresenta sinais de Au confirmando a presença deste metal no material bioconjugado conforme pode ser observado na FIGURA 22-B. Também foram observados picos intensos de Cu nos espectros de EDX apresentados na FIGURA 22-B, os picos de Cu podem ser referentes ao porta-amostra (grid) que foi utilizado para o preparo das amostras previamente as medidas de EDX, uma vez que ele possui cobre em sua composição. A presença de sinais intensos de Cu em medidas de EDX também foi observada em alguns trabalhos reportados na literatura, tais como análises de EDX realizadas para AuNPs sintetizadas e funcionalizadas com polietilenoglicol¹¹⁴, Poli-L-lisina¹¹⁵ e extrato de plantas¹¹⁶. Assim, os resultados apresentados nas análises de EDX para as AuNPs_{Sd} estão de acordo com os descritos na literatura.

Os picos de Au (circulados em rosa) apresentados na análise de EDX para o bioconjugado PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Sd} na FIGURA 22-C confirmam a presença de Au no bioconjugado. Além disso, o pico bastante intenso de C na FIGURA 22-C indica a presença da grande quantidade material orgânico presente no bioconjugado final (PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNPs_{Sd}) oriundo da DNA_{Sc}, DNA_{Cp} e DNA_{Sd}. Também foi possível detectar a presença de Fe devido à presença das PM no bioconjugado. Portanto, o processo de hibridização foi realizado com sucesso indicando que este método de bioconjugação e marcação com AuNPs pode ser empregado para a detecção indireta de miRNA-203 através de medidas eletroquímicas utilizando os SEDs.

4.1.3 - Caracterização eletroquímica e morfológica do SED

A avaliação dos SEDs construídos foi realizada por meio de medidas eletroquímicas utilizando uma solução de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$. As medidas de CV foram realizadas após a adição de $75,0 \text{ }\mu\text{L}$ desta solução em cada uma das oito células eletroquímicas (CE) de um único SED (FIGURA 23-A) e em três SEDs diferentes (FIGURA 23-B).

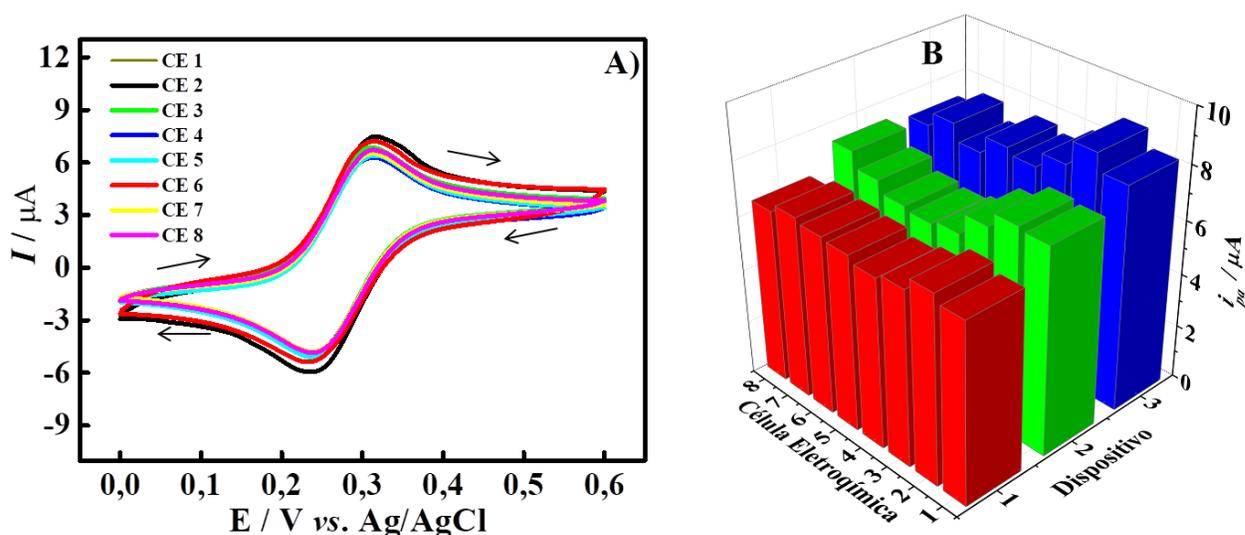


FIGURA 23 - A) Medidas de CV registradas com solução aquosa de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para as 8 CEs do SED ($n = 8$), $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ de $0,0$ a $+0,6 \text{ V}$. B) i_{pa} registradas para cada CE dos 3 SEDs.

Na FIGURA 23-A é possível observar os voltamogramas cíclicos bem definidos e com uma ótima repetitividade para as oito CEs do SED. A fim de avaliar a repetitividade dos SEDs, a corrente de pico anódica (i_{pa}) de cada CV dos três SEDs foi medida (FIGURA 23-B) para 3 dispositivos distintos. O Dispositivo 1 apresentou um valor de i_{pa} média igual a $6,61 \text{ }\mu\text{A}$, ao passo que os Dispositivos 2 e 3 apresentaram valores de i_{pa} média iguais a $6,98$ e $7,79 \text{ }\mu\text{A}$. Além disso, também foi calculado o RSD (do inglês, *Relative Standard Deviation*) para

cada SED. Para o Dispositivo 1 o valor de RSD obtido foi igual a 2,88 %, ao passo que para os Dispositivos 2 e 3 os valores foram iguais a 7,98 e 7,43 %, respectivamente. Estes resultados demonstram que os SEDs apresentam uma ótica repetitividade e os SEDs podem ser utilizados com confiança para a realização de medidas eletroquímicas com oito réplicas em um único dispositivo.

A solução de ácido ferroceno monocarboxílico também foi utilizada para realizar o estudo da área eletroativa dos eletrodos. Para isto, o valor de velocidade de varredura (v) foi variado de 10 a 300 mV s^{-1} (FIGURA 24) e a i_{pa} foi registrada para cada medida de CV realizada (FIGURA 24, inserido).

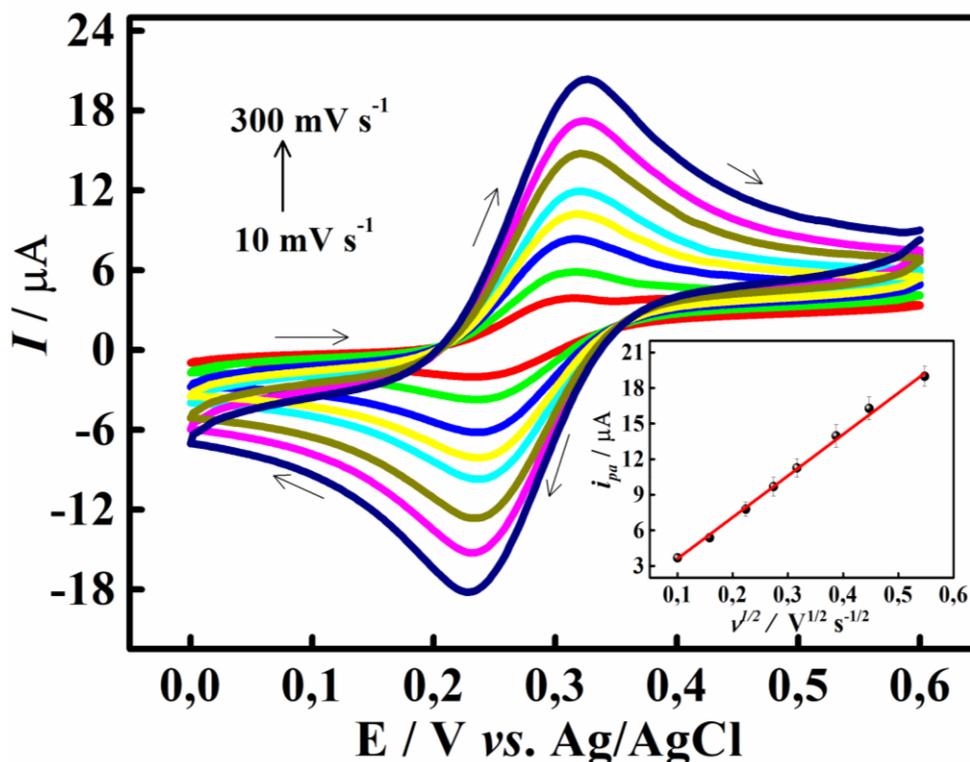


FIGURA 24 – Medidas de CV registradas em solução de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 8,0 utilizando o SED em diferentes valores de v . Inserido: i_{pa} versus $v^{1/2}$, $r^2 = 0,997$.

O gráfico inserido na FIGURA 24 foi linear com equação de reta igual a $i_{pa} = +0,114 + 34,950 v^{1/2}$, com coeficiente de determinação (r^2) = 0,997. Esta

equação pode ser utilizada para estimar a área eletroativa aparente combinando-a com a equação de Randles-Sevcik¹¹⁷ conforme segue abaixo.

$$i_p = \pm(2,69 \times 10^5) n^{3/2} AD^{1/2} Cv^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

em que i_p é a corrente de pico (A), n é o número de elétrons da reação, A é a área eletroativa (cm^2), D é o coeficiente de difusão do ácido ferroceno monocarboxílico em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ($5,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)¹¹⁸, v é a velocidade de varredura de potencial (V s^{-1}), e C é a concentração do ácido ferroceno monocarboxílico em solução (mol cm^{-3}).

A área eletroativa estimada para o SED foi igual $0,0677 \text{ cm}^2$, para $n = 3$ e com RSD igual a 9,65 %, a área geométrica do WE (3 mm de diâmetro) presente no SED é igual a $0,0765 \text{ cm}^2$, ou seja, o valor estimado de área eletroativa ($0,0677 \text{ cm}^2$) utilizando a Equação de Randles-Sevcik é um valor bastante próximo ao da área geométrica do WE.

Além dos estudos eletroquímicos para a caracterização dos SEDs, também foram realizados estudos para avaliar a morfologia dos eletrodos que constituem os SEDs. Para isto, realizaram-se medidas de MEV para o WE do SED. A FIGURA 25 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

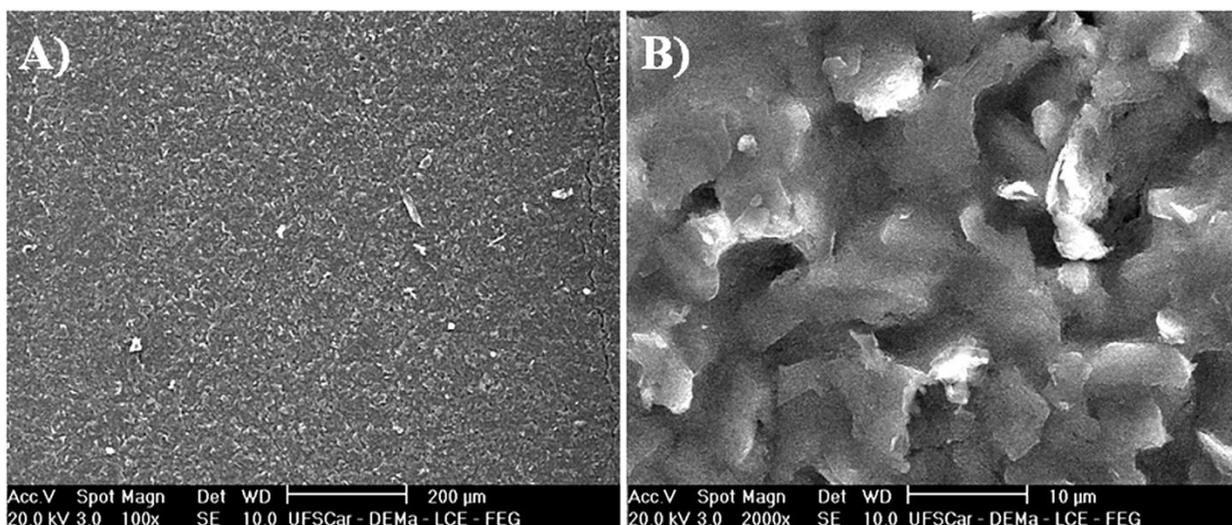


FIGURA 25 - Imagens de MEV registradas para o WE do SED em diferentes ampliações: A) 100 \times e B) 2000 \times .

As imagens de MEV obtidas para a superfície do WE presente no SED (FIGURA 25-A e 25-B) apresentam uma superfície rugosa a qual é uma morfologia comumente encontrada para as imagens de MEV obtidas para SEDs fabricados com tinta de grafite^{74,119,120}. Portanto, os resultados obtidos experimentalmente nas medidas de MEV realizadas para o SED estão de acordo com os reportados na literatura. Interessante observar na FIGURA 25-A que apesar da elevada rugosidade o filme mostra-se bastante uniforme o que pode justificar a excelente repetitividade obtida entre os dispositivos.

4.2 - Caracterização eletroquímica e morfológica do μ SED-DNA_{Sd}

Medidas de CV foram realizadas utilizando a solução de ácido ferroceno monocarboxílico 1,0 mmol L⁻¹, KCl 0,5 mol L⁻¹ pH = 8,0 com o μ SED em cada etapa de modificação do sensor, desde o eletrodo sem modificação, apenas a tinta de carbono, até a modificação final com a DNA_{Sd} (μ SED-DNA_{Sd}). A

FIGURA 26 apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos em cada etapa de modificação.

Nos voltamogramas cíclicos apresentados na FIGURA 26 não foram observadas diferenças significativas nas intensidades de sinais das i_{pa} entre o eletrodo recém preparado e o eletrodo modificado com PDDA (linhas preta e vermelha). Apesar do PDDA ser um polímero não condutor o fato de a resposta de corrente não ter diminuído pode estar relacionado a carga positiva do PDDA e negativa da sonda eletroquímica utilizada, mesmo com a atração das cargas não ocorreu diminuição no pico mantendo o padrão de resposta, não ocorrendo deformações no pico indicando que possivelmente não houve adsorção da sonda na superfície eletródica do μ SED-PDDA. Contudo, quando as AuNPs foram adicionadas ao μ SED (FIGURA 26, linha verde), ocorreu um aumento bastante significativo da i_{pa} ao passo que a modificação do sensor com a DNA_{Sd} resulta em um diminuição da intensidade da i_{pa} . Este efeito pode ser justificado pelo fato das AuNPs aumentarem a área superficial dos WEs¹¹² recobrando na superfície do eletrodo tanto o material de carbono quanto material polimérico que compõem a tinta de carbono o que melhora as respostas resultando no aumento da corrente de pico¹²¹. A diminuição da corrente após a adição da DNA_{Sd} (FIGURA 26, linha azul) pode ser atribuída ao fato da biomolécula de DNA atuar bloqueando a superfície eletródica do WE o que dificulta o processo de transferência eletrônica durante a realização das medidas eletroquímicas, associado ao fato de a fita simples de DNA possuir carga negativa assim como a sonda eletroquímica utilizada¹²².

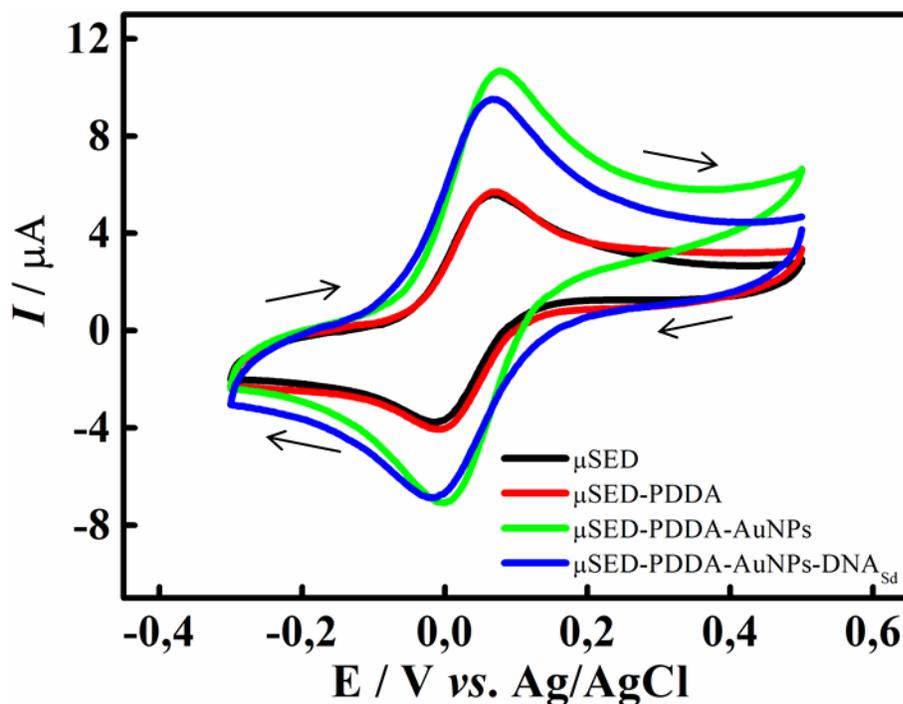


FIGURA 26 - Voltamogramas cíclicos registrados com solução de ácido ferroceno monocarboxílico $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ pH = 8,0 após cada etapa de construção do $\mu\text{SED-DNA}_{\text{Sd}}$, $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Posteriormente, a área eletroativa dos eletrodos foi estimada para cada etapa de modificação do μSED de maneira análoga à realizada para os SED. A TABELA 3 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

TABELA 3 - Valores de área eletroativa estimada em cada etapa de modificação do μSED .

Etapa de Fabricação	Área Eletroativa ^a / cm^2	RSD / %
μSED	$0,038 \pm 0,002$	2,88
$\mu\text{SED-PDDA}$	$0,037 \pm 0,001$	1,98
$\mu\text{SED-PDDA-AuNPs}$	$0,059 \pm 0,004$	6,96

^aValores expressos como média \pm desvio padrão. ($n = 3$).

A área geométrica do WE (diâmetro de 2 mm) presente no μSED é igual a $0,0314 \text{ cm}^2$, ou seja, o valor estimado de área eletroativa para o μSED ($0,038 \text{ cm}^2$) é próximo ao valor da área geométrica do WE, apresentando um resultado semelhante ao encontrado no estudo da área eletroativa estimada para o

SED na Secção anterior. A TABELA 3 mostra claramente que os valores estimados de área eletroativa para o μ SED e μ SED-PDDA não apresentam diferenças significativas. Entretanto, quando as AuNPs-GSH são adicionadas ao sensor (μ SED-PDDA-AuNPs) ocorre um aumento de 55,3 % na área eletroativa. Este efeito também foi observado no trabalho de Mani *et al.*¹¹² em que os autores observaram um aumento de 44,8 % na área eletroativa de eletrodos de carbono vítreo modificados com PDDA e AuNPs-GSH. O maior valor de área eletroativa obtido com o μ SED-PDDA-AuNPs pode ser atribuído a maior rugosidade dos eletrodos fabricados com tinta condutora a base de carbono quando comparados com os eletrodos de carbono vítreo nos estudos de Mani *et al.*¹¹². Assim, nota-se que os resultados obtidos experimentalmente estão de acordo com os apresentados na literatura e indicam que o eletrodo foi efetivamente modificado levando a formação do sensor.

Posteriormente, foram obtidas imagens de MEV do WE para as etapas de modificação do μ SED com PDDA e AuNPs, a FIGURA 27 apresenta as microscopias obtidas neste estudo. A FIGURA 27-A apresenta uma estrutura porosa típica de eletrodos fabricados com tintas de grafite conforme foi discutido na microscopia realizada para o SED (ver FIGURA 25). Entretanto, a imagem de MEV para o μ SED (FIGURA 27-A) apresenta uma morfologia um pouco diferente da observada no SED (ver FIGURA 25), o que pode ser justificado pelo fato da tinta utilizada para a fabricação do μ SED ter sido obtida de um lote diferente da tinta empregada no SED. Na FIGURA 27-B observa-se a formação de um filme devido adição do PDDA como já era esperado em virtude deste material se tratar de um polímero catiônico. Após a adição das AuNPs ao WE do μ SED (FIGURA 27-C) é possível observar a formação de aglomerado de AuNPs-GSH o qual pode ser melhor visualizado através da ampliação na FIGURA 27-D.

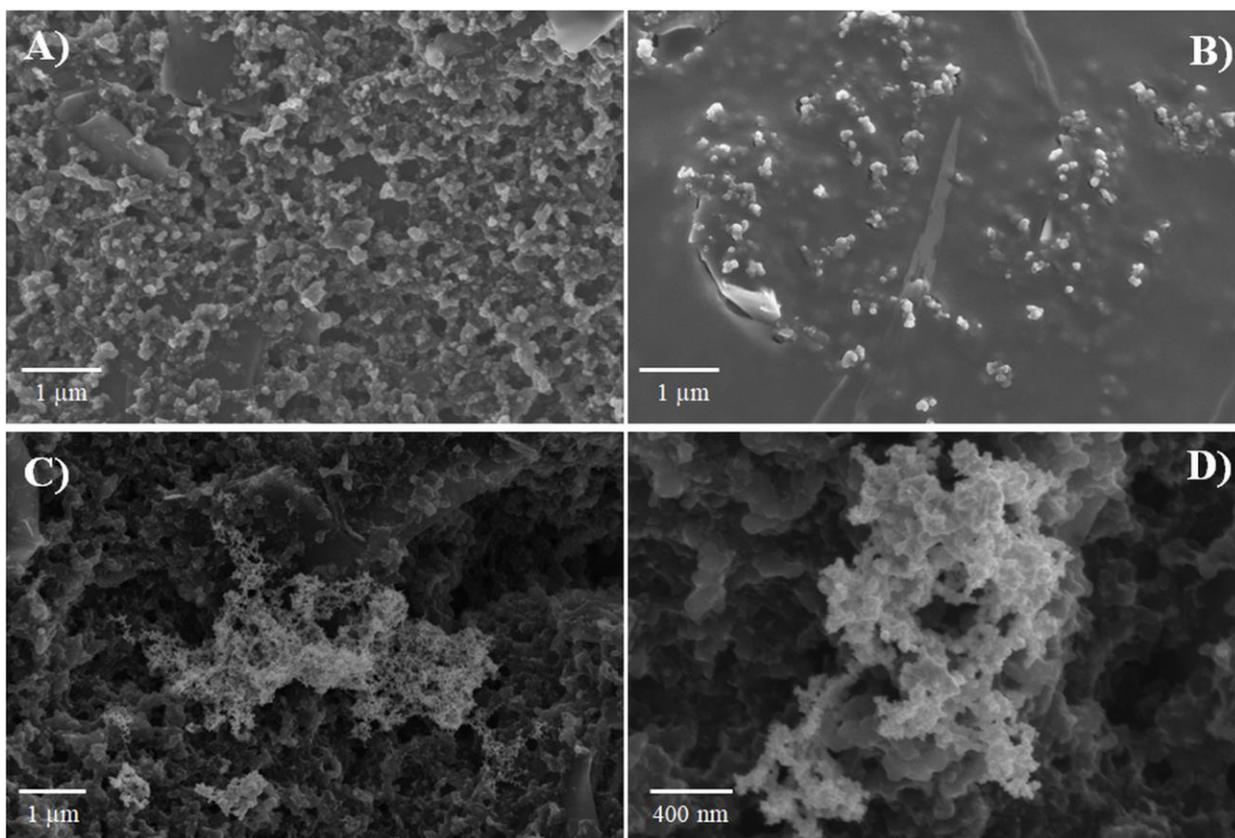


FIGURA 27 - Imagens de MEV registradas dos WE em cada etapa de fabricação do μ SED: A) μ SED (sem modificação), B) μ SED-PDDA, C) μ SED-PDDA-AuNPs e D) Ampliação de C).

Portanto, diante dos resultados apresentados nas caracterizações eletroquímica e morfológica do μ SED é possível concluir que toda etapa de modificação foi realizada com sucesso e que este sensor tem potencialidade para a detecção eletroquímica de miRNA-203.

4.2.1 - Detecção de miRNA-203 utilizando o μ SED-DNA_{Sd}

Inicialmente, foram realizados estudos de hibridização com a DNA_{Sc} e DNA_{Cp}, conforme o procedimento descrito na Seção 3.5.2, visando o desenvolvimento de um método eletroanalítico para a detecção de miRNA-203. Os

estudos eletroquímicos para a detecção de miRNA-203 empregando o μ SED-DNA_{Sd} foram realizados utilizando o mediador redox HQ e como substrato o H₂O₂ a fim de obter indiretamente um sinal analítico para a DNA_{Cp} através da enzima HRP presente no bioconjugado PM_{Sc}-HRP-DNA_{Cp}. A detecção da DNA_{Cp} foi feita indiretamente pela redução eletroquímica da benzoquinona (BQ) gerada no ciclo eletrocatalítico da enzima HRP (marcador eletroquímico) presente nas PMs após a incubação do bioconjugado no μ SED-DNA_{Sd}. A FIGURA 28 apresenta um esquema do ciclo eletrocatalítico da enzima HRP utilizando a HQ e H₂O₂ como substrato para as medidas eletroquímicas realizadas utilizando o μ SED-DNA_{Sd}.

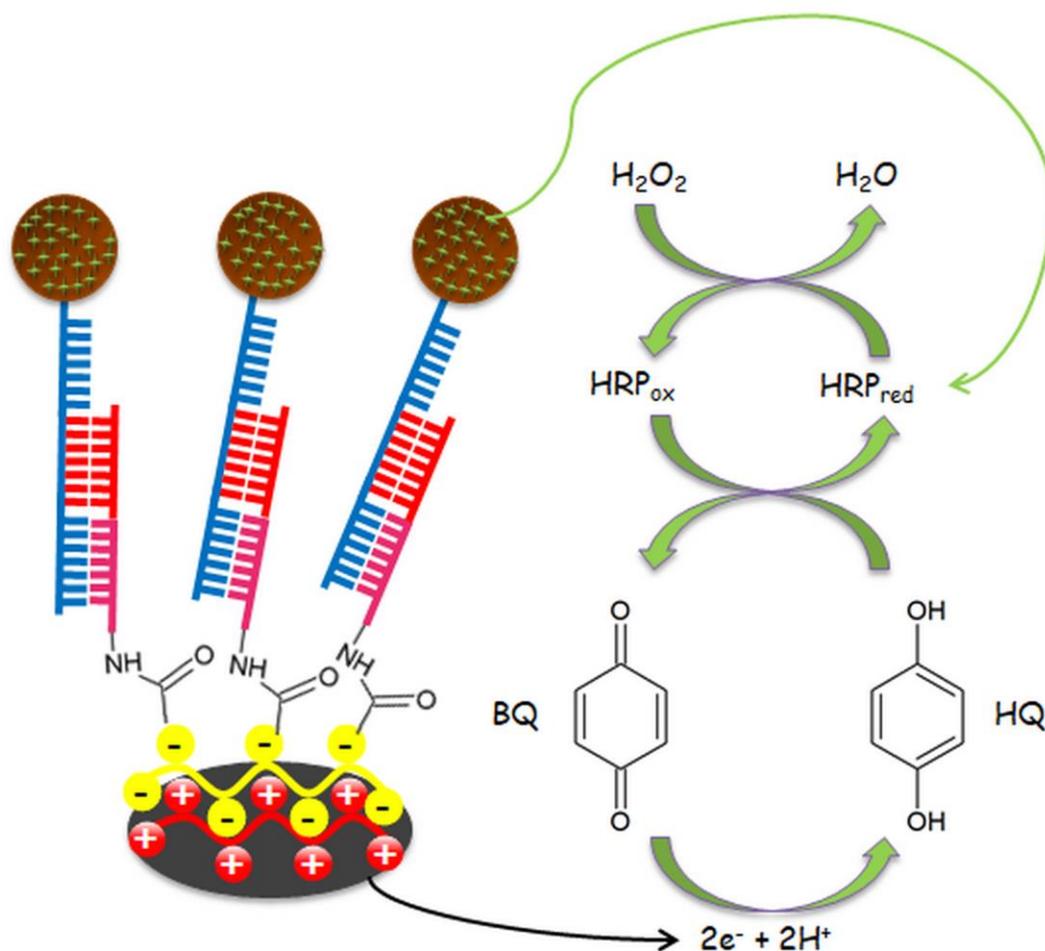
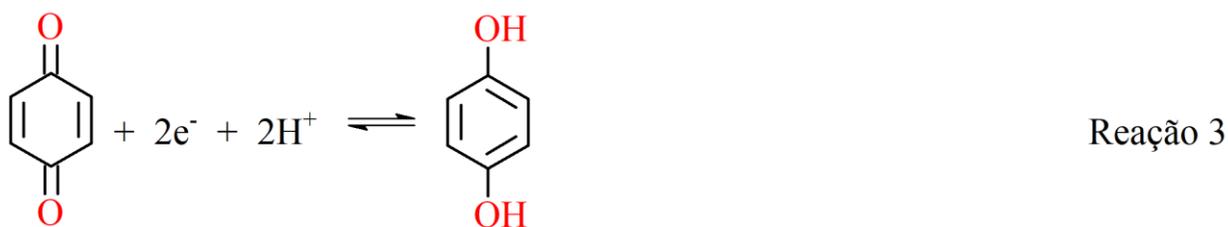
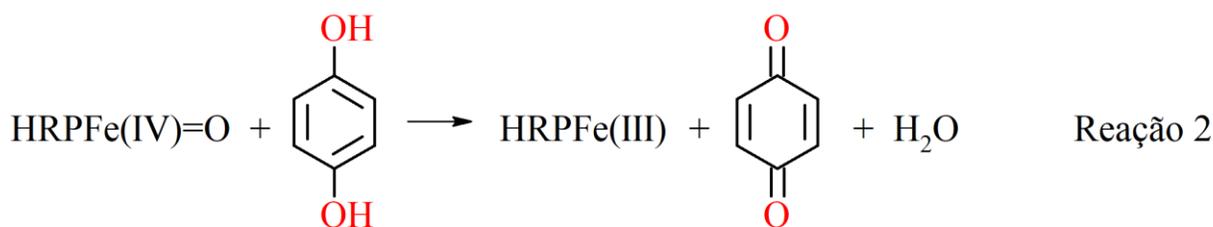
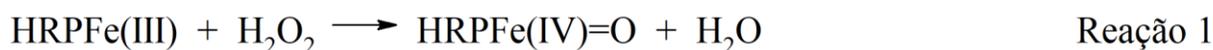


FIGURA 28 - Esquema do ciclo catalítico da enzima HRP na superfície do WE após a incubação com PM_{Sc}-HRP-DNA_{Cp} no μ SED-DNA_{Sd}. HRP_{red} = enzima HRP reduzida (forma nativa), HRP_{ox} = HRP oxidada.

O substrato H_2O_2 tem a função de ativar a enzima HRP (HRP_{red}) oxidando-a (HRP_{ox}), a qual é posteriormente reduzida retornando à sua forma nativa (HRP_{red}) ocasionando a oxidação da HQ para BQ¹¹², a qual é reduzida na superfície eletródica através da aplicação de um potencial igual $-0,25$ V utilizando a técnica de amperometria ocorrendo a transferência de dois elétrons e dois prótons conforme pode ser observado na FIGURA 28.

Inicialmente, acontece a oxidação do sítio ativo da enzima (HRPFe(III)) pelo H_2O_2 originando um composto intermediário HRPFe(IV)=O conforme é apresentado na Reação 1¹²³, o qual reage com a HQ resultando no retorno da enzima para a sua forma nativa HRPFe(III) e a formação da BQ (Reação 2), a qual é reduzida na superfície eletródica^{124,125,126} em um processo eletrocatalítico originando o sinal analítico proporcional à concentração do biomarcador miRNA-203 conforme é apresentado na Reação 3.



Os estudos de hibridização para formação do bioconjugado $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-HRP-DNA}_{\text{Cp}}$ foram realizados variando a concentração da DNA_{Cp} de 0,0

(ausência) a $25,0 \text{ nmol L}^{-1}$. Posteriormente, cada suspensão contendo os bioconjugados preparados em diferentes concentrações foram adicionados aos $\mu\text{SED-DNA}_{\text{Sd}}$ para realizar a incubação seguida das medidas eletroquímicas utilizando a técnica de amperometria em fluxo após a injeção da solução de detecção contendo HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em PBS $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$. A FIGURA 29 apresenta os amperogramas obtidos no estudo.

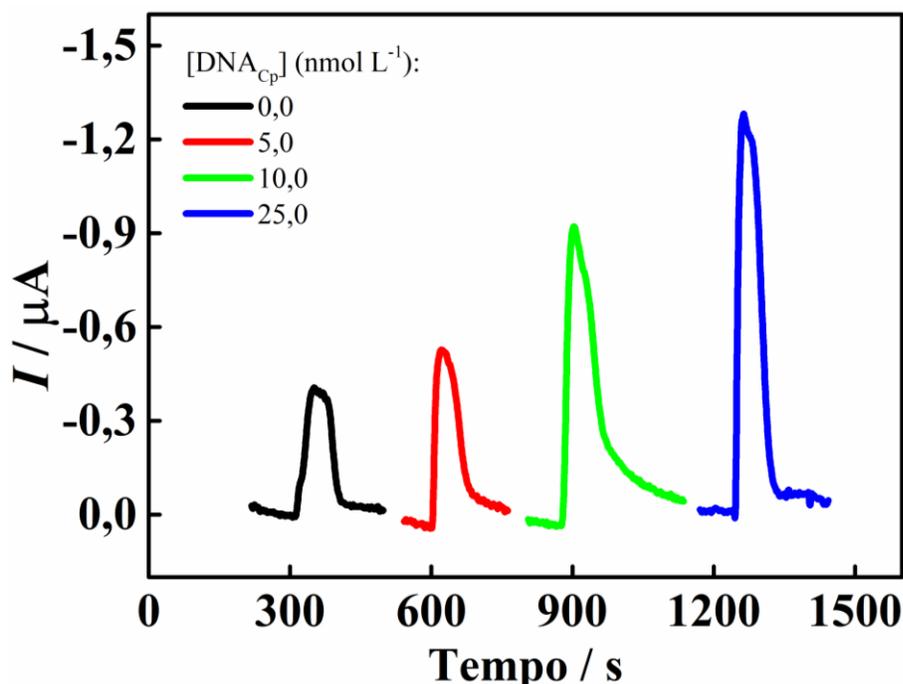


FIGURA 29 - Amperogramas registrados em diferentes concentrações de DNA_{Cp} utilizando o μSED . Vazão de $100 \mu\text{L min}^{-1}$, $E = -0,25 \text{ V}$, solução de detecção H_2O_2 $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ e HQ $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

A FIGURA 29 mostra claramente um aumento no sinal analítico com o aumento da concentração de DNA_{Cp} no processo de hibridização. Este efeito pode ser explicado pelo fato do aumento da concentração do biomarcador resultar em uma maior quantidade de sequências da DNA_{Sc} (presentes nas PMs) ligadas à DNA_{Cp} o que faz com que mais sequências na região terminal da DNA_{Sc} estejam disponíveis para sofrer hibridização na sequência complementar (DNA_{Sd}) ancorada na superfície do WE presente no $\mu\text{SED-DNA}_{\text{Sd}}$ e conseqüentemente um aumento na

resposta de corrente transiente, uma vez que quanto mais sequências se ligarem aos eletrodos no μ SED mais partículas magnéticas, oriundas do bioconjugado PM_{Sc} -HRP-DNA $_{Cp}$, estarão ligadas no μ SED-DNA $_{Sd}$ e por sua vez um maior número de enzimas HRP. Na FIGURA 29 é possível observar um sinal na ausência da DNA $_{Cp}$ (linha preta), esse efeito pode ser explicado pelo fato de que uma pequena quantidade do bioconjugado (PM_{Sc} -HRP) pode ser adsorvida no canal microfluídico do μ SED-DNA $_{Sd}$ (apesar da realização de lavagem com a solução carreadora de PBS-TW20 pH 6,5) originando uma resposta após a injeção da solução de detecção HQ e H $_2$ O $_2$.

Apesar dos resultados promissores apresentados com a marcação eletroquímica com a enzima HRP para a detecção do miRNA-203, este método necessita da realização da hibridização entre a DNA $_{Sc}$ e a DNA $_{Cp}$ separadamente das PMs e da enzima HRP, uma vez que esta enzima perde atividade com o aumento da temperatura, em aproximadamente 55 °C¹²⁷. O método necessita de uma etapa de aquecimento empregando 85 °C para promover a desnaturação e consequente abertura do anel da sequência de captura DNA $_{Sc}$. Portanto, utilizar PMs previamente conjugadas com a enzima HRP e a DNA $_{Sc}$ para realizar os ensaios de hibridização irá requerer uma etapa adicional após a captura do alvo o que resulta em um maior tempo (aproximadamente 45 min para o preparo das PMs) para a realização dos experimentos com possibilidade de perda do analito utilizando esta estratégia de detecção eletroquímica de miRNA-203.

Diante disso, outra estratégia de detecção eletroquímica do biomarcador miRNA-203 foi avaliada utilizando as AuNPs como marcador eletroquímico em virtude deste material ser compatível com biomoléculas, sendo que nesta estratégia a etapa de aquecimento não irá apresentar problemas vindo a ser promissor para o desenvolvimento de um método simples para detecção de miRNA, sem necessidade de realizar as etapas morosas da técnica de RT-PCR que

envolve a transcrição da sequência de RNA para DNA seguida da etapa de amplificação via reação de cadeia de polimerase.

4.3 - Estudos eletroquímicos preliminares com as AuNPs empregando os SEDs

Inicialmente, a fim de avaliar o comportamento eletroquímico das AuNPs foram realizadas medidas com os SEDs utilizando a técnica de DPV (do inglês, *Differential Pulse Voltammetry*) na ausência e na presença das AuNPs utilizando como eletrólito de suporte uma solução de HCl 0,2 mol L⁻¹, as medidas eletroquímicas utilizando AuNPs têm sido comumente realizadas utilizando HCl como eletrólito de suporte^{76,128,129}. A FIGURA 30 apresenta as curvas de DPV obtidas utilizando o SED.

Neste estudo, inicialmente foi realizada a aplicação de um potencial de +1,25 V durante 120 s resultando na oxidação do Au presente nas AuNPs para Au(III) que na presença dos íons Cl⁻ forma o íon complexo [AuCl₄]⁻, imediatamente após a oxidação eletroquímica, foi realizada uma varredura de potencial de +1,10 a -0,15 V, vs. Ag/AgCl originando um pico catódico (FIGURA 30, linha rosa) devido a redução do Au(III) para Au conforme é apresentado na Reação 4¹³⁰. A medida de DPV realizada na presença das AuNPs resultou no surgimento de um pico em aproximadamente 0,32 V oriundo do processo de redução do ouro presente nas AuNPs.



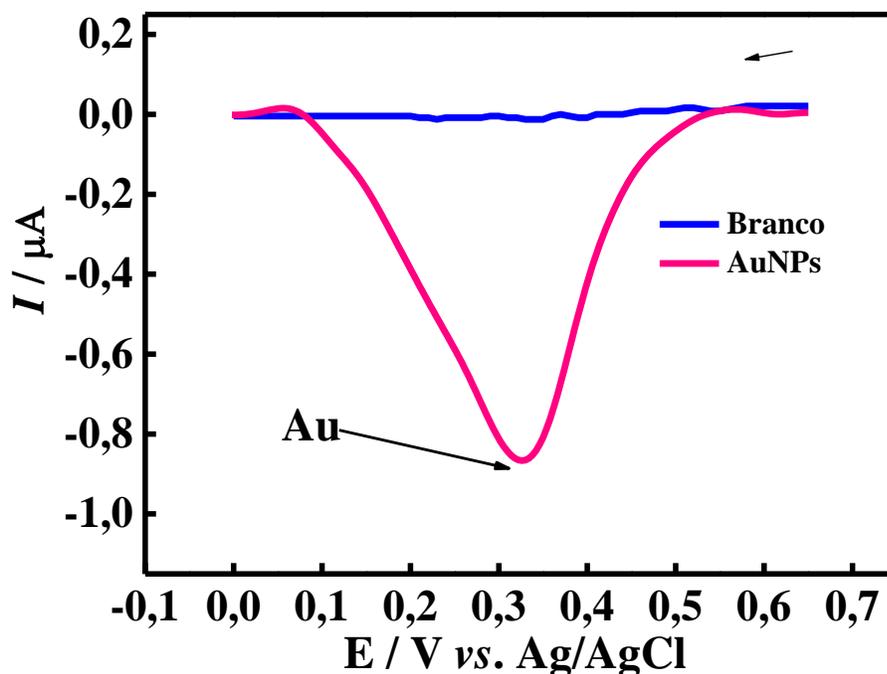


FIGURA 30 – Medidas de DPV registradas na ausência e presença de AuNPs em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ 1:1 (v/v). $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $\nu = 40 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$ e $a = 40 \text{ mV s}^{-1}$.

Posteriormente, foram realizados novos estudos eletroquímicos utilizando a técnica de SWV (do inglês, *Square Wave Voltammetry*) utilizando as AuNPs preparadas em solução aquosa de HCl nas mesmas condições anteriores conforme será apresentado no item a seguir.

4.4 - Otimização dos parâmetros eletroquímicos da SWV

Além da técnica de DPV, também foram realizados estudos utilizando a SWV na presença das AuNPs nas mesmas condições experimentais da FIGURA 30 a fim de obter uma maior intensidade de sinal analítico com uma melhor resolução de pico e maior rapidez nas medidas eletroquímicas. Para isto, inicialmente, realizaram-se medidas de SWV em diferentes valores de potencial de eletrodeposição (E_{dep}) e tempo de eletrodeposição (t_{dep}). A FIGURA 31-A apresenta

os voltamogramas obtidos em diferentes valores de t_{dep} utilizando $E_{\text{dep}} = +1,25$ V, ao passo que a FIGURA 31-B apresenta os valores de i_p medidos em diferentes E_{dep} e t_{dep} .

Na FIGURA 31-A é possível observar uma melhora significativa na intensidade de sinal e no perfil voltamétrico dos voltamogramas registrados para a suspensão de AuNPs em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ empregando a técnica de SWV. As medidas realizadas por DPV resultaram em uma menor intensidade de sinal e uma pior resolução de pico conforme apresentado na FIGURA 30. Assim, os voltamogramas registrados empregando a SWV apresentaram respostas com uma maior intensidade de corrente (5 vezes maior) e melhor perfil voltamétrico do que os registrados por DPV demonstrando que a SWV pode ser aplicada para a detecção da presença de AuNPs de forma rápida e adequada para o desenvolvimento do método eletroanalítico utilizando as AuNPs como marcador eletroquímico.

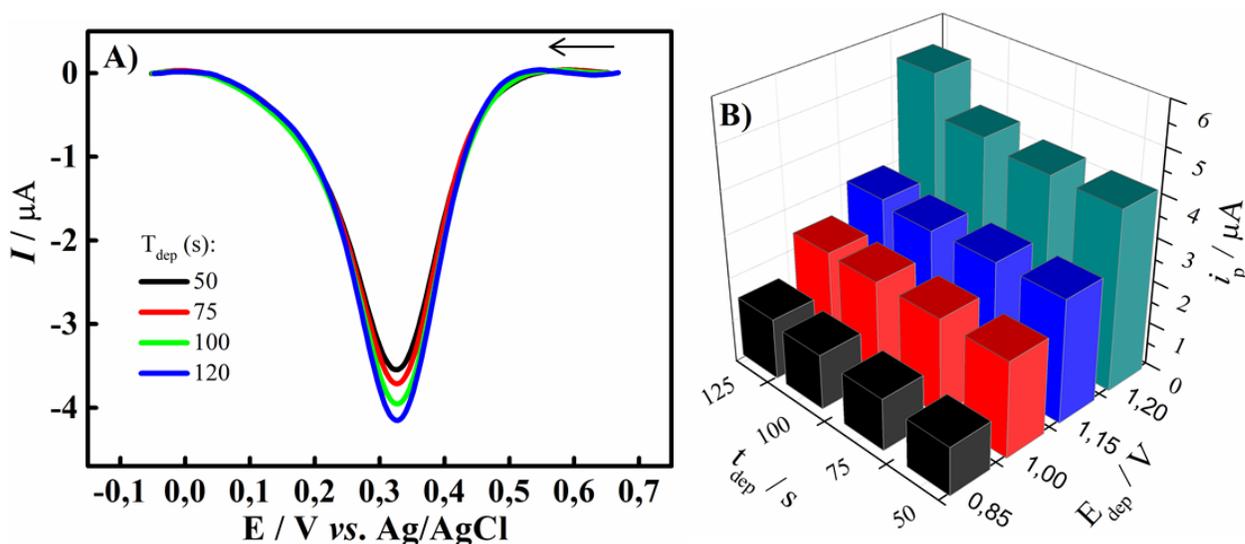


FIGURA 31 - A) Medidas de SWV registradas com as AuNPs em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando diferentes valores de t_{dep} . $E_{\text{dep}} = +1,25$ V, $f = 30$ Hz, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV. B) i_p medida para diferentes valores de E_{dep} e t_{dep} .

O aumento dos valores de E_{dep} e t_{dep} resultou em uma maior intensidade de sinal para o Au nas medidas voltamétricas realizadas por SWV, sendo que os maiores valores de i_p foram observados para as medidas realizadas com $E_{\text{dep}} = +1,25$ V e $t_{\text{dep}} = 120$ s conforme pode ser observado na FIGURA 31-B. Portanto, a SWV foi escolhida para a realização dos estudos subsequentes mantendo o valor de $E_{\text{dep}} = +1,25$ V e $t_{\text{dep}} = 120$ s empregando os SEDs.

As condições experimentais da FIGURA 31 foram mantidas para a realização dos estudos de otimização dos parâmetros da SWV. O primeiro parâmetro otimizado foi a frequência (f). Neste estudo, as medidas eletroquímicas foram realizadas variando a f de 10 a 50 Hz. Os voltamogramas obtidos neste estudo são apresentados na FIGURA 32.

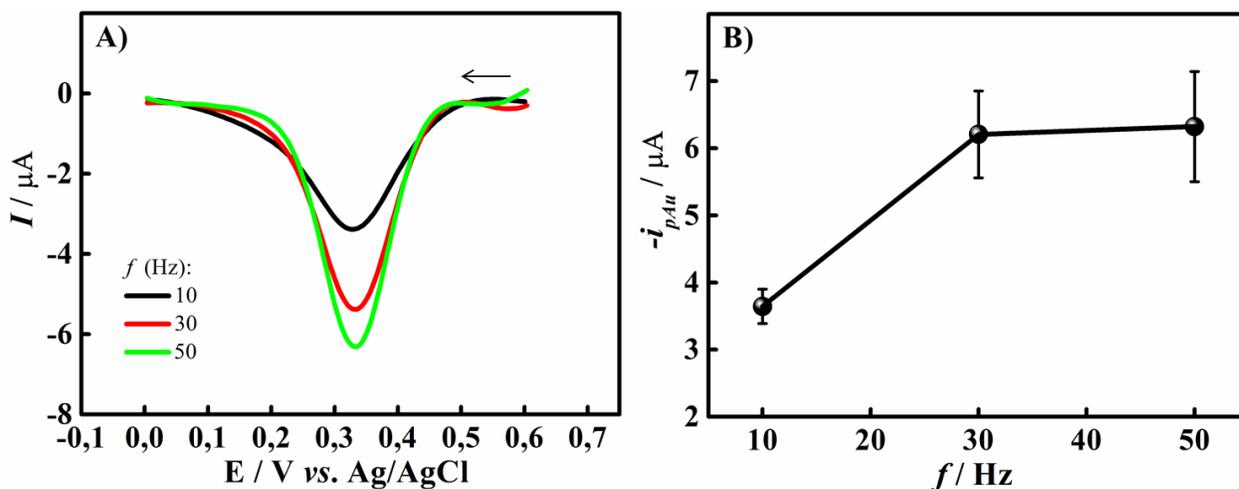


FIGURA 32 - A) SWV registrados com AuNPs em HCl utilizando diferentes valores de f . $E_{\text{dep}} = +1,25$ V, $t_{\text{dep}} = 120$ s, $a = 40$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV. B) $-i_{pAu}$ para os diferentes valores f .

Os voltamogramas apresentados na FIGURA 32-A demonstram um aumento nos picos de redução do ouro com o aumento dos valores de f de 10 a 50 Hz. No entanto, também ocorreu uma piora na repetitividade com o aumento deste parâmetro (FIGURA 32-B). O valor de f igual a 30 Hz apresenta uma melhora na intensidade de sinal com uma repetitividade (desvio padrão = 0,64)

melhor do que a apresentada utilizando $f = 50$ Hz (desvio padrão = 0,82) nas medidas eletroquímicas conforme apresentado na FIGURA 32-B. Assim, o valor de $f = 30$ Hz foi selecionado para a realização dos estudos subsequentes de otimização dos parâmetros da SWV.

Em seguida, avaliou-se a influência de diferentes valores de amplitude de pulso (a) na resposta para o ouro. Para isto, o parâmetro foi variado de 10 a 50 mV conforme apresenta a FIGURA 33. A FIGURA 33-A mostra claramente uma melhora na resposta quando o valor de a foi aumentando. Além disso, apresentou uma boa repetitividade nas medidas por SWV quando este parâmetro foi aumentado (ver FIGURA 33-B) apesar de ocorrer um pequeno alargamento nos picos de redução do ouro nos voltamogramas com o aumento dos valores de a (FIGURA 33-A). Assim, o valor de a igual a 50 mV foi escolhido uma vez que com este valor obteve-se uma maior intensidade de sinal sem prejudicar a repetitividade das medidas eletroquímicas.

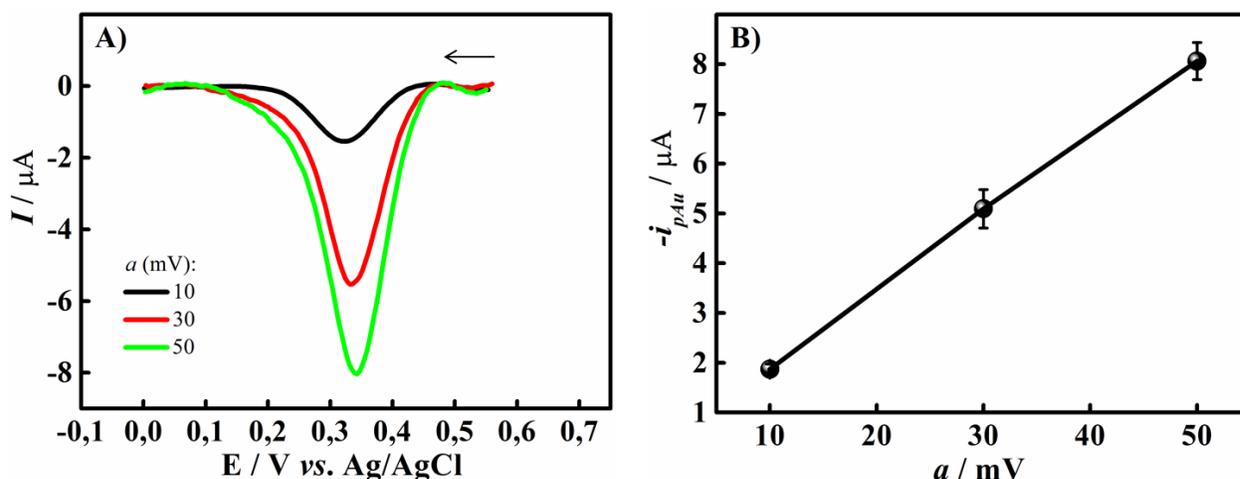


FIGURA 33 - A) Medidas de SWV registradas com AuNPs em HCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ utilizando diferentes valores de a . $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120\text{s}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. B) $-i_{pAu}$ para os diferentes valores de a .

Posteriormente, realizou-se a otimização do incremento de potencial (ΔE_s) variando o parâmetro de 1 a 3 mV conforme é apresentado na FIGURA 34-A e 34-B.

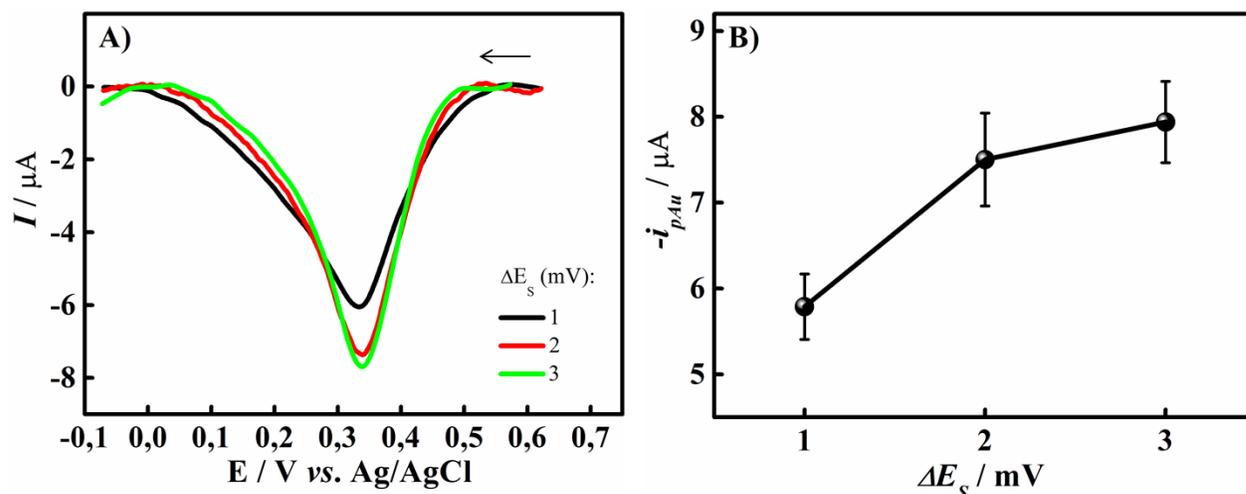


FIGURA 34 - A) SWV registradas com as AuNPs em HCl utilizando diferentes valores de ΔE_s . $E_{dep} = +1,25$ V, $t_{dep} = 120$ s, $f = 30$ Hz, $a = 50$ mV. B) $-i_{pAu}$ para os diferentes valores ΔE_s .

Na FIGURA 34-A e 34-B é possível observar um aumento no sinal analítico com o aumento no valor do ΔE_s . As medidas realizadas utilizando o $\Delta E_s = 3$ mV apresentaram respostas com valores de corrente maiores e com uma repetitividade melhor do que as medidas com $\Delta E_s = 2$ mV (FIGURA 34-B). Não foram avaliados valores de ΔE_s acima de 3 mV, pois observou-se uma pequena diferença de sinal nas medidas com ΔE_s igual a 2 e 3 mV. Entretanto, As medidas de SWV realizadas empregando $\Delta E_s = 3$ mV apresentaram melhor perfil voltamétrico e repetitividade (comparando com as medidas com $\Delta E_s = 2$ mV). Assim, o valor escolhido de ΔE_s foi igual a 3 mV.

A TABELA 4 apresenta a faixa avaliada e os parâmetros selecionados da SWV nos estudos de otimização.

TABELA 4 - Faixa avaliada e parâmetros otimizados da SWV.

Parâmetro	Faixa avaliada	Selecionado
E_{dep}	+0,85 a +1,25 V	+1,25 V
t_{dep}	50 a 120 s	120 s
f	10 a 50 Hz	30 Hz
a	10 a 50 mV	50 mV
ΔE_s	1 a 3 mV	3 mV

Portanto, os parâmetros otimizados para as medidas com a técnica de SWV foram: $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$. Com estes parâmetros as medidas voltamétricas mostraram-se rápidas, necessitando de apenas 120 s para serem realizadas e com picos de corrente de redução de Au(III) com um ótimo perfil. Assim, estas condições foram mantidas e empregadas nos ensaios para a detecção eletroquímica indireta do biomarcador miRNA-203 utilizando as AuNPs como marcador eletroquímico.

4.5 - Detecção do biomarcador miRNA-203

Após a otimização dos parâmetros da SWV foram realizados estudos para a captura do biomarcador miRNA-203 utilizando as PMs decoradas com a DNA_{Sc} (PM_{Sc}) e as AuNPs decoradas com a DNA_{Sd} (AuNP_{Sd}), de forma a obter a formação do bioconjugado PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNP_{Sd} conforme o procedimento descrito na Seção 3.5.1. Assim, os ensaios de hibridização utilizando a PM_{Sc}, DNA_{Cp} e AuNP_{Sd} foram realizados avaliando duas concentrações de DNA_{Cp}, 0,5 e 10,0 pmol L⁻¹. A detecção de DNA_{Cp} foi realizada após a adição do bioconjugado formado PM_{Sc}-DNA_{Cp}-AuNP_{Sd} no SED (contendo ímãs de neodímio posicionados na parte de trás de cada WE, ver FIGURA 13-K) utilizando uma solução de HCl 0,2 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte. Para isto, um volume de

10,0 μL da dispersão contendo o bioconjugado foi adicionado em cada WE do arranjo de 8 eletrodos do SED.

Após 5 min retirou-se o excesso de solução empregando papel absorvente e foram adicionados 75,0 μL de HCl 0,2 mol L^{-1} à cada CE do SED. Em seguida, foram realizadas as medidas utilizando a SWV aplicando um $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$ vs. pseudo-referência de Ag/AgCl por 120 s seguida da varredura de +1,10 a $-0,15 \text{ V}$ possibilitando a detecção eletroquímica por meio da redução eletroquímica do ouro presente no bioconjugado $\text{PM}_{\text{Sc}}\text{-DNA}_{\text{Cp}}\text{-AuNPs}_{\text{Ssd}}$, o qual foi previamente oxidado na etapa anterior, levando a formação de um pico em aproximadamente +0,3 V. Na FIGURA 35 são apresentados os voltamogramas utilizando a SWV registrados após a adição dos bioconjugados ao SED.

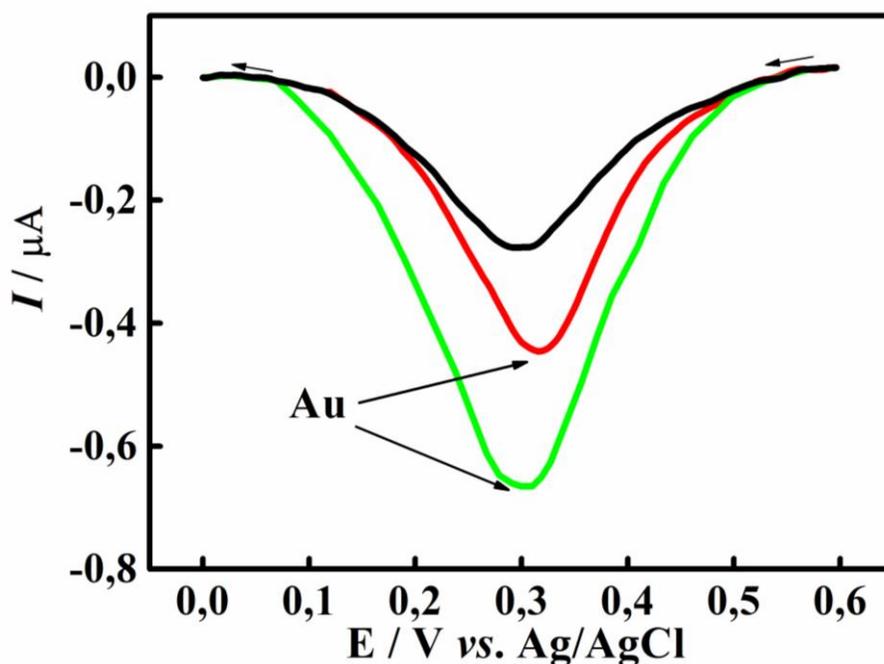


FIGURA 35 – SWV registrados com HCl 0,2 mol L^{-1} na (–) ausência de DNA_{Cp} e em diferentes concentrações de DNA_{Cp} para a formação do bioconjugado: (–) 0,5 e (–) 10,0 pmol L^{-1} . $E_{\text{dep}} = +1,25 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 120 \text{ s}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 3 \text{ mV}$, $f = 30 \text{ Hz}$.

Os voltamogramas de SWV apresentados na FIGURA 35 demonstram que um aumento na corrente de pico de redução do ouro ocorre quando a

concentração de DNA_{Cp} também é aumentada no processo de hibridação. Este efeito pode ser explicado pelo fato de que mais DNA_{Cp} foram capturadas via hibridização com a sequência de DNA_{Sc} ligada na PM_{Sc} deixando mais sequências terminais disponíveis para se ligar à DNA_{Sd} , imobilizada nas $AuNPs_{Sd}$, aumentando a quantidade de $AuNPs_{Sd}$ no bioconjugado, o que resulta em um aumento no pico de redução do ouro nas medidas de SVW.

A FIGURA 36 apresenta uma ilustração do processo de hibridização com a DNA_{Sc} (presente na PM_{Sc}) e o miRNA-203 seguido da ligação com a DNA_{Sd} (presente na $AuNPs_{Sd}$). Como a DNA_{Cp} apresenta a mesma sequência de nucleotídeos (ver TABELA 1) que o miRNA-203 com exceção das bases de U que são substituídas por bases T, a hibridização com a DNA_{Sc} ocorre tanto com a DNA_{Cp} quanto com o miRNA-203. Na FIGURA 36-A é possível observar a sequência da DNA_{Sc} na forma de um *hairpin loop* de DNA a qual forma um “laço” devido a sequência de nucleotídeos complementares nas regiões terminais da fita simples de DNA¹³¹. A sequência de DNA de captura foi elaborada de forma que a sequência de nucleotídeos da região central seja complementar a sequência do miRNA alvo (miRNA-203). Assim, com o aumento da temperatura ocorre a desnaturação e a abertura do “laço” no DNA de captura^{132,133}.

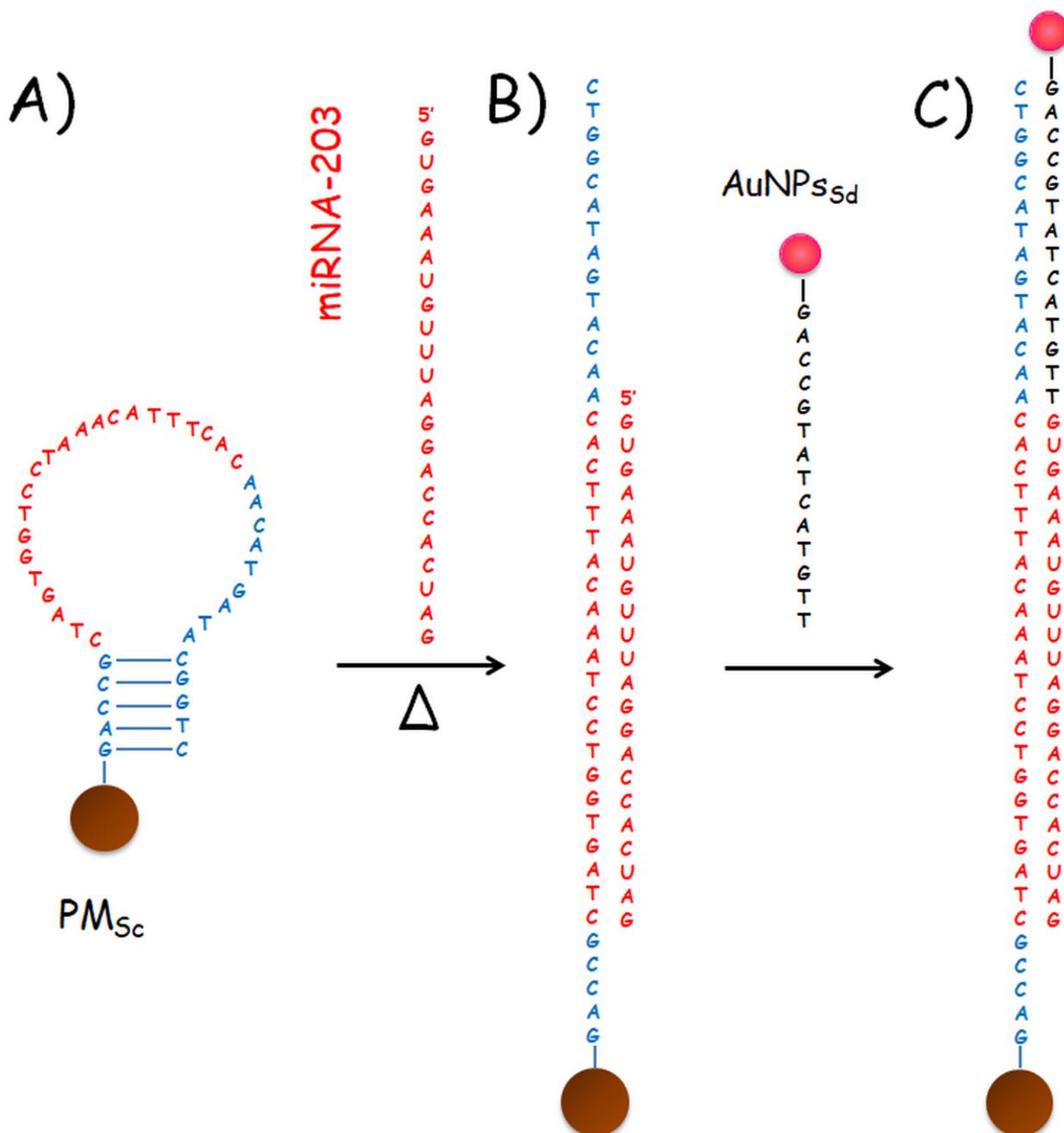


FIGURA 36 – Representação esquemática do processo de hibridização da DNA_{Sc} com o miRNA-203 seguido da ligação com a DNA_{Sd}.

Com o resfriamento da dispersão, os nucleotídeos na região central (em vermelho) da DNA_{Sc} estarão disponíveis para hibridizar com o miRNA-203 (FIGURA 36-B), uma vez que ambos são complementares. Assim as sequências de DNA_{Sc} que foram hibridizadas com o miRNA-203 não irão voltar a forma de uma

alça deixando livre a sequência de nucleotídeos nas regiões terminais. Assim posteriormente, é realizada a adição de uma nova sonda de DNA (DNA_{sd}) com uma sequência de nucleotídeos complementares à região terminal da sequência da DNA_{sc} possibilitando a ligação da DNA_{sd} na DNA_{sc} conforme pode ser visualizado na FIGURA 36-C. Diante disso, espera-se que o aumento da concentração de miRNA-203 resulte em um aumento do sinal analítico uma vez que irá aumentar a quantidade de AuNPs presentes no bioconjugado, conforme foi demonstrado na FIGURA 35.

Portanto, nota-se que o método eletroanalítico proposto apresenta uma resposta para a detecção eletroquímica indireta de miRNA-203, em que o método consegue diferenciar níveis de concentrações de miRNA-203 presentes no meio.

4.6 - Construção da curva analítica

Posteriormente, foram realizados novos estudos de hibridização empregando a solução padrão de DNA_{cp} variando a sua concentração no intervalo de 1,0 a 500,0 fmol L^{-1} a fim de construir uma curva analítica para a DNA_{cp} . Após a hibridização, os bioconjugados formados ($\text{PM}_{\text{sc}}\text{-DNA}_{\text{cp}}\text{-AuNPs}_{\text{sd}}$) utilizando diferentes concentrações de miRNA-203 foram adicionados ao SED para a realização das medidas eletroquímicas. Na FIGURA 37-A são apresentados os voltamogramas de SWV obtidos para diferentes concentrações de DNA_{cp} ao passo que na FIGURA 37-B é apresentada a curva analítica obtida para a DNA_{cp} .

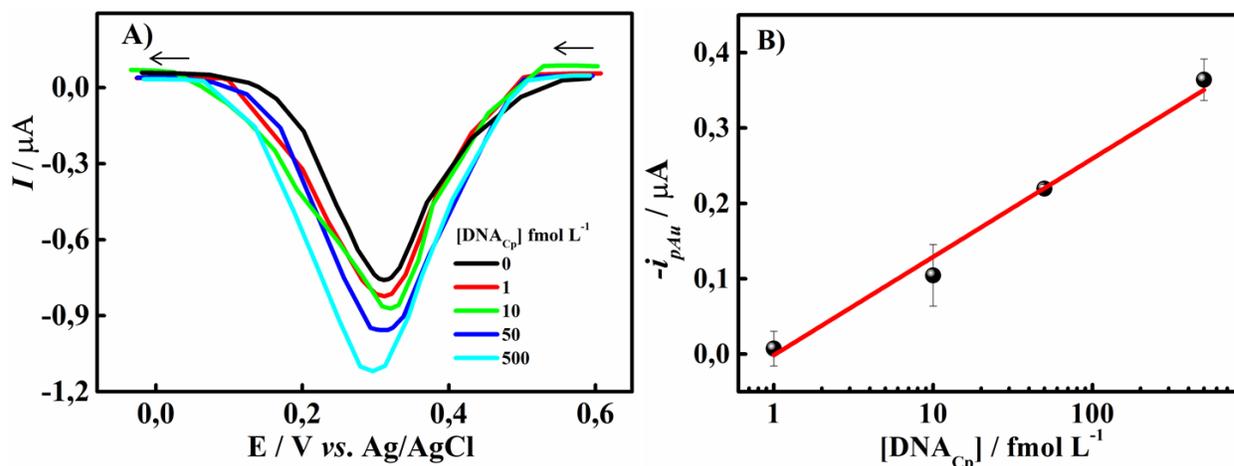


FIGURA 37 - A) SWV registrados em diferentes concentrações de DNA_{Cp} empregando HCl 0,2 mol L⁻¹. $E_{\text{dep}} = +1,25$ V, $t_{\text{dep}} = 120$ s, $a = 50$ mV, $\Delta E_s = 3$ mV, $f = 30$ Hz. B) Curva analítica obtida a partir dos dados de A).

A curva analítica obtida apresentou resposta linear no intervalo de 1,0 a 500,0 fmol L⁻¹ de acordo com a equação $-i_{pAu}$ (μA) = -0,001 + 0,130 log [DNA_{Cp}] (fmol L⁻¹) e com r^2 igual a 0,991. O limite de detecção (LD) do método foi calculado utilizando a Equação 2.

$$\text{LD} = \frac{3S_b}{m} \quad \text{Equação 2}$$

onde m é a inclinação da curva analítica e S_b , o desvio padrão do branco¹³⁴.

O desvio padrão do intercepto da curva analítica ($n = 4$) foi utilizado para estimar o valor do S_b ¹³⁵, o valor de LD calculado foi de 0,52 fmol L⁻¹, ou seja, 3,70 fg mL⁻¹. O limite de quantificação (LQ) foi calculado utilizando a Equação 3.

$$\text{LQ} = \frac{10S_b}{m} \quad \text{Equação 3}$$

O valor calculado de LQ encontrado foi de $1,57 \text{ fmol L}^{-1}$ ($10,82 \text{ fg mL}^{-1}$). Nota-se que os valores de LD e LQ calculados foram bastante coerentes, uma vez que o primeiro ponto da curva analítica é igual a $1,0 \text{ fmol L}^{-1}$ e o valor de LQ neste método está um pouco acima do primeiro ponto da curva analítica ($1,57 \text{ fmol L}^{-1}$).

No caso da amostra do branco (FIGURA 37-A, curva preta), foi realizada a hibridização da mesma maneira que para as diferentes concentrações de DNA_{Cp} da curva analítica (FIGURA 37-B), mas sem a adição de DNA_{Cp} na suspensão contendo as PM_{Sc} . Assim, a sequência de DNA_{Sc} presente na PM_{Sc} desnatura na etapa de aquecimento, mas como não há DNA_{Cp} para se ligar a ela, a fita simples hibridiza formando a alça novamente não permitindo ocorrer a hibridização com a DNA_{Sd} presente na AuNPs_{Sd} .

Analisando a FIGURA 37-A (curva preta), é possível observar que o branco apresentou um sinal analítico menor do que o sinal de todas as concentrações de DNA_{Cp} , esse baixo sinal analítico provavelmente se deve à ligação não efetiva de AuNPs_{Sd} ao bioconjugado, como por exemplo a adsorção das AuNPs_{Sd} no bioconjugado. No entanto, o sinal do branco não chega a apresentar problemas para o método desenvolvido, o que pode ser observado pelo excelente LD obtido e pela resposta linear em uma ampla faixa de concentrações de DNA_{Cp} . Além disso, o sinal do branco sempre foi descontado em todos os experimentos, o que permite o registro confiável apenas do sinal analítico do biomarcador presente no meio.

Vários métodos eletroanalíticos têm sido reportados na literatura para a detecção e quantificação de miRNAs. A TABELA 5 apresenta alguns métodos eletroquímicos relatados na literatura para a determinação de miRNAs e bem como o método proposto para comparação.

TABELA 5 - Métodos eletroanalíticos reportados para detecção de miRNA.

Tipo de Sensor	Técnica	LD / fmol L⁻¹	Referência
GCE com AuNPs e grafeno	Cronoamperometria	60	103
GCE com nano-Pd-miRNA	CV	1.870	136
EM com Au e DNA	EIS	1,0	137
EM com ITO	DPV	1.000	138
EM com Au e oligonucleotídeo	EIS	1,0	139
Eletrodo impresso de carbono	DPV	29.000	140
EM com oligonucleotídeo	SWV	56	141
Eletrodo de Au magnético	DPV	0,20	97
EM com Au e Mo	DPV	0,03	104
EG induzido a laser	DPV	10,0	142
SED Magnético	SWV	0,52	Este Trabalho

EM: eletrodo modificado, ITO: óxido de estanho dopado com índio, EG: eletrodo de grafeno, EIS: Espectroscopia de impedância eletroquímica.

Os métodos eletroanalíticos descritos na TABELA 5 apresentam valores de LD próximos ao encontrado pelo método proposto empregando o SED. Poucos métodos relatam valores de LD mais baixos do que o método proposto neste trabalho, como por exemplo, os métodos desenvolvidos por Wang *et al.*⁹⁷ e J. Zhang e X. Hun¹⁰⁴. O sensor desenvolvido por Wang *et al.*⁹⁷ não é um sensor descartável e os eletrodos precisam ser polidos com solução de alumina previamente a realização das medidas eletroquímicas, o que pode provocar problemas de contaminação e o fornecimento de resultados imprecisos na quantificação dos miRNAs dificultando a aplicação deste sensor em análises *point-of-care*. Além disso, o método é bastante demorado, a preparação das AuNPs modificadas com oligonucleotídeos necessita de mais de 50 h para finalização, o preparo das PM com as sondas de oligonucleotídeos envolveu tempos de 2 a 3 h e o

processo de hibridização com o miRNA foi realizado com 1 h. Ademais, o WE utilizado pelos autores também apresenta uma área eletroativa maior do que o utilizado nos SEDs, uma vez que o diâmetro do WE utilizado neste trabalho foi igual a 4 mm. Os autores obtiveram uma faixa linear de 5 a 600 fmol L⁻¹ para o miRNA-182 e de 1 a 800 fmol L⁻¹ para o miRNA-381, ou seja, apesar deste método apresentar um menor valor de LD, o primeiro ponto da curva analítica apresentado foi acima do obtido neste trabalho no caso do miRNA-182 e para o miRNA-381 o primeiro ponto da curva analítica deles foi igual ao apresentado neste trabalho. Portanto, o método desenvolvido pelos autores apresenta algumas limitações o que pode dificultar a aplicação deste método na determinação de miRNA.

J. Zhang e X. Hun¹⁰⁴ também desenvolveram um método moroso para a detecção dos miRNAs de aproximadamente 24 h para realizar o preparo do bioconjugado e hibridização com o miRNA, além de não utilizarem um SED sendo necessário realizar o polimento do WE. Além disso, o método utiliza solvente orgânico para a modificação do WE, o que deve ser evitado, devido a geração de resíduos tóxicos e a necessidade de cuidados especiais para a preparação do sensor.

Portanto, apesar de alguns dos métodos descritos na literatura apresentarem valores de LD menores do que o encontrado neste trabalho, estes métodos utilizam sensores que não são descartáveis além de empregar um maior tempo para a realização das medidas eletroquímicas e reagentes que podem ser nocivos à saúde. Além disso, os nanomateriais utilizados no método proposto são relativamente simples e já se encontra fabricantes no país destes compostos. Além disto, o método eletroanalítico proposto neste trabalho tem como principal vantagem a utilização de sensores descartáveis de baixo custo (o custo aproximado para produzir um SED é menor do que R\$ 0,50) com análises mais rápidas do que vários métodos eletroanalíticos descritos na

literatura e muito mais rápidas do que as análises utilizando RT-PCR que é o padrão ouro para detecção de miRNA e um custo muitas vezes mais baixo, devido a quantidade de insumos e etapas necessárias nesta técnica. O custo de uma análise com o método analítico proposto é de aproximadamente 40 reais (considerando todos os materiais empregados no método), a técnica de RT-PCR utilizada para o diagnóstico de COVID-19, por meio da detecção do RNA do vírus SARS-CoV-2 possui um custo que pode variar de 193 a 390 reais^{143,144,145}. Assim, o método analítico desenvolvido neste trabalho descreve um custo bastante inferior ao apresentado pela técnica de RT-PCR, possibilitando a aplicação do método para a quantificação de miRNAs com um custo bastante inferior ao da técnica de RT-PCR.

Apesar de o método desenvolvido para a detecção e quantificação de miRNA-203 neste trabalho também utilizar um tempo longo para o preparo das PM_{Sc} e $AuNPs_{Sd}$. Ambos os bioconjugados podem ser utilizados por várias semanas (armazenados a 4 °C e protegidos da luz) devido a estabilidade característica do DNA, principalmente quando comparado com proteínas, sendo necessário realizar apenas a hibridização e a marcação eletroquímica com as AuNPs durante as análises das amostras para a quantificação do biomarcador miRNA-203, o que torna o método proposto bastante atrativo para o diagnóstico de CCP. Assim, o método eletroanalítico proposto apresenta diversas vantagens frente aos métodos reportados na literatura as quais destacam a utilização de sensores descartáveis, análises rápidas e portabilidade.

4.7 - Quantificação de miRNA-203 em amostras de linhagens de células e linfonodos

Uma vez otimizados todos os parâmetros, o método proposto foi avaliado para a quantificação de miRNA-203 em amostras de linhagens de células tumorais. Todas as amostras de linhagens de células tumorais foram fornecidas pelo Hospital de Amor já previamente lisadas. Para controle negativo foram utilizadas amostras de linhagens de células T leucêmicas Jurkat¹⁴⁶ e como controle positivo amostras de linhagens de células derivadas de carcinoma epidermoide de língua (SCC25)¹⁴⁷. Os ensaios de hibridização foram realizados após a diluição das amostras em tampão HEPES 10,0 mmol L⁻¹ pH 7,0 (contendo NaCl 100,0 mmol L⁻¹, KCl 25,0 mmol L⁻¹ e MgCl₂ 10,0 mmol L⁻¹) para uma concentração final de RNA total igual a 0,1 pg L⁻¹ seguindo o mesmo procedimento realizado na construção da curva analítica. A concentração de miRNA-203 em todas as amostras não foi informada, apenas a concentração de RNA total em ng μL⁻¹. Assim, a unidade em ng μL⁻¹ foi adotada nos estudos de quantificação de miRNA-203, uma vez que as amostras de RNA total contém também outros miRNAs (desconhecidos) diferentes do miRNA-203 o que impossibilita a conversão da unidade em g L⁻¹ para mo L⁻¹.

A FIGURA 38 apresenta os valores obtidos para a quantificação de miRNA-203 nas amostras de linhagens de células Jurkat utilizadas como controle negativo e para controle positivo: SCC25-A e SCC25-B por meio da utilização da curva analítica. Na FIGURA 38 observa-se que o método eletroanalítico desenvolvido consegue diferenciar os níveis de concentração de miRNA-203 nas amostras de linhagens celulares, uma vez que a quantidade encontrada do biomarcador nas amostras controle negativo é bastante baixa quando comparada à quantidade encontrada nas amostras controle positivo (SCC25-A e SCC25-B). As

amostras de linhagem de células Jurkat e SCC25-A possuem uma quantidade de RNA total igual a $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e a amostra SCC25-B apresenta uma quantidade de RNA total de $37 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

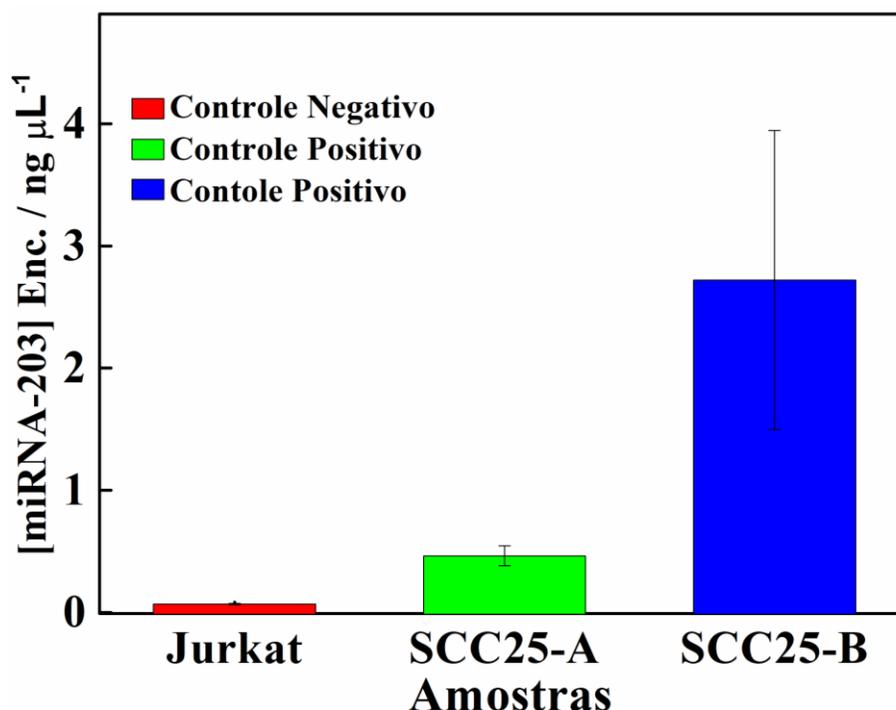


FIGURA 38 - Concentrações encontradas de miRNA-203 nas amostras de linhagens celulares Jurkat, SCC25-A e SCC25-B.

Portanto, as quantidades determinadas de miRNA-203 nas amostras são coerentes, uma vez que a amostra com maior quantidade de RNA total (SCC25-B, $37 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) apresenta uma maior quantidade de miRNA-203 conforme pode ser observado na FIGURA 38 (coluna azul). Além disso, estas amostras possuem outros miRNAs além do miRNA-203, o que mostra claramente a seletividade do método eletroanalítico desenvolvido para a quantificação de miRNA-203, uma vez que a PM_{Sc} possui a DNA_{Sc} projetada para capturar apenas o miRNA-203 (ver FIGURA 36).

Posteriormente, o método eletroanalítico proposto também foi empregado para a quantificação de miRNA-203 em amostras de RNA total obtidas

a partir de linfonodos de indivíduos saudáveis e pacientes portadores de CCP. A análise das amostras de 18 indivíduos foi realizada baseado em estudo duplo-cego sendo os resultados obtidos pelo método nas amostras com códigos aleatórios e posteriormente comparados com os resultados fornecidos pelo CPOM. Os resultados obtidos pelo método proposto e pelo método comparativo de RT-PCR, realizado pelo CPOM do HA, são apresentados na FIGURA 39.

Os resultados apresentados na FIGURA 39 demonstram que o método eletroanalítico proposto é capaz de diferenciar os níveis do biomarcador miRNA-203 presente nas amostras de pacientes, pois há uma grande diferença do valor encontrado de miRNA-203 quando se compara a quantidade obtida pelas amostras de pacientes saudáveis e portadores de CCP. Além disso, ao comparar os valores encontrados de miRNA-203 nas amostras de pacientes (saudáveis e portadores de CCP) com as respostas obtidas pelo método de RT-PCR, nota-se que os resultados são concordantes conforme pode ser observado na FIGURA 39.

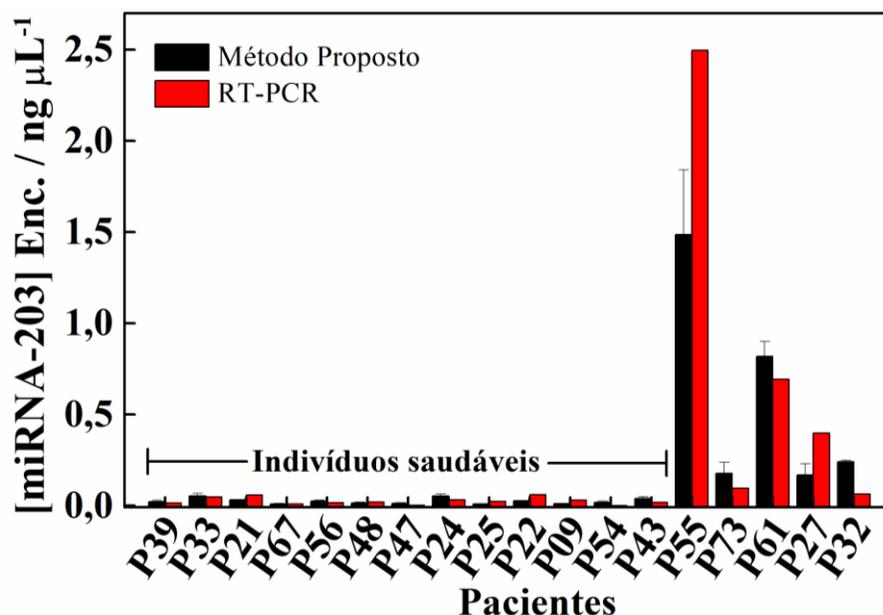


FIGURA 39 - Concentrações encontradas de miRNA-203 obtidas com o método proposto e os resultados obtidos por RT-PCR nas amostras de linfonodos de pacientes com CCP.

Os valores encontrados de miRNA-203 possuem discrepância na comparação com os sinais obtidos por RT-PCR em algumas análises, o que pode ser justificado pelo fato desses resultados (RT-PCR) apresentarem apenas uma réplica da análise de cada amostra ao passo que os resultados apresentados com o método eletroanalítico proposto descrevem o valor médio da concentração de miRNA-203 encontrada com desvio padrão.

Portanto, o método proposto utilizando SED pode ser utilizado como uma alternativa de baixo custo e rápida para o diagnóstico de CCP. O método proposto apresenta uma vantagem adicional ao RT-PCR que é o fato de o método permitir quantificar o biomarcador nas amostras de pacientes e não apenas realizar a comparação de sinais entre pacientes controle e portadores da doença como é o caso da técnica de RT-PCR, uma vez que ela trabalha com porcentagem e não concentração de miRNA. Além disso, o método aqui proposto permite a detecção de miRNAs diretamente sem a necessidade das etapas de transcrição dos miRNAs em cDNA e de amplificação que requerem uma quantidade significativa de insumos e de tempo para serem realizadas. Sabendo-se a concentração real do biomarcador na amostra, pode-se então realizar um diagnóstico mais confiável, rápido e preciso. O método proposto pode ser utilizado para outros miRNAs, tanto em amostras de sangue quanto em amostras de tecido, sendo necessário apenas modificar a sequência de nucleotídeo na região da alça no DNA *hairpin*.

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

5 - CONCLUSÕES

A utilização do sistema microfluídico para a detecção do biomarcador miRNA-203 não foi promissora, em virtude da necessidade de aquecimento para a hibridização do miRNA-203 com a DNA_{Sc}, uma vez que a HRP precisa ser imobilizada nas PMs após a etapa de aquecimento para garantir a utilização da enzima de forma segura sem a perda de sua atividade. Assim, a utilização deste tipo de sistema gera um maior consumo tanto de PMs quanto de marcador eletroquímico se comparado ao sistema de detecção utilizando o SED e as AuNPs como marcador eletroquímico. Além disso, esse método necessita da utilização de gás N₂ e bomba microfluídica o que pode dificultar a portabilidade do dispositivo comprometendo a sua utilização em análises *point-of-care*.

O novo método proposto para a captura de miRNA-203 foi aplicado com sucesso demonstrando a formação do bioconjugado PM_{Sc}-miRNA203-AuNPs_{Sd} através dos ensaios de hibridização o qual foi confirmado pelas medidas eletroquímicas, MET e EDX. O método eletroanalítico proposto empregando o SED pode ser empregado como uma alternativa rápida e de baixo custo para o diagnóstico de CCP podendo também ser adaptado para o diagnóstico de outras doenças por meio da detecção de miRNAs como biomarcadores. O custo aproximado para fabricação de um SED é menor do que R\$ 0,50 (US\$ 0,09), como o SED possui 8 células eletroquímicas cada célula eletroquímica apresenta um custo de menos de R\$ 0,06. Os SEDs são de rápida e fácil fabricação podendo ser facilmente fabricados em grande escala. Além disso, cada SED permite a realização de 8 medidas eletroquímicas de diferentes amostras, ou mesmo, utilizar 5 células para a curva analítica as outras 3 para as amostras o que é uma vantagem em relação aos dispositivos com somente um sensor.

Atualmente, a técnica de RT-PCR tem sido amplamente empregada para o diagnóstico de COVID-19, por meio da detecção do RNA do vírus SARS-

CoV-2. Este tipo de análise apresenta um custo que pode chegar a 390 reais¹⁴⁵ e na maioria dos casos as amostras precisam ser transportadas para outras cidades devido à indisponibilidade dos equipamentos para as análises de RT-PCR. Cada análise utilizando o método analítico proposto apresenta um custo de aproximadamente 40 reais (considerando as oito réplicas do SED), ou seja, um custo bastante inferior ao apresentado pela técnica de RT-PCR, o que indica que o método desenvolvido pode ser uma alternativa de baixo custo bastante atrativa para análises de amostras contendo miRNAs.

Ademais, o método eletroanalítico desenvolvido possui uma vantagem adicional em relação às análises realizadas por RT-PCR, que é o fato de o método ser capaz de quantificar o biomarcador miRNA-203 em amostras de pacientes, e não apenas realizar a comparação de sinais entre pacientes controle (saudáveis) e doentes como no caso das análises realizadas por RT-PCR. Apesar de o método ter sido aplicado apenas para amostras de linhagens celulares e de linfonodos, o método também pode ser aplicado em outras amostras biológicas tais como plasma sanguíneo, saliva e secreções corporais, uma vez que o método é ultrasensível para a detecção de miRNA-203, apresentando um baixo LD igual a $0,52 \text{ fmol L}^{-1}$.

Portanto, o método proposto neste trabalho permite a detecção e quantificação direta de miRNA-203, ou seja, sem a necessidade das etapas de transcrição dos miRNAs em cDNA e de amplificação que são morosas e requerem uma quantidade de insumos significativa. Conhecendo a concentração dos biomarcadores miRNA na amostra, é possível realizar um diagnóstico de CCP mais confiável e preciso.

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Câncer. "Estatísticas de câncer". Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em 12 de fevereiro de 2020.
2. GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J., "Cancer metastasis: building a framework". *Cell*, **127** (4): 679-695, 2006.
3. BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A., "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries". *CA: a cancer journal for clinicians*. **68**: 394-424, 2018.
4. GAUDET, M.; OLSHAN, A.; POOLE, C.; WEISSLER, M.; WATSON, M.; BELL, D., "Diet, GSTM1 and GSTT1 and head and neck cancer". *Carcinogenesis*, **25** (5): 735-740, 2004.
5. BLOT, W. J.; MCLAUGHLIN, J. K.; WINN, D. M.; AUSTIN, D. F.; GREENBERG, R. S.; PRESTON-MARTIN, S.; BERNSTEIN, L.; SCHOENBERG, J. B.; STEMHAGEN, A.; FRAUMENI, J. F., "Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer". *Cancer research*. **48**: 3282-3287, 1988.
6. ORGANIZATION, W. H.; CANCER, I. A. F. R. O., *Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-nitrosamines*. Lyon, IARC Press, 2007. p. 626.
7. MAIER, H.; ZÖLLER, J.; HERRMANN, A.; KREISS, M.; HELLER, W.-D., "Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer". *Otolaryngology—Head and Neck Surgery*. **108**: 655-661, 1993.
8. CHANG, J. S.; LO, H.-I.; WONG, T.-Y.; HUANG, C.-C.; LEE, W.-T.; TSAI, S.-T.; CHEN, K.-C.; YEN, C.-J.; WU, Y.-H.; HSUEH, W.-T., "Investigating the association between oral hygiene and head and neck cancer". *Oral Oncology*, **49** (10): 1010-1017, 2013.
9. D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W. M.; WESTRA, W. H.; GILLISON, M. L., "Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer". *New England Journal of Medicine*, **356** (19): 1944-1956, 2007.

10. D'SOUZA, G.; AGRAWAL, Y.; HALPERN, J.; BODISON, S.; GILLISON, M. L., "Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection". *International Journal of Infectious Diseases*, **199** (9): 1263-1269, 2009.
11. NEGRI, E.; BOFFETTA, P.; BERTHILLER, J.; CASTELLSAGUE, X.; CURADO, M. P.; MASO, L. D.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WÜNSCH-FILHO, V., "Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium". *International Journal of Cancer*, **124**: 394-401, 2009.
12. PEHLIVAN, M.; GURBUZ, M. K.; CINGI, C.; ADAPINAR, B.; DEĞIRMENCI, A. N.; ACIKALIN, F. M.; PINARBAŞLI, M. Ö.; COLAK, E., "Diagnostic role of ultrasound elastography on lymph node metastases in patients with head and neck cancer". *Brazilian journal of otorhinolaryngology*. **85**: 297-302, 2019.
13. CHUNG, C. S.; LO, W. C.; LEE, Y. C.; WU, M. S.; WANG, H. P.; LIAO, L. J., "Image-enhanced endoscopy for detection of second primary neoplasm in patients with esophageal and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis". *Head Neck*, **38** (S1): E2343-E2349, 2016.
14. FORGHANI, R.; KELLY, H. R.; CURTIN, H. D., "Applications of dual-energy computed tomography for the evaluation of head and neck squamous cell carcinoma". *Neuroimaging Clinics*, **27** (3): 445-459, 2017.
15. NOIJ, D. P.; MARTENS, R. M.; MARCUS, J. T.; DE BREE, R.; LEEMANS, C. R.; CASTELIJNS, J. A.; DE JONG, M. C.; DE GRAAF, P., "Intravoxel incoherent motion magnetic resonance imaging in head and neck cancer: A systematic review of the diagnostic and prognostic value". *Oral oncology*. **68**: 81-91, 2017.
16. STRIMBU, K.; TAVEL, J. A., "What are Biomarkers?". *Current opinion in HIV and AIDS*. **5**: 463-466, 2010.
17. HOOPER, C.; LOVESTONE, S.; SAINZ-FUERTE, R., "Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers". *Biomarker Insights*, **3**: 317-323, 2008.
18. RIFAI, N.; GILLETTE, M. A.; CARR, S. A., "Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility". *Nature biotechnology*, **24**: 971-983, 2006.

19. SCHWARZ, M.; SPECTOR, L.; GORTLER, M.; WEISSHAUS, O.; GLASS-MARMOR, L.; KARNI, A.; DOTAN, N.; MILLER, A., "Serum anti-Glc (α 1, 4) Glc (α) antibodies as a biomarker for relapsing–remitting multiple sclerosis". *Journal of the neurological sciences*, **244**: 59-68, 2006.
20. THAKUR, B. K.; ZHANG, H.; BECKER, A.; MATEI, I.; HUANG, Y.; COSTA-SILVA, B.; ZHENG, Y.; HOSHINO, A.; BRAZIER, H.; XIANG, J., "Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection". *Cell research*, **24**: 766-769, 2014.
21. LI, Y.; ZHENG, Q.; BAO, C.; LI, S.; GUO, W.; ZHAO, J.; CHEN, D.; GU, J.; HE, X.; HUANG, S., "Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis". *Cell research*, **25**: 981-984, 2015.
22. DUTTAGUPTA, R.; JIANG, R.; GOLLUB, J.; GETTS, R. C.; JONES, K. W., "Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures". *PLoS One*, **6** (6): e20769, 2011. 2011.
23. HE, L.; HANNON, G. J., "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation". *Nature Reviews Genetics*, **5**: 522-531, 2004.
24. FABIAN, M. R.; SONENBERG, N., "The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC". *Nature Structural & Molecular Biology*, **19** (6): 586, 2012.
25. SAJ, A.; LAI, E. C., "Control of microRNA biogenesis and transcription by cell signaling pathways". *Current opinion in genetics & development*. **21**: 504-510, 2011.
26. BARTEL, D. P., "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". *cell*. **136**: 215-233, 2009.
27. CHIN, L. J.; SLACK, F. J., "A truth serum for cancer—microRNAs have major potential as cancer biomarkers". *Cell Research*, **18** (10): 983-984, 2008.
28. MONTANI, F.; BIANCHI, F., "Circulating Cancer Biomarkers: The Macro-revolution of the Micro-RNA". *EBioMedicine*, **5**: 4-6, 2016.
29. ASLAM, M.; TAYLOR, K.; PRINGLE, J.; JAMESON, J., "MicroRNAs are novel biomarkers of colorectal cancer". *British Journal of Surgery*. **96**: 702-710, 2009.

30. TRIPATHI, R.; SONI, A.; VARADWAJ, P. K., "Integrated analysis of dysregulated lncRNA expression in breast cancer cell identified by RNA-seq study". *Non-coding RNA Research*, **1** (1): 35-42, 2016.
31. ROBERTS, M. J.; RICHARDS, R. S.; CHOW, C. W.; DOI, S. A.; SCHIRRA, H. J.; BUCK, M.; SAMARATUNGA, H.; PERRY-KEENE, J.; PAYTON, D.; YAXLEY, J., "Prostate-based biofluids for the detection of prostate cancer: A comparative study of the diagnostic performance of cell-sourced RNA biomarkers". *Prostate International*, **4** (3): 97-102, 2016.
32. KOJIMA, M.; SUDO, H.; KAWAUCHI, J.; TAKIZAWA, S.; KONDOU, S.; NOBUMASA, H.; OCHIAI, A., "MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers". *PLoS One*, **10**: e0118220, 2015.
33. WU, Y.-S.; LIN, H.; CHEN, D.; YI, Z.; ZENG, B.; JIANG, Y.; REN, G., "A four-miRNA signature as a novel biomarker for predicting survival in endometrial cancer". *Gene*, **697**: 86-93, 2019.
34. MAZUMDER, S.; DATTA, S.; RAY, J. G.; CHAUDHURI, K.; CHATTERJEE, R., "Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer". *Cancer epidemiology*, **58**: 137-145, 2019.
35. PANT, N.; RAKSHIT, S.; PAUL, S.; SAHA, I., "Genome-wide analysis of multi-view data of miRNA-seq to identify miRNA biomarkers for stomach cancer". *Journal of biomedical informatics*, **97**: 103254, 2019.
36. KUMARASAMY, C.; MADHAV, M. R.; SABARIMURUGAN, S.; KRISHNAN, S.; BAXI, S.; GUPTA, A.; GOTHANDAM, K.; JAYARAJ, R., "Prognostic Value of miRNAs in Head and Neck Cancers: A Comprehensive Systematic and Meta-Analysis", *Cells*, **8**: 772, 2019.
37. ROMO-GARCÍA, M.; BASTIAN, Y.; ZAPATA-ZUÑIGA, M.; MACÍAS-SEGURA, N.; CASTILLO-ORTIZ, J.; LARA-RAMÍREZ, E.; FERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BERLANGA-TAYLOR, A.; GONZÁLEZ-AMARO, R.; RAMOS-REMUS, C., "Identification of putative miRNA biomarkers in early rheumatoid arthritis by genome-wide microarray profiling: A pilot study". *Gene*, **720**: 144081, 2019.

38. ABDEL-AL, A.; EL-AHWANY, E.; ZOHEIRY, M.; HASSAN, M.; OUF, A.; ABU-TALEB, H.; RAHIM, A. A.; EL-TALKAWY, M. D.; ZADA, S., "miRNA-221 and miRNA-222 are promising biomarkers for progression of liver fibrosis in HCV Egyptian patients". *Virus research*, **253**: 135-139, 2018.
39. BISWAS, S.; HALEYURGIRISETTY, M.; LEE, S.; HEWLETT, I.; DEVADAS, K., "Development and validation of plasma miRNA biomarker signature panel for the detection of early HIV-1 infection". *EBioMedicine*, **43**: 307-316, 2019.
40. STRIMBU, K.; TAVEL, J. A., "What are biomarkers?". *Current Opinion in HIV and AIDS*, **5**: 463, 2010.
41. OBAYASHI, M.; YOSHIDA, M.; TSUNEMATSU, T.; OGAWA, I.; SASAHIRA, T.; KUNIYASU, H.; IMOTO, I.; ABIKO, Y.; XU, D.; FUKUNAGA, S., "microRNA-203 suppresses invasion and epithelial-mesenchymal transition induction via targeting NUA1 in head and neck cancer". *Oncotarget*, **7**: 8223, 2016.
42. DE CARVALHO, A. C.; SCAPULATEMPO-NETO, C.; MAIA, D. C. C.; EVANGELISTA, A. F.; MORINI, M. A.; CARVALHO, A. L.; VETTORE, A. L., "Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma". *BMC Medicine*, **13** (1): 108, 2015.
43. VÁRALLYAY, É.; BURGYÁN, J.; HAVELDA, Z., "MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes". *Nature Protocols*, **3**: 190-196, 2008.
44. KOSCIANSKA, E.; STAREGA-ROSLAN, J.; SZNAJDER, L. J.; OLEJNICZAK, M.; GALKA-MARCINIAK, P.; KRZYZOSIAK, W. J., "Northern blotting analysis of microRNAs, their precursors and RNA interference triggers". *BMC Molecular Biology*, **12**: 2011.
45. DE LA ROSA, C.; REYES, J. L., Northern Blot Analysis of microRNAs and Other Small RNAs in Plants. In: *Plant MicroRNAs*. New York, Humana Press, 2019. p. 121-129.

46. VARKONYI-GASIC, E.; WU, R. M.; WOOD, M.; WALTON, E. F.; HELLENS, R. P., "Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs". *Plant Methods*, **3**: 2007.
47. JAMES, A. M.; BAKER, M. B.; BAO, G.; SEARLES, C. D., "MicroRNA detection using a double molecular beacon approach: distinguishing between miRNA and Pre-miRNA". *Theranostics*, **7** (3): 634, 2017.
48. SMOCZYNSKA, A.; SEGA, P.; STEPIEN, A.; KNOP, K.; JARMOLOWSKI, A.; PACAK, A.; SZWEYKOWSKA-KULINSKA, Z., miRNA detection by stem-loop RT-qPCR in studying microRNA biogenesis and microRNA responsiveness to abiotic stresses. In: *Plant MicroRNAs*, New York, Humana Press, 2019; p. 131-150.
49. YANG, T. H.; OU, D. L.; HSU, C.; HUANG, S. H.; CHANG, P. L., "Comparative microRNA detection from precursor-microRNA-transfected hepatocellular carcinoma cells by capillary electrophoresis with dual-color laser-induced fluorescence". *Electrophoresis*, **33**: 2769-2776, 2012.
50. YAMAMURA, S.; YATSUSHIRO, S.; YAMAGUCHI, Y.; ABE, K.; SHINOHARA, Y.; KATAOKA, M., "Detection of miRNA in cell cultures by using microchip electrophoresis with a fluorescence-labeled Riboprobe". *Sensors*, **12**: 7576-7586, 2012.
51. SUN, Y.; GREGORY, K. J.; CHEN, N. G.; GOLOVLEV, V., "Rapid and direct microRNA quantification by an enzymatic luminescence assay". *Analytical biochemistry*, **429**: 11-17, 2012.
52. ZHANG, D.; YAN, Y.; CHENG, W.; ZHANG, W.; LI, Y.; JU, H.; DING, S., "Streptavidin-enhanced surface plasmon resonance biosensor for highly sensitive and specific detection of microRNA". *Microchimica Acta*, **180**: 397-403, 2013.
53. WU, J.; YAN, F.; TANG, J. H.; ZHAI, C.; JU, H. X. "A disposable multianalyte electrochemical immunosensor array for automated simultaneous determination of tumor markers". *Clinical Chemistry*, **53**: 1495-1502, 2007.
54. YIN, B.-C.; LIU, Y.-Q.; YE, B.-C. "One-step, multiplexed fluorescence detection of microRNAs based on duplex-specific nuclease signal amplification". *Journal of the American Chemical Society*, **134**: 5064-5067, 2012.

55. LABIB, M.; BEREZOVSKI, M. V. "Electrochemical sensing of microRNAs: avenues and paradigms". *Biosensors and Bioelectronics*, **68**: 83-94, 2015.
56. BUI, M.-P. N.; BROCKGREITENS, J.; AHMED, S.; ABBAS, A., "Dual detection of nitrate and mercury in water using disposable electrochemical sensors". *Biosensors and Bioelectronics*, **85**: 280-286, 2016.
57. CHEN, J.-C.; SHIH, J.-L.; LIU, C.-H.; KUO, M.-Y.; ZEN, J.-M. "Disposable electrochemical sensor for determination of nitroaromatic compounds by a single-run approach". *Analytical Chemistry*, **78**: (11): 3752-3757, 2006.
58. SHARMA, P.; SABLOK, K.; BHALLA, V.; SURI, C. R. "A novel disposable electrochemical immunosensor for phenyl urea herbicide diuron". *Biosensors and Bioelectronics*, **26**: 4209-4212, 2011.
59. GARCÍA, M.; ESCARPA, A., "Disposable electrochemical detectors based on nickel nanowires for carbohydrate sensing". *Biosensors and Bioelectronics*, **26** (5): 2527-2533, 2011.
60. SONG, W.; LI, H.; LIU, H.; WU, Z.; QIANG, W.; XU, D. "Fabrication of streptavidin functionalized silver nanoparticle decorated graphene and its application in disposable electrochemical sensor for immunoglobulin E". *Electrochemistry communications*, **31**: 16-19, 2013.
61. MARRAZZA, G.; CHIANELLA, I.; MASCINI, M. "Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection". *Biosensors and Bioelectronics*, **14**: 43-51, 1999.
62. ZOUARI, M.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J.; RAOUAFI, N., "Competitive RNA-RNA hybridization-based integrated nanostructured-disposable electrode for highly sensitive determination of miRNAs in cancer cells". *Biosensors and Bioelectronics*, **91**: 40-45, 2017.
63. SHANMUGAM, N. R.; MUTHUKUMAR, S.; PRASAD, S. "Ultrasensitive and low-volume point-of-care diagnostics on flexible strips—a study with cardiac troponin biomarkers". *Scientific reports*, **6**: 33423, 2016.
64. HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P., "Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **22** (7): 456-469, 2003.

65. THIYAGARAJAN, N.; CHANG, J.-L.; SENTHILKUMAR, K.; ZEN, J.-M., "Disposable electrochemical sensors: A mini review". *Electrochemistry communications*, **38**: 86-90, 2014.
66. KOKKINOS, C.; ECONOMOU, A.; GIOKAS, D. "based device with a sputtered tin-film electrode for the voltammetric determination of Cd (II) and Zn (II)". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **260**: 223-226, 2018.
67. TORTORICH, R. P.; SHAMKHALICHENAR, H.; CHOI, J.-W., "Inkjet-printed and paper-based electrochemical sensors". *Applied Sciences*, **8**: 288, 2018.
68. JANEKZEK, K.; KOZIOŁ, G.; JAKUBOWSKA, M.; ARAŻNA, A.; MŁOŻNIAK, A.; FUTERA, K. "Assessment of electromechanical properties of screen printed polymer nanopastes". *Materials Science and Engineering: B*. **178**: 511-519, 2013.
69. CARVALHAL, R. F.; SIMÃO KFOURI, M.; DE OLIVEIRA PIAZETTA, M. H.; GOBBI, A. L.; KUBOTA, L. T. "Electrochemical detection in a paper-based separation device". *Analytical Chemistry*, **82** (3): 1162-1165, 2010.
70. QUEIRÓS, R. B.; GUEDES, A.; MARQUES, P.; NORONHA, J.; SALES, M. G. F. "Recycling old screen-printed electrodes with newly designed plastic antibodies on the wall of carbon nanotubes as sensory element for in situ detection of bacterial toxins in water". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **189**: 21-29, 2013.
71. CINCOTTO, F. H.; FAVA, E. L.; MORAES, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O.; FARIA, R. C., "A new disposable microfluidic electrochemical paper-based device for the simultaneous determination of clinical biomarkers". *Talanta*, **195**: 62-68, 2019.
72. DE ARAUJO ANDREOTTI, I. A.; ORZARI, L. O.; CAMARGO, J. R.; FARIA, R. C.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F.; GATTI, A.; JANEGITZ, B. C., "Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **840**: 109-116, 2019.

73. PRADELA-FILHO, L. A.; ANDREOTTI, I. A.; CARVALHO, J. H.; ARAÚJO, D. A.; ORZARI, L. O.; GATTI, A.; TAKEUCHI, R. M.; SANTOS, A. L.; JANEGITZ, B. C., "Glass varnish-based carbon conductive ink: A new way to produce disposable electrochemical sensors". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **305**: 127433, 2020.
74. AFONSO, A. S.; ULIANA, C. V.; MARTUCCI, D. H.; FARIA, R. C. "Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications". *Talanta*, **146**: 381-387, 2016.
75. DE OLIVEIRA, T. R.; FONSECA, W. T.; DE OLIVEIRA SETTI, G.; FARIA, R. C. "Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes". *Talanta*, **195**: 480-489, 2019.
76. DE OLIVEIRA, T. R.; MARTUCCI, D. H.; FARIA, R. C. ""Simple disposable microfluidic device for Salmonella typhimurium detection by magneto-immunoassay". *Sensors Actuators B Chem.*, **255**: 684-691, 2018.".
77. LIM, J.; YEAP, S. P.; LOW, S. C., "Challenges associated to magnetic separation of nanomaterials at low field gradient". *Separation and Purification Technology*, **123**: 171-174, 2014.
78. YAO, Q.; GAO, Y.; GAO, T.; ZHANG, Y.; HARNOODE, C.; DONG, A.; LIU, Y.; XIAO, L. "Surface arming magnetic nanoparticles with amine N-halamines as recyclable antibacterial agents: construction and evaluation". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **144**: 319-326, 2016.
79. SHEN, Z.; WU, A.; CHEN, X. "Iron oxide nanoparticle based contrast agents for magnetic resonance imaging". *Molecular pharmaceutics*. **14**: 1352-1364, 2017.
80. ALI, A.; HIRA ZAFAR, M. Z.; UL HAQ, I.; PHULL, A. R.; ALI, J. S.; HUSSAIN, A., "Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles". *Nanotechnology, science and applications*. **9**: 49, 2016.
81. HSING, I. M.; XU, Y.; ZHAO, W. "Micro-and nano-magnetic particles for applications in biosensing". *Electroanalysis (N.Y.N.Y.)*, **19** (7-8): 755-768, 2007.

82. SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. "Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides". *BioMagnetic Research and Technology*, **2**: 7, 2004.
83. OBATA, K.; TAJIMA, H.; YOHDA, M.; MATSUNAGA, T. "Recent developments in laboratory automation using magnetic particles for genome analysis". *Pharmacogenomics*, **3**: 697-708, 2002.
84. PAMME, N., "Magnetism and microfluidics". *Lab on a Chip*. **6**: 24-38, 2006.
85. CARINELLI, S.; KÜHNEMUND, M.; NILSSON, M.; PIVIDORI, M. "Yoctomole electrochemical genosensing of Ebola virus cDNA by rolling circle and circle to circle amplification". *Biosensors and Bioelectronics*, **93**: 65-71, 2017.
86. KUDR, J.; KLEJDUS, B.; ADAM, V.; ZITKA, O., "Magnetic solids in electrochemical analysis". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **98**: 104-113, 2018.
87. CHIKKAVEERIAIAH, B. V.; MANI, V.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S.; RUSLING, J. F. "Microfluidic electrochemical immunoarray for ultrasensitive detection of two cancer biomarker proteins in serum". *Biosensors and Bioelectronics*, **26** (11): 4477-4483, 2011.
88. KRISHNAN, S.; MANI, V.; WASALATHANTHRI, D.; KUMAR, C. V.; RUSLING, J. F. "Attomolar detection of a cancer biomarker protein in serum by surface plasmon resonance using superparamagnetic particle labels". *Angewandte Chemie International Edition*. **50**: 1175-1178, 2011.
89. ULIANA, C. V.; PEVERARI, C. R.; AFONSO, A. S.; COMINETTI, M. R.; FARIA, R. C. "Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker". *Biosensors and Bioelectronics*, **99**: 156-162, 2018.
90. PAL, S.; ALOCILJA, E. C. "Electrically active magnetic nanoparticles as novel concentrator and electrochemical redox transducer in *Bacillus anthracis* DNA detection". *Biosensors and Bioelectronics*, **26**: 1624-1630, 2010.

91. WANG, Z.; ZHANG, J.; GUO, Y.; WU, X.; YANG, W.; XU, L.; CHEN, J.; FU, F. "A novel electrically magnetic-controllable electrochemical biosensor for the ultra sensitive and specific detection of attomolar level oral cancer-related microRNA". *Biosensors and Bioelectronics*, **45**: 108-113, 2013.
92. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MALTEZ-DA COSTA, M.; MERKOÇI, A., "Controlling the electrochemical deposition of silver onto gold nanoparticles: Reducing interferences and increasing the sensitivity of magnetoimmuno assays". *Biosensors and Bioelectronics*, **24** (8): 2475-2482, 2009.
93. AFONSO, A. S.; PÉREZ-LÓPEZ, B.; FARIA, R. C.; MATTOSO, L. H.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; MALTEZ-DA COSTA, M.; MERKOÇI, A., "Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics*, **40**: 121-126, 2013.
94. MALTEZ-DA COSTA, M.; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; NOGUÉS, C.; BARRIOS, L.; IBÁÑEZ, E.; MERKOÇI, A. "Detection of circulating cancer cells using electrocatalytic gold nanoparticles". *Small*, **8**: 3605-3612, 2012.
95. DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; PLICHTA, Z.; HORÁK, D.; MERKOÇI, A., "Alzheimer's disease biomarkers detection in human samples by efficient capturing through porous magnetic microspheres and labelling with electrocatalytic gold nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics*, **67**: 162-169, 2015.
96. TSAI, C.-Y.; CHANG, T.-L.; KUO, L.-S.; CHEN, P.-H., "Detection of electrical characteristics of DNA strands immobilized on self-assembled multilayer gold nanoparticles". *Applied Physics Letters*, **89**: 203902, 2006.
97. WANG, J.; LU, Z.; TANG, H.; WU, L.; WANG, Z.; WU, M.; YI, X.; WANG, J. "Multiplexed electrochemical detection of MiRNAs from sera of glioma patients at different stages via the novel conjugates of conducting magnetic microbeads and Diblock oligonucleotide-modified gold nanoparticles". *Analytical Chemistry*, **89**: 10834-10840, 2017.
98. ZHENG, M.; HUANG, X. "Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules". *Journal of the American Chemical Society*, **126**: 12047-12054, 2004.

99. JAZAYERI, M. H.; AMANI, H.; POURFATOLLAH, A. A.; PAZOKI-TOROUDI, H.; SEDIGHIMOUGHADDAM, B. "Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies". *Sensing and bio-sensing research*, **9**: 17-22, 2016.
100. MIRKIN, C. A.; LETSINGER, R. L.; MUCIC, R. C.; STORHOFF, J. J. "A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials". *Nature*, **382**: 607-609, 1996.
101. SASTRY, M.; RAO, M.; GANESH, K. N., "Electrostatic assembly of nanoparticles and biomacromolecules". *Accounts of chemical research*, **35**: 847-855, 2002.
102. WANG, G.; ZHANG, J.; MURRAY, R. W. "DNA binding of an ethidium intercalator attached to a monolayer-protected gold cluster". *Analytical Chemistry*, **74**: 4320-4327, 2002.
103. YIN, H.; ZHOU, Y.; ZHANG, H.; MENG, X.; AI, S. "Electrochemical determination of microRNA-21 based on graphene, LNA integrated molecular beacon, AuNPs and biotin multifunctional bio bar codes and enzymatic assay system". *Biosensors and Bioelectronics*, **33**: 247-253, 2012.
104. ZHANG, J.; HUN, X., "Electrochemical determination of miRNA-155 using molybdenum carbide nanosheets and colloidal gold modified electrode coupled with mismatched catalytic hairpin assembly strategy". *Microchemical Journal*, **150**: 104095, 2019.
105. TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. "A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold". *Discussions of the Faraday Society*, **11**: 55-75, 1951.
106. WAGERS, K.; CHUI, T.; ADEM, S. "Effect of pH on the stability of gold nanoparticles and their application for melamine detection in infant formula". *IOSR Journal of Applied Chemistry*, **7**: 15-20, 2014.
107. Integrated DNA Technologies IDT. "5' Amino Modifier C6". Disponível em: <<https://www.idtdna.com/site/Catalog/Modifications/Product/1082>>. Acesso em 17 de agosto de 2020.

108. SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. "A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation". *Analytical Biochemistry*, **218**: 87-91, 1994.
109. DE OLIVEIRA, R. A.; MATERON, E. M.; MELENDEZ, M. E.; CARVALHO, A. L.; FARIA, R. C., "Disposable microfluidic immunoarray device for sensitive breast cancer biomarker detection". *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9** (33): 27433-27440, 2017.
110. DE OLIVEIRA, T. R. Desenvolvimento de Imunossensores Microfluídicos Descartáveis para Detecção de Biomarcadores Visando o Diagnóstico Precoce da Doença de Alzheimer. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2019. Tese de doutorado, 25 p.
111. HAISS, W.; THANH, N. T.; AVEYARD, J.; FERNIG, D. G., "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra". *Analytical Chemistry*, **79** (11): 4215-4221, 2007.
112. MANI, V.; CHIKKAVEERIAIAH, B. V.; PATEL, V.; GUTKIND, J. S.; RUSLING, J. F. "Ultrasensitive immunosensor for cancer biomarker proteins using gold nanoparticle film electrodes and multienzyme-particle amplification". *ACS Nano*, **3**: 585-594, 2009.
113. POLYSCIENCES. "Polysciences BioMag®Plus Carboxyl, Technical Data Sheet". Disponível em: <<https://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/TDS%20618.pdf>>. Acesso em 20 de maio de 2020.
114. SHITTU, K.; BANKOLE, M.; ABDULKAREEM, A.; ABUBAKRE, O.; UBAKA, A. "Application of gold nanoparticles for improved drug efficiency". *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. **8**: 035014, 2017.
115. MARYCZ, K.; KOLANKOWSKI, J.; GRZESIAK, J.; HECOLD, M.; RAC, O.; TETERYCZ, H. "Application of gold nanoparticles of different concentrations to improve the therapeutic potential of autologous conditioned serum: potential implications for equine regenerative medicine". *Journal of Nanomaterials*. **2015**: 1-9, 2015.

116. WU, T.; DUAN, X.; HU, C.; WU, C.; CHEN, X.; HUANG, J.; LIU, J.; CUI, S. "Synthesis and characterization of gold nanoparticles from *Abies spectabilis* extract and its anticancer activity on bladder cancer T24 cells". *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **47**: 512-523, 2019.
117. BARD, A. J.; FAULKNER, L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, New York: John Wiley & Sons, Inc, 2001.
118. BARTLETT, P.; PRATT, K., "A study of the kinetics of the reaction between ferrocene monocarboxylic acid and glucose oxidase using the rotating-disc electrode". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **397**: 53-60, 1995.
119. METTERS, J. P.; HOUSSEIN, S. M.; KAMPOURIS, D. K.; BANKS, C. E., "based electroanalytical sensing platforms". *Analytical Methods*, **5**: 103-110, 2013.
120. KADARA, R. O.; JENKINSON, N.; BANKS, C. E. "Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms". *Sensors and Actuators B: Chemical*, **138**: 556-562, 2009.
121. HE, X.; SU, J.; WANG, Y.; WANG, K.; NI, X.; CHEN, Z. "A sensitive signal-on electrochemical assay for MTase activity using AuNPs amplification". *Biosensors and Bioelectronics*, **28** (1): 298-303, 2011.
122. SHIN, S.; WON, B. Y.; JUNG, C.; SHIN, S. C.; CHO, D. Y.; LEE, S. S.; PARK, H. G., "Electrochemical detection of DNA mutations on a PNA-modified electrode utilizing a single-stranded DNA specific endonuclease". *Chemical Communications*, **47**: 6611-6613, 2011.
123. BERGLUND, G. I.; CARLSSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. "The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution". *Nature*, **417**: 463-468, 2002.
124. CAMACHO, C.; CHICO, B.; CAO, R.; MATÍAS, J. C.; HERNÁNDEZ, J.; PALCHETTI, I.; SIMPSON, B. K.; MASCINI, M.; VILLALONGA, R. "Novel enzyme biosensor for hydrogen peroxide via supramolecular associations". *Biosensors and Bioelectronics*, **24**: 2028-2033, 2009.
125. LACZKA, O.; MAESA, J.-M.; GODINO, N.; DEL CAMPO, J.; FOUGHT-HANSEN, M.; KUTTER, J. P.; SNAKENBORG, D.; MUÑOZ-PASCUAL, F.-X.; BALDRICH, E. "Improved bacteria detection by coupling magneto-immunocapture and amperometry at flow-channel microband electrodes". *Biosensors and Bioelectronics*, **26**: 3633-3640, 2011.

126. ROBERTS, W. S.; DAVIS, F.; COLLYER, S. D.; HIGSON, S. P. "Construction and interrogation of enzyme microarrays using scanning electrochemical microscopy—optimisation of adsorption and determination of enzymatic activity". *Analyst*, **136**: 5287-5293, 2011.
127. BAYRAMOĞLU, G.; ARICA, M. Y., "Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads". *Journal of hazardous materials*, **156**: 148-155, 2008.
128. IDEGAMI, K.; CHIKAE, M.; KERMAN, K.; NAGATANI, N.; YUHI, T.; ENDO, T.; TAMIYA, E. "Gold nanoparticle-based redox signal enhancement for sensitive detection of human chorionic gonadotropin hormone". *electroanalysis: an international journal devoted to fundamental and practical aspects of electroanalysis*, **20**: 14-21, 2008.
129. AFONSO, A. S.; PÉREZ-LÓPEZ, B.; FARIA, R. C.; MATTOSO, L. H.; HERNÁNDEZ-HERRERO, M.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; MALTEZ-DA COSTA, M.; MERKOÇI, A. "Electrochemical detection of Salmonella using gold nanoparticles". *Biosensors and Bioelectronics*, **40**: 121-126, 2013.
130. PUMERA, M.; ALDAVERT, M.; MILLS, C.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S., "Direct voltammetric determination of gold nanoparticles using graphite-epoxy composite electrode". *Electrochimica Acta*, **50**: 3702-3707, 2005.
131. SWADLING, J. B.; ISHII, K.; TAHARA, T.; KITAO, A. "Origins of biological function in DNA and RNA hairpin loop motifs from replica exchange molecular dynamics simulation". *Physical Chemistry Chemical Physics*, **20**: 2990-3001, 2018.
132. JONSTRUP, A. T.; FREDSE, J.; ANDERSEN, A. H. "DNA hairpins as temperature switches, thermometers and ionic detectors". *Sensors-Basel*, **13**: 5937-5944, 2013.
133. WALLACE, M. I.; YING, L.; BALASUBRAMANIAN, S.; KLENERMAN, D. "Non-Arrhenius kinetics for the loop closure of a DNA hairpin". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **98**: 5584-5589, 2001.
134. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo, 2006.

135. MILLER, J. N. "Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review". *Analyst*, **116**: 3-14, 1991.
136. WU, X.; CHAI, Y.; YUAN, R.; SU, H.; HAN, J. "A novel label-free electrochemical microRNA biosensor using Pd nanoparticles as enhancer and linker". *Analyst*, **138**: 1060-1066, 2013.
137. REN, Y.; DENG, H.; SHEN, W.; GAO, Z. "A highly sensitive and selective electrochemical biosensor for direct detection of microRNAs in serum". *Analytical Chemistry*, **85**: 4784-4789, 2013.
138. HOU, T.; LI, W.; LIU, X.; LI, F. "Label-free and enzyme-free homogeneous electrochemical biosensing strategy based on hybridization chain reaction: A facile, sensitive, and highly specific microRNA assay". *Analytical Chemistry*, **87**: 11368-11374, 2015.
139. MOHAMADI, R. M.; IVANOV, I.; STOJCIC, J.; NAM, R. K.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. "Sample-to-answer isolation and mRNA profiling of circulating tumor cells". *Analytical Chemistry*, **87**: 6258-6264, 2015.
140. MOHAMMADI, H.; AMINE, A. "Spectrophotometric and Electrochemical Determination of MicroRNA-155 Using Sandwich Hybridization Magnetic Beads". *Analytical Letters*, **51**: 411-423, 2018.
141. ZHOU, L.; WANG, J.; CHEN, Z.; LI, J.; WANG, T.; ZHANG, Z.; XIE, G. "A universal electrochemical biosensor for the highly sensitive determination of microRNAs based on isothermal target recycling amplification and a DNA signal transducer triggered reaction". *Microchimica Acta*, **184**: 1305-1313, 2017.
142. WAN, Z.; UMER, M.; LOBINO, M.; THIEL, D.; NGUYEN, N.-T.; TRINCHI, A.; SHIDDIKY, M. J.; GAO, Y.; LI, Q. "Laser induced self-N-doped porous graphene as an electrochemical biosensor for femtomolar miRNA detection". *Carbon*, 2020.
143. VEJA. "Coronavírus: quanto custa e onde é possível fazer testes para Covid-19". Disponível em: <<https://veja.abril.com.br/saude/coronavirus-quanto-custa-e-onde-e-possivel-fazer-testes-para-covid-19/>>. Acesso em 05 de julho de 2020.
144. LAVOISIER. "Exames de RT-PCR do novo Coronavírus". Disponível em: <<https://lavoisier.com.br/saude/unidades-exclusiva-covid19>>. Acesso em 05 de julho de 2020.

145. A+. "Exames para diagnóstico da Covid-19 estão disponíveis na a+". Disponível em: <<https://www.amaissaude.com.br/pr/noticias/exames-para-diagnostico-da-covid-19-estao-disponiveis-na-amais/>>. Acesso em 05 de julho de 2020.

146. KORZH-SLEPTSOVA, I.; LINDSTRÖM, E.; MILD, K. H.; BERGLUND, A.; LUNDGREN, E. "Low frequency MFs increased inositol 1, 4, 5-trisphosphate levels in the Jurkat cell line". FEBS letters, **359**: 151-154, 1995.

147. ANDREGHETTO, F. M.; KLINGBEIL, M. F. G.; SOARES, R. M.; SITNIK, R.; JUNIOR, D. D. S. P.; MATHOR, M. B.; NUNES, F. D.; SEVERINO, P. "Avaliação da expressão de microRNAs em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e em cultura primária de queratinócitos orais". Einstein, **9**: 442-448, 2011.