

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

**DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES UTILIZANDO
MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO E TÉCNICAS
ELETROQUÍMICAS**

Mariele Mucio Pedroso

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

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Supervisor exterior: Prof. Dr. Hubert Perrot

Bolsista: Capes

**São Carlos - SP
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

P372dg

Pedroso, Mariele Mucio.

Desenvolvimento de genossensores utilizando
microbalança de cristal de quartzo e técnicas eletroquímicas
/ Mariele Mucio Pedroso. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
127 f.

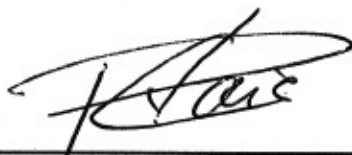
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2011.

1. Química analítica. 2. Genossensores. 3. Microbalança
de cristal de quartzo. 4. Eletroquímica - técnica. I. Título.

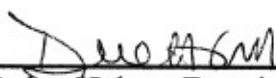
CDD: 543 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Doutorado

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de tese de doutorado da candidata **Mariele Mucio Pedroso**, realizada em 18 de fevereiro de 2011:*



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria



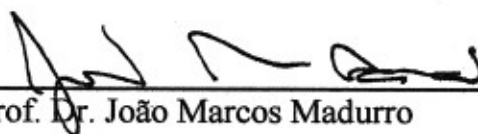
Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza



Profa. Dra. Hideko Yamanaka



Profa. Dra. Maria Del Pilar Taboada Sotomayor



Prof. Dr. João Marcos Madurro

À minha família maravilhosa, meus pais Carlos e Jussara, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim, até quando eu mesma não acreditava além de me darem amor incondicional e valores morais importantes. Ao meu querido irmão, Diego, por suas palavras oportunas de incentivo e coragem. Obrigada!

Agradecimentos

Ao Prof. Ronaldo pela orientação, amizade, paciência e principalmente pela formação profissional e pessoal ao longo do mestrado e doutorado.

Ao Prof. Paulo Roberto Bueno pela co-orientação, amizade e pela confiança no meu trabalho.

Ao meu supervisor no exterior, o pesquisador Dr. Hubert Perrot do CNRS (França) pela paciência, amizade, pelos ensinamentos com as técnicas de QCM e EIS, e principalmente por todo apoio emocional e material que me ofereceu durante o período que estive em seu laboratório.

Ao pesquisador do CNRS, Dr. Vincent Vivier, pelas importantes discussões sobre a técnica de EIS e principalmente pela ajuda na construção dos microeletrodos e na realização das medidas de SECM.

Ao Prof. Dr. Mathieu Lazerges da Université Paris Descartes, pelas discussões sobre DNA e pela oportunidade de trabalharmos juntos na redação de um artigo científico.

À administradora do LIEC, Rose pela amizade e pela ajuda com os assuntos burocráticos.

Ao meu amado Dower pela parceria, apoio, amor e muita paciência sempre. Obrigada!

Ao amigo Márcio Góes, pela grande ajuda com a teoria de impedância, por me ensinar a fazer os ajustes e principalmente pela amizade.

Ao amigo Aílton pelas boas discussões científicas, pela ajuda em todos os momentos que precisei e pela amizade.

A amiga Grazielle pelas importantes discussões sobre eletroquímica, pela ajuda com a parte experimental e pela amizade.

A amiga Naira, minha eterna pupila (“Pups”), pela oportunidade de trabalharmos juntas, pela confiança, e principalmente pelo carinho e amizade.

Aos demais amigos do LIEC, Raluca Savu e Ednan, Elaine Muniz, Adriano, Josiel, Carla, Márcio Santos, William, por me receberem com muito carinho no grupo, pelas discussões, pelo apoio, amizade e por todos os momentos felizes de comemoração.

A todos os amigos do Labie (UFSCar) e em especial a Estela Troiani e André Afonso por me ajudarem sempre que precisei e pela amizade.

Aos queridos amigos com os quais tive o prazer de conviver em Paris, Priscila Martinhon, Nabila Cherchour, Nizar Aouina, Cyril Hodebourg, Rebeca Moreira, Sylvia Vilas, Ronny Lange, Trịnh Quang Đào, Marina Mennucci, Rémy Mingant, Dia Magnétik, Mercedes Sánchez, Jeronimo Agrisuelas, David Vazquez, Thu Huong, Hélène Cheap, Myriam Nobial, Pu Peng, Takoua Ben Rhouma, Syrine Chebil, Mohammed Kechadi e Jean Ferrari. Obrigada a todos!

Aos professores da banca examinadora da defesa, pela disponibilidade e pelas importantes contribuições ao trabalho.

A FAPESP, CNPq e CNRS pelo financiamento a este trabalho, e em especial a CAPES pela bolsa concedida e pelo estágio sanduíche.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM – Atomic Force Microscopy

CV – Cyclic Voltammetry

DNA – Deoxyribonucleic Acid

dsDNA – Double Strand DNA

DPV – Differential Potential Voltammetry

EIS – Electrochemical Impedance Spectroscopy

HABs – Harmful Algal Blooms

HEPES – ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico

MCH – 6-mercapto 1-hexanol

PCR – Polimerase Chain Reaction

RNA – Ribonucleic Acid

SECM – Scanning Electrochemical Microscopy

SNP – Single Nucleotide Polimorfism

ssDNA – Single Strand DNA

SPR – Surface Plasmon Ressonance

UME – Ultramicroeletrode

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3

Tabela 3.1. Estrutura das sondas de DNA e dos alvos complementares de DNA.....	38
---	----

Capítulo 4

Tabela 4.1. Sequência de bases nitrogenadas das sondas 1 a 4 e do alvo <u>A</u>	54
--	----

Tabela 4.2. Cálculos da porcentagem de cobertura da sondas de DNA.....	58
---	----

Tabela 4.3. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo para hibridação da sonda com o alvo de DNA.....	59
--	----

Tabela 4.4. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA.....	60
---	----

Tabela 4.5. Cálculos da porcentagem de hibridação do alvo de DNA antes e após a utilização do tiol	62
---	----

Tabela 4.6. Estrutura da sonda de DNA (P) e dos alvos de DNA (T1a T6).....	68
---	----

Tabela 4.7. Constante cinética de primeira ordem de hibridação das moléculas alvo T3 e T4.....	74
---	----

Tabela 4.8. Constantes cinéticas para um mecanismo de hibridação de duas etapas.....	76
Tabela 4.9. Estrutura das sondas de DNA das microalgas do gênero <i>Alexandrium</i> e os respectivos alvos complementares.....	79
Tabela 4.10. Valores de E_{pa} , E_{pc} e I_a e I_c do voltamograma da Figura 4.17.....	80
Tabela 4.11. Valores de E_{pa} , E_{pc} e I_a e I_c do voltamograma da Figura 4.18.....	82
Tabela 4.12. Valores de E_{pa} , E_{pc} e I_a e I_c do voltamograma da Figura 4.21.....	87
Tabela 4.13. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist da Figura 4.22.....	92
Tabela 4.14. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist da Figura 4.25.....	94
Tabela 4.15. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA.....	94
Tabela 4.16. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist da Figura 4.26.....	96
Tabela 4.17. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA antes e após a utilização do tiol.....	97

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1. Representação esquemática do modelo proposto de hibridação de fase sólida DNA.....8

Figura 1.2. Diagrama esquemático dos componentes de um biossensor.....13

Figura 1.3. Esquema de um nucleotídeo (a) e estrutura química (b).....14

Figura 1.4. Estrutura em dupla hélice do DNA.....15

Figura 1.5. Diagrama esquemático de um biossensor de DNA.....17

Figura 1.6 Cristal de quartzo com eletrodos de ouro e seu modo de cisalhamento.....22

Figura 1.7. Detecção eletroquímica utilizando uma molécula marcadora entre as fitas de DNA.....25

Figura 1.8. Representação dos modos: (A) “feedback negativo” e (B) “feedback positivo”31

Capítulo 3

Figura 3.1. Cristal de quartzo e célula de fluxo.....41

Figura 3.2. Instrumentação utilizada para realização das medidas com a QCM.....	41
Figura 3.3. Suporte utilizado para fixar o cristal de quartzo nas medidas eletroquímicas.....	42
Figura 3.4. Célula eletroquímica com uma configuração de três eletrodos utilizada para as medidas de CV e EIS.....	43
Figura 3.5. Esquema de instrumentação para as medidas de EIS.....	44
Figura 3.6. Diagrama esquemático de um microscópio eletroquímico de varredura construído no LISE.....	45
Figura 3.7. Célula eletroquímica utilizada para as medidas de SECM.....	46
Figura 3.8. Microscópio eletroquímico com a gaiola de Faraday e sistema com bipotenciostato <i>home made</i> para medidas de SEMC.....	46
Figura 3.9. Esquema do processo de fabricação de um microeletrodo de disco utilizando um pipette puller.....	47
Figura 3.10. Arranjo com três microeletrodos de ouro para medidas de EIS.....	49
Figura 3.11. Célula eletroquímica com o arranjo de três microeletrodos para medidas de EIS.....	49

Capítulo 4

- Figura 4.1.** Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as etapas de imobilização e hibridação das moléculas de DNA.....54
- Figura 4.2.** Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as etapas de imobilização, hibridação e regeneração do genossensor.....56
- Figura 4.3.** Etapas de imobilização das sondas de DNA, hibridação com alvo complementar e regeneração do genossensor.....57
- Figura 4.4.** Uso do tiol como reagente de bloqueio no processo de hibridação.....61
- Figura 4.5.** Representação esquemática do uso do tiol para melhorar a orientação das moléculas de DNA.....62
- Figura 4.6.** Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as etapas de imobilização e hibridação com diferentes sequências alvos.....64
- Figura 4.7.** Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as etapas de imobilização, hibridação e regeneração.....65
- Figura 4.8.** Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as etapas de imobilização e hibridação com misturas de alvos complementares e não complementares em diferentes concentrações.....66
- Figura 4.9.** Curva da variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo para imobilização, hibridação e regeneração do genossensor.....69

Figura 4.10. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo correspondente a hibridação e o número de ciclos de regeneração do genossensor.....	70
Figura 4.11. Variação na frequência de oscilação do cristal de quartzo durante a hibridação dos alvos complementares T2, T3, T4 e T6.....	71
Figura 4.12. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo de acordo com tamanho dos alvos complementares de DNA.....	72
Figura 4.13. Curvas de hibridação normalizadas dos alvos complementares de 20 bases nitrogenadas T3 (A), e para alvo complementar de 40 bases nitrogenadas T4 (B), curvas logarítmicas da hibridação dos alvos T3 (C) e T4 (D).....	73
Figura.4.14. Curvas k -C (A) e k^{-1} -C ⁻¹ (B), para alvos complementares T3 e T4.....	75
Figura 4.15. Representação das etapas de preparação do genossensor para detecção eletroquímica.....	77
Figura 4.16. Etapas de preparação do genossensor para detecção eletroquímica utilizando o MCH.....	78
Figura 4.17. Voltamogramas do cristal de quartzo limpo realizados em uma solução de KNO ₃ contendo K ₄ Fe(CN) ₆ / K ₃ Fe(CN) ₆	80

Figura 4.18. Voltamograma cíclico do cristal de quartzo realizados em uma solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ após as etapas de imobilização e hibridação com o alvo complementar.....	81
Figura 4.19. Voltamogramas do cristal de quartzo realizados em uma solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ após as etapas de imobilização, hibridação e regeneração do genossensor.....	84
Figura 4.20. Voltamogramas do cristal de quartzo contendo a sonda de DNA realizados em uma solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ após adições de diferentes concentrações do alvo.....	85
Figura 4.21. Voltamograma cíclico do cristal de quartzo realizados em uma solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/ \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ após adições da sonda, do tiol, hibridação e regeneração do genossensor.....	86
Figura 4.22. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do cristal de quartzo após imobilização da sonda e hibridação.....	89
Figura 4.23. Circuito equivalente contendo dois resistores e um capacitor.....	90
Figura 4.24. Diagrama esquemático do circuito elétrico equivalente utilizado para ajustar os dados de impedância.....	91
Figura 4.25. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do cristal de quartzo após imobilização da sonda, hibridação e regeneração.....	93

Figura 4.26. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do cristal de quartzo após imobilização da sonda, adição do tiol, hibridação e regeneração.....	95
Figura 4.27. Arranjo de três microeletrodos de ouro para medidas de EIS.....	100
Figura 4.28. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do Microeletrodo 1 após imobilização da sonda e hibridação.....	105
Figura 4.29. Medidas de EIS do Microeletrodo 2 após imobilização da sonda e adição do alvo de sequencia não complementar.....	102
Figura 4.30. Medidas de EIS do Microeletrodo 3 após imobilização da sonda e adição do alvo de sequencia não complementar.....	102
Figura 4.31. Voltamograma cíclico do UME de Pt em solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	104
Figura 4.32. Curva de aproximação do UME-substrato limpo em solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	105
Figura 4.33. Curvas de aproximação do UME-substrato limpo e após imobilização da sonda e hibridação em solução de KNO_3 contendo $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	107
Figura 4.34. Diagrama esquemático das medidas de SECM para transferência de elétrons através da dupla fita de DNA.....	108

Figura 4.35. Curvas de aproximação UME-substrato após imobilização da sonda e hibridação em diferentes velocidades de varredura.....109

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSORES UTILIZANDO MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO E TÉCNICAS ELETROQUÍMICAS. A proliferação de algas tóxicas em diferentes oceanos pode causar perdas econômicas e ambientais devido a mortandade de animais marinhos como moluscos e peixes devido as toxinas que estas liberam no ambiente. Os motivos que levam a proliferação destas algas não são completamente compreendidos e desta forma o monitoramento das algas é de extrema importância. Neste sentido, os genossensores aparecem como ferramentas promissoras para a detecção de florações tóxicas em águas costeiras, uma vez que oferecem a possibilidade de detecção *in situ* com alta sensibilidade e seletividade. Neste projeto estudou-se os processos de hibridação de moléculas de DNA sem o uso de moléculas marcadoras utilizando técnicas microgravimétricas e eletroquímicas. Foram utilizadas como sondas sequências parciais de oligonucleotídeos do gene que codifica o RNA ribossômico de sub-unidade de microalgas da espécie *Alexandrium*. Estas espécies de algas produzem neurotoxinas, que podem acumular em moluscos e são responsáveis por danos à saúde humana. A sonda de DNA foi imobilizada por quimissorção na superfície de um cristal de quartzo de 9 MHz oscilando no terceiro harmônico, 27 MHz. Após a imobilização da sonda de DNA, os cristais foram expostos a moléculas alvo de DNA com sequência complementar à sonda e o processo de hibridação foi monitorado em tempo real. A porcentagem de recobrimento da superfície do cristal e a cinética de hibridação foram monitorados pela microbalança de cristal de quartzo (QCM). A área do cristal no qual as moléculas de DNA não foram imobilizadas foi preenchida com o reagente 6-mercaptopentano-1-ol (MCH) e observou-se uma melhora na eficiência de hibridação. As técnicas de voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram usadas como um sistema para detecção da sonda de DNA imobilizada e sua hibridação com o

alvo complementar, sem o uso de moléculas marcadoras. Estes eventos foram monitorados por meio da mudança nas propriedades elétricas do eletrodo em meio contendo o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ antes e após a imobilização e hibridação. As análises dos espectros de impedância mostraram um aumento na R_{tc} após a formação da dupla fita de DNA, ao passo que os valores de capacitância permaneceram inalterados após as modificações do eletrodo. O uso do MCH durante as medidas eletroquímicas aumentou a eficiência da hibridação, concordando com os resultados obtidos com a técnica de QCM. A técnica de microscopia eletroquímica de varredura (SECM) foi utilizada para avaliar o processo de transferência de carga, antes e após as modificações com as moléculas de DNA. Os resultados obtidos com a técnica de SECM (curvas de aproximação) estão qualitativamente de acordo com os resultados obtidos por meio das técnicas de QCM, CV e EIS com o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Um sistema de arranjos de microeletrodos para DNA foi construído e avaliado, apresentando uma boa resposta na detecção de diferentes sequências de ácido nucléico simultaneamente. O genossensor desenvolvido permitiu distinguir entre sondas e alvos com sequências diferentes, complementares e não complementares. O procedimento utilizado para a regeneração do genossensor permitiu sua reutilização por no mínimo vinte vezes, sem perda na sensibilidade de detecção.

ABSTRACT

GENOSSENSORS DEVELOPMENT USING QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE AND ELECTROCHEMICAL TECHNIQUES. The proliferation of toxic algae in different oceans leads to great economic losses and environmental damage the mortality of marine animals such as mollusks and fish due to neurotoxins that they release into the environment. The reasons that lead to algal blooms are not fully understood and thus the monitoring of algae is extremely important. In this sense, the genosensors appear as promising tools for the detection of toxic algal blooms in coastal waters, as they offer the possibility of in situ detection with high sensitivity and selectivity. In this project we studied the processes of hybridization of DNA molecules without the use of marker molecules using electrochemical and microgravimetric techniques. Probes were used as partial sequences of primers of the gene encoding the ribosomal RNA sub-unit of the microalgae *Alexandrium* species. These species of algae produce neurotoxins that can accumulate in shellfish and are responsible for harm to human health. The probe DNA was immobilized by chemisorptions on the surface of a quartz crystal oscillating at 9 MHz third harmonic, 27 MHz. After the grounding of the probe, the crystals were exposed to target DNA molecules with sequence complementary to the probe and hybridization process was monitored in real time. The percentage of the crystal surface coverage and hybridization kinetics were monitored by quartz crystal microbalance (QCM). The area of the crystal suffered no links were filled with the reagent mercaptohexanol (MCH) and observed an improvement in the efficiency of hybridization. The cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used as a system for detection of DNA probe immobilization and hybridization with its complementary target, without the use of marker molecules. These events were monitored through changes in the electrical properties of the lead in media containing the redox couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ before and after immobilization and hybridization. The analysis of

the impedance spectra showed an increase in R_{ct} after the formation of double-stranded DNA, while the capacitance values remained unchanged after the modification of the electrode. The use of MCH during electrochemical measurements increased the efficiency of hybridization, in agreement with results obtained with the QCM technique. The technique of scanning electrochemical microscopy (SECM) was used to evaluate the charge transfer process before and after modifications to the DNA molecules. The results obtained with the SECM technique (approach curves) are qualitatively in agreement with results obtained by the techniques of QCM, CV and EIS with the redox couple $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. A microarray for DNA was constructed and evaluated, showing a good response in the detection of different nucleic acid sequences simultaneously. The genosensor developed allowed us to distinguish between targets and probes with different sequences, complementary and not complementary. A procedure for the regeneration of genosensor was developed and allowed the reuse of the DNA biosensor twenty times, with the same sensitivity.

SUMÁRIO

Capítulo 1

1.1. Cinética de hibridação de ácidos nucleicos.....	5
1.2. Biossensores.....	11
1.2.1. Biossensores de DNA – Genossensores.....	13
1.3. Mecanismos de transdução usados no desenvolvimento de biossensores de DNA.....	20

Capítulo 2

2.1. Objetivo.....	34
--------------------	----

Capítulo 3

3.1. Material e Métodos.....	36
3.1.1. Reagentes e Soluções.....	36
3.1.2. Sondas e Alvos de DNA.....	37
3.1.3. Preparação do genossensor.....	39
3.1.3.1. Limpeza.....	39
3.2. Instrumentação.....	40
3.2.1. Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM).....	40
3.2.2. Medidas Eletroquímicas.....	41
3.2.2.1. Voltametria Cíclica (CV).....	41
3.2.2.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).....	43
3.2.2.3. Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM).....	44
3.2.2.3.1. Preparação dos Ultramicroeletrodos.....	47
3.2.2.4. Microeletrodos – <i>Microarrays</i>	48

Capítulo 4

4.1. Medidas Eletrogravimétricas – Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM).....	52
4.1.2. Cinética de Hibridação em um Genossensor Piezelétrico.....	67
4.1.2.1. Modelo do biossensor, eficiência de hibridação e regeneração.....	68
4.1.2.2. Resposta do biossensor para alvos com tamanhos variados (número de bases nitrogenadas).....	71
4.1.2.3. Cinética de Hibridação.....	72
4.3. Medidas Eletroquímicas.....	76
4.3.1. Preparação do Genossensor.....	77
4.3.2. Voltametria Cíclica (CV).....	79
4.3.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).....	88
4.3.3.1. Microeletrodos – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.....	98
4.3.4. Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM).....	103

Capítulo 5

Conclusão.....	112
----------------	-----

Capítulo 6

Referências Bibliográficas.....	116
---------------------------------	-----

Capítulo 1

Introdução

A literatura apresenta uma grande quantidade de trabalhos direcionados para elucidar o papel do ácido desoxirribonucleico (DNA - *deoxyribose nucleic acid*) em sistemas biológicos. Durante a década de 1990 o projeto Genoma Humano foi criado com o objetivo de identificar todos os genes presentes no DNA humano, algo entre 20.000 e 25.000 genes. O sequenciamento do genoma permitiu detectar doenças hereditárias de mutações pontuais como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *single nucleotide polymorphism*) além de patógenos humanos através de sua sequência específica de ácidos nucleicos. As variações no código genético, por exemplo, podem alterar a função dos genes aumentando a probabilidade de um indivíduo desenvolver uma doença ¹⁻². Dentro deste contexto, o diagnóstico precoce e preciso de defeitos na cadeia de DNA, assim como identificar sequências de bases nitrogenadas e a hibridação com sequências complementares é um tema de grande importância para a comunidade científica.

O estudo da cinética de hibridação de um ácido nucleico é necessário para uma melhor compreensão de importantes processos biológicos em um nível molecular. Uma ampla variedade de técnicas é utilizada para a identificação de doenças genéticas. Os métodos convencionais para análise de sequências genômicas específicas que incluem amplificação enzimática do DNA (PCR-*polimerase chain reaction*), digestão da fita de DNA genômico ou produto de PCR com enzimas de restrição, sequenciamento de ácidos nucleicos e hibridação, como eletroforese gel e *Southern blotting*, geralmente são demorados e com alto custo ³.

Sistemas alternativos visando a miniaturização desses procedimentos são, então estudados para permitir a produção de dispositivos portáteis que possam ser utilizados para o diagnóstico de doenças genéticas. Nesse sentido, a detecção específica de uma sequência de DNA aparece como uma nova e eficiente alternativa, com boa sensibilidade e baixo custo quando comparado aos métodos convencionais (*Southern blotting*) e é um tema

importante na química analítica. Um avanço importante neste campo foi conseguido durante as últimas duas décadas com o desenvolvimento de biossensores específicos para DNA.

Os métodos de análise molecular baseados em dispositivos biossensores dependem de elementos de reconhecimento específicos para detectar analitos alvo. O principal papel de um sensor é explorar as interações entre um analito alvo e um elemento de reconhecimento biológico. Esta interação irá produzir um sinal mensurável (fluorescente, elétrico, etc), que pode ser utilizado para se obter informações sobre a presença e a concentração do alvo. Os limites de detecção e sensibilidade de tais dispositivos são limitados pela capacidade em discriminar entre uma ligação seletiva do analito alvo e ligações não seletivas geralmente causadas por interferentes. Sistemas químicos baseados na detecção em fase sólida da hibridação de ácidos nucleicos como os biossensores de DNA, também conhecidos como genossensores, são especialmente atraentes, devido a especificidade das interações entre as cadeias complementares no processo de hibridação. A capacidade de um dispositivo analítico de diferenciar entre uma sequência de DNA totalmente complementar e aquela em que há uma única alteração é de grande importância.

Os dispositivos biossensores para detecção da hibridação de ácidos nucleicos em fase sólida são alternativas aos métodos convencionais de análise genômica. Estes tem sido desenvolvidos na tentativa de gerar ensaios reversíveis, reutilizáveis, sensíveis, seletivos, relativamente simples de usar e mais rápidos ⁴, comparados aos ensaios de hibridação em membrana ⁵, com o objetivo de atender o crescente mercado de diagnóstico molecular.

Os métodos de transdução de sinal para detectar hibridação de ácidos nucleicos no desenvolvimento de biossensores de DNA, também denominados genossensores, incluem os eletroquímicos ², piezelétricos e sistemas ópticos ⁶ entre outros. Okata *et al.* ⁷ por exemplo, usaram a microbalança de cristal de quartzo (QCM- *quartz crystal microbalance*) para

estudar a cinética de hibridação de sondas de DNA com tamanhos diferentes (10, 20 e 30 bases nitrogenadas). Nesse trabalho os autores propuseram uma nova metodologia para detecção de hibridação de moléculas DNA imobilizadas em um cristal piezelétrico de 9 MHz.

Os biossensores gravimétricos também são utilizados para detecções sensíveis e seletivas *in situ* do DNA de algas tóxicas tanto na água do mar como em sedimentos, e aparecem como promissoras ferramentas analíticas. Atualmente, a identificação das algas depende observações em microscópio realizadas principalmente pelos taxonomistas em laboratórios especializados. Mais recentemente a detecção em tempo real usando amplificação por PCR foram realizados para a espécie *Alexandrium minutum* da costa da Catalunha ⁸.

Um grande número de algas pertencentes ao gênero *Alexandrium* estão entre as principais microalgas tóxicas responsáveis pelas florações de algas tóxicas (HABs - *Harmful Algal Blooms*) nas costas espanhola, francesa e italiana ⁹. Nestes episódios de HAB, diversas algas das espécies dinoflageladas (que incluem o gênero *Alexandrium*) proliferaram, produzindo potentes neurotoxinas responsáveis pelo envenenamento dos mariscos (*Paralytic Shellfish Poisoning*- Intoxicação paralisante por mariscos). Os mariscos podem acumular níveis elevados de toxinas após a ingestão destas espécies de algas e quando estes são ingeridos pelos humanos podem causar distúrbios neurológicos e, em casos extremos, a morte ¹⁰. As três espécies de microlagas do gênero *Alexandrium* que foram estudadas durante este trabalho, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catanella* e *Alexandrium taylori*, causaram aumento de toxinas no Mediterrâneo ocidental na última década é o aumento destas algas é uma ameaça importante para a saúde humana, para pesca e turismo ¹¹. Para estimar e entender a ocorrência de HABs e os danos por eles causados, um acompanhamento rigoroso do crescimento destas algas é muito importante.

O desenvolvimento de biossensores com base na hibridação de ácidos nucleicos exige o conhecimento da termodinâmica de formação do híbrido na interface sólida, porque a estabilidade termodinâmica pode ditar a seletividade do processo de hibridação¹². Nesse sentido, encontram-se diversos trabalhos direcionados para o estudo e análise experimental em tempo real da cinética e termodinâmica de equilíbrio da hibridação em fase sólida de oligonucleotídeos usando uma ampla variedade de técnicas. Nesta introdução pretendemos apresentar uma revisão bibliográfica do uso de dispositivos piezelétricos e eletroquímicos para estudos da hibridação de DNA. O controle cuidadoso das condições de hibridação, como a densidade de oligonucleotídeos imobilizados, assim como a temperatura, pH e força iônica, podem aumentar a seletividade, sensibilidade e a velocidade de um ensaio de hibridação de ácido nucleico em uma interface sólida. A teoria geral e as equações do modelo cinético utilizado neste trabalho, também serão apresentados na introdução.

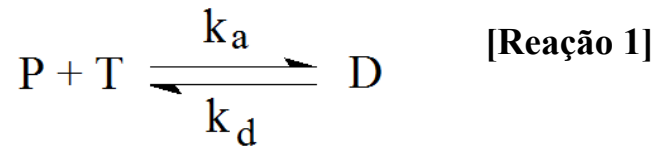
1.1. Cinética de hibridação de ácidos nucleicos

Uma quantidade significativa de pesquisas sobre análise biomolecular rápida e seletiva vem sendo centrada no desenvolvimento de métodos analíticos que fazem uso de hibridação de ácido nucleico, como base para o reconhecimento seletivo. A compreensão e o entendimento da cinética e termodinâmica da hibridação do DNA em fase sólida e o desenvolvimento de modelos numéricos e matemáticos para interpretar ou prever resultados experimentais faz-se necessário para aperfeiçoar o estudo e desenvolvimento de biossensores de DNA. A sensibilidade dos biossensores são frequentemente abordadas nos trabalhos científicos, podendo-se obter controle deste parâmetro explorando, por exemplo, as diferenças na estabilidade termodinâmica das duplas fitas de DNA, complementares e aquelas que possuem defeitos (*mismatches*) na sequência de bases nitrogenadas.

Uma fita simples de DNA imobilizada na superfície de um sólido e a sua associação com uma fita de sequência complementar sofrendo hibridação na interface sólido-líquido possui um comportamento diferente daquele que ocorre no seio da solução. O entendimento destas diferenças é fundamental para orientar o projeto de um dispositivo biossensor, a formulação de protocolos para análise e desenvolvimento de ferramentas de análise de dados. A hibridação de ácidos nucleicos em fase sólida apresenta limitações termodinâmicas e cinéticas, assim como todos os processos químicos que ocorrem na natureza. Por meio do estudo da termodinâmica do processo de hibridação podemos determinar a concentração limite no qual as moléculas-alvo interagem com a sonda imobilizada no substrato, e o estudo cinético permite determinar a velocidade na qual o equilíbrio da reação foi alcançado. Geralmente, os pares de bases intramoleculares envolvidos na estrutura secundária do DNA, estabilizam a conformação de um único filamento, criando uma barreira de energia mais elevada para a estrutura intermolecular. Isto, por sua vez, pode retardar a cinética de hibridação. Em aplicações como biossensor, esses efeitos podem ser diminuídos utilizando-se uma sonda e um alvo com pequeno número de bases nitrogenadas ou aumentando a temperatura de incubação. No entanto, com a redução do comprimento das cadeias de DNA e aumento da temperatura pode-se reduzir a especificidade de detecção do biossensor. Somado a isso, os biossensores podem perder o desempenho quando operados em altas temperaturas. Desta forma, faz-se necessária uma caracterização quantitativa dos efeitos da estrutura secundária de hibridação, sobretudo da hibridação que ocorre na superfície do dispositivo sensor.

Existem diversos modelos matemáticos para o estudo da cinética e termodinâmica da reação de hibridação em fase sólida¹³. No modelo cinético mais simples, a hibridação é tratada como uma reação que ocorre em uma única etapa, reversível com as constantes cinéticas k_a e k_d , como mostra a Equação 1,

onde o P (*probe*) representa a sonda, o T (*target*) o alvo e D a formação da dupla fita).



Erickson *et al.*¹⁴ apresentaram um modelo mais abrangente da cinética de hibridação de oligonucleotídeos em fase sólida, baseada em uma abordagem que inclui a hibridação direta e a hibridação após uma etapa inicial de adsorção não específica entre as moléculas alvo de DNA.

O modelo proposto baseia-se em dois tipos de hibridação: indireta na qual o alvo é inicialmente adsorvido inespecificamente no substrato e, em seguida, difunde-se ao longo da superfície para chegar as moléculas da sonda disponíveis; e/ou hibridação direta dos alvos em solução com a sonda imobilizada na superfície do substrato. Estes processos são mostrados na Figura 1.1. A primeira etapa é reversível e consiste na adsorção de alvos na superfície do biossensor, ou seja, adsorção física não específica. A segunda etapa, irreversível e que determina a taxa (velocidade) do processo, consiste na hibridação direta do alvo difundido na superfície do biossensor com a sonda imobilizada, ou seja, adsorção química.

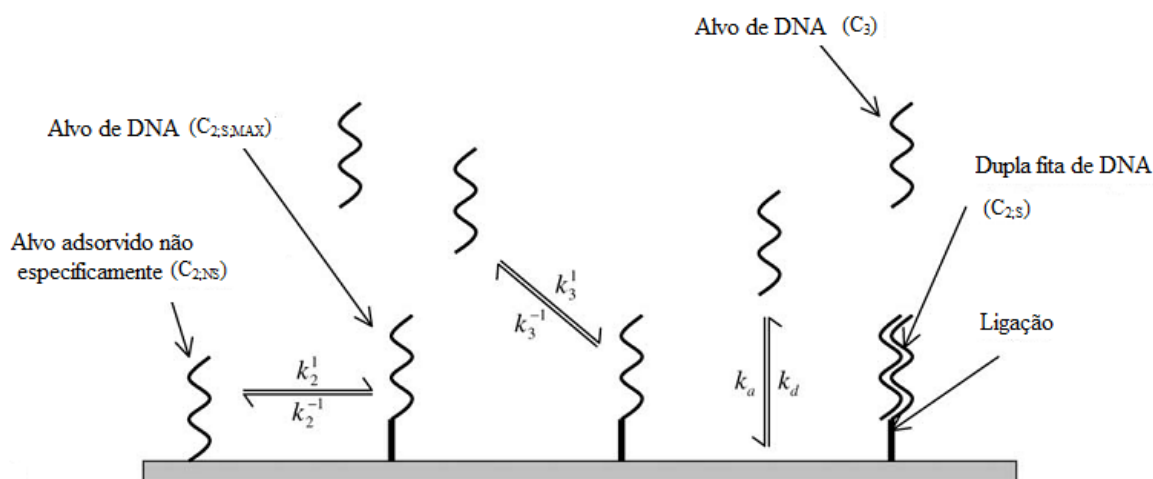


Figura 1.1. Representação esquemática do modelo proposto de hibridação de fase sólida DNA. Figura extraída e adaptada de ERICKSON *et al.* ¹⁴.

Na Figura 1.1 as constantes k_3^1 e k_3^{-1} representam hibridação e desnaturação dos alvos no seio da solução, k_2^1 e k_2^{-1} hibridação e desnaturação dos alvos adsorvidos não especificamente, k_a e k_d a adsorção e desorção reversível não específicas dos alvos na superfície do substrato sólido. As concentrações das espécies alvo são indicadas por $C_{2;S;MAX}$, $C_{2;S}$, $C_{2;NS}$ e C_3 representam a concentração total de alvos de DNA, a concentração de alvos hibridizados na superfície do substrato, a concentração de alvo adsorvido não especificamente e a concentração do alvo no seio da solução, respectivamente.

A investigação do mecanismo de hibridação de um ácido nucleico na interface eletrodo/solução pode ser feita por meio de um biossensor piezelétrico usando modelo cinético de dois mecanismos, ou seja, reação de segunda ordem. A constante cinética de adsorção de primeira ordem $k(s^{-1})$, calculada a partir das curvas de hibridação, é igual a $K_1.k_2.C / (1 + K_1.C)$, onde $C(M)$ é a concentração do alvo no seio da solução, $K_1(M^{-1})$ a constante de equilíbrio da adsorção não específica de Langmuir e $k_2(s^{-1})$ a constante cinética da hibridação específica na superfície.

A investigação sobre os mecanismos de hibridação dos ácidos nucleicos em um ambiente interfacial foi investigada por meio de um biossensor

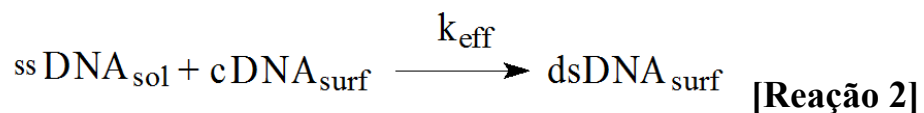
acústico por Su *et al.* ¹⁵. Os autores encontram a seguinte relação para a integral da cinética de hibridação:

$$\ln(1 - \eta) = - k.t \quad \text{[Eq. 1]}$$

Onde η é a taxa da eficiência de hibridação, e k a constante cinética de primeira ordem, que foi determinada como sendo igual a $8,0.10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (65 °C, 4000 bases, 3.10^{-9} M). Efeitos secundários na estrutura cinética foram recentemente investigados com um biossensor baseado em fluorescência ¹⁶. A lei cinética, obtida para alvos de DNA incluindo a estrutura secundária ou não, foi:

$$\ln(1 - \eta) = - k_{\text{eff}}.C.t \quad \text{[Eq. 2]}$$

Onde C (mol L^{-1}) é a concentração no seio da solução e k_{eff} ($\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$) a efetiva constante cinética de hibridação de primeira ordem igual a $12.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para o alvo sem a estrutura secundária (20°C, 25-bases) e $2.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ para o alvo (20°C, 25-bases). O valor de k_{eff} encontrado por Su *et al.* é igual a $2,7.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (65 °C, 4000 bases), estando portanto na mesma ordem de grandeza. O mecanismo de hibridação [2] levando em conta uma constante cinética e a concentração no seio da solução pode ser deduzida como sendo de uma única etapa, conforme representado na Reação 2.

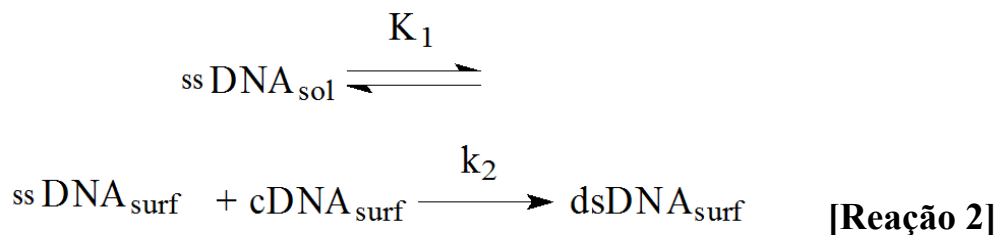


Muitos dos processos cinéticos de hibridação relatados são bem ajustados com uma cinética de primeira ordem, contudo, um estudo relata uma taxa de segunda ordem, quando interações laterais ocorrem, que é o caso de

altas concentrações de sonda na superfície ¹⁷. A integral da lei cinética é então igual a:

$$\eta = t / t + k_{\text{eff}} \cdot C \quad \text{[Eq. 3]}$$

Onde k_{eff} é a constante cinética efetiva de segunda ordem, sendo igual a $4,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (25 °C, 20-base). Por outro lado, há uma grande tendência para estudar os efeitos da cinética de hibridação em um ambiente interfacial por meio da cinética de primeira ordem similar a descrita na Equação 3. Esta equação é conveniente para esclarecer a dependência da estrutura do alvo com a cinética e tem sido largamente utilizada ¹⁴. Recentemente, um mecanismo em duas etapas foi utilizado para descrever a hibridação de ácidos nucleicos na superfície de nanotubos de carbono (Reação 2) ¹⁸.



Uma etapa rápida da adsorção, consistindo de uma adsorção física não específica do alvo na superfície do biossensor ($\text{ssDNA}_{\text{surf}}$). Uma segunda etapa determinante na taxa (velocidade), consiste na hibridação de um alvo difundindo na superfície do sensor até a sonda complementar imobilizada ($\text{cDNA}_{\text{surf}}$) produzindo uma fita dupla estável ($\text{dsDNA}_{\text{surf}}$). A integral da lei cinética é dada por:

$$\ln(1 - \eta) = -[K_1 \cdot k_2 \cdot C / (1 + K_1 \cdot C)] \cdot t \quad \text{[Eq. 5]}$$

Onde K_1 é a constante de equilíbrio da adsorção não específica e k_2 constante cinética de primeira ordem relacionada com a superfície de

hibridação. Essa lei é mais geral, e é igual a Equação 1 para pequenas concentrações do alvo.

A hibridação em fase sólida utilizada em dispositivos biossensores e em arranjos de biossensores de DNA, é um processo mais complexo do que a hibridação em solução. Embora nos últimos anos observam-se progressos significativos na compreensão física da hibridação de fase sólida, muitos aspectos fundamentais para o uso em aplicações tecnológicas ainda não são completamente entendidos. Alguns trabalhos sugerem que o meio líquido utilizado e a imobilização da sonda na superfície (densidade) afetam a cinética de hibridação dos ácidos nucleicos.

1.2. Biossensores

Nas últimas décadas, a química analítica tem experimentado um grande avanço relacionado com a capacidade de obtenção de informações químicas de materiais e compostos¹⁹. Um exemplo deste avanço da química analítica foi o desenvolvimento dos sensores e biossensores, dispositivos que têm adquirido importância devido ao fato destes atenderem algumas exigências que os métodos clássicos de análises não conseguem, sendo as características mais relevantes a simplicidade de construção, resposta rápida, baixo custo, elevada seletividade e sensibilidade, miniaturização, precisão e facilidade de uso. Além disso, os biossensores são utilizados para avaliação de processos sintéticos ou biológicos, assim como na compreensão de seus mecanismos²⁰.

Os biossensores são dispositivos capazes de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas por meio do uso de um elemento de reconhecimento biológico em contato direto com um sistema transdutor. São instrumentos seletivos, versáteis e relativamente econômicos que fornecem informação em tempo real, e estão sendo aplicados a uma grande variedade de problemas analíticos como no controle de bioprocessos com ampla aplicação na

indústria de alimentos, na saúde, na área petroquímica ²¹ e no controle do meio ambiente.

Biossensores são definidos como dispositivos analíticos nos quais um material biológico (proteínas, tecidos, organelas, microorganismos, ácidos nucleicos, etc) é incorporado ou integrado a um transdutor que pode ser óptico, eletroquímico, térmico, piezelétrico ou magnético e que irá converter o sinal químico ou bioquímico em um sinal elétrico. Eles são capazes de fornecer informações analíticas específicas quantitativas ou semi-quantitativas por meio do uso de um elemento de reconhecimento biológico em contato direto com um sistema transdutor. A Figura 1.2 mostra um diagrama esquemático dos componentes básicos de um biossensor. O elemento biológico ou o elemento sensor tem a propriedade de reconhecer seletivamente o analito. A interação resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas (modificação de pH, transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons) que são detectadas e medidas pelo transdutor. O principal objetivo é produzir um sinal elétrico proporcional em magnitude e/ou frequência à concentração de um determinado analito ou grupo de analitos que interagem com o elemento biossensível. A parte eletrônica é constituída de um amplificador dos sinais elétricos e do sistema de processamento dos dados.

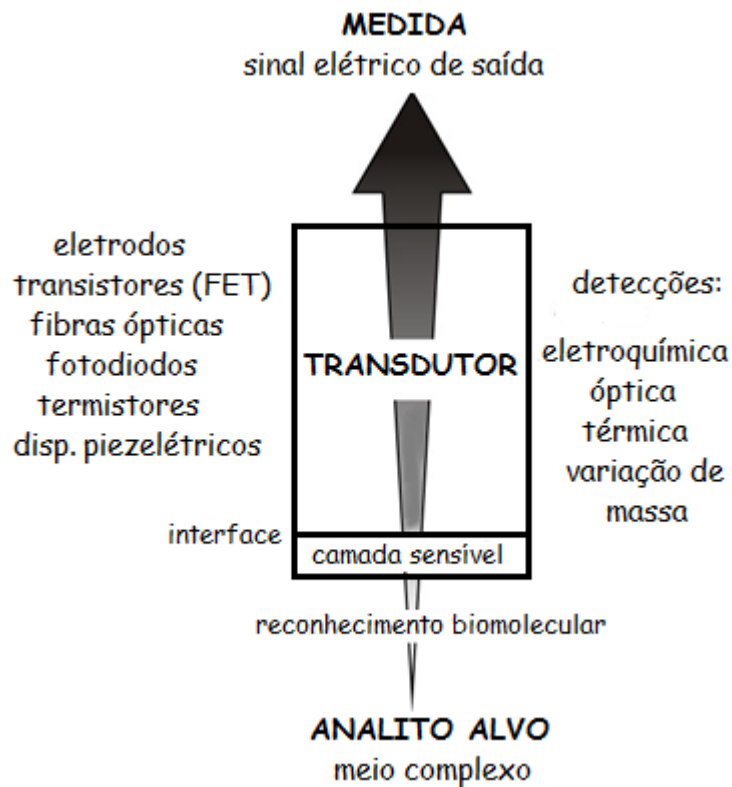


Figura 1.2. Diagrama esquemático dos componentes de um biossensor.

O desenvolvimento de biossensores deve levar em consideração os efeitos do ambiente sobre a capacidade de ligação dos elementos responsáveis pelo reconhecimento molecular imobilizados no transdutor. Isto envolve uma análise cuidadosa da natureza do substrato sólido utilizado o que está intimamente ligada com o mecanismo de transdução escolhido. Parâmetros como o método de imobilização escolhido (covalente, adsorção, ligações cruzadas, etc), condições experimentais utilizadas (pH, força iônica, temperatura) assim como o comprimento da sonda de DNA e a densidade de moléculas imobilizadas tem consequências diretas na reprodutibilidade e na sensibilidade do biossensor.

1.2.1 Biossensores de DNA – Genossensores

Nos seres vivos, existem dois tipos de ácidos nucleicos: o RNA (ácido ribonucleico) e o DNA, primeiramente isolado por Friedrich Miescher,

em 1869. Eles constituem a base química da hereditariedade. Os organismos são feitos de bilhões de células individuais, e o DNA é o centro de controle de cada célula. Estas duas substâncias são formadas por unidades menores (monoméricas), conhecidas como nucleotídeos. Cada nucleotídeo possui três componentes moleculares, um grupamento fosfato (P), um açúcar pentose (ribose ou desoxirribose) e uma base nitrogenada (adenina, guanina, citosina, timina ou uracila). O DNA é formado por uma sequência de unidades repetitivas de moléculas do açúcar 2-desoxirribose ligadas por meio de ligações fosfodiéster entre o grupo –OH na posição 5' de uma molécula do açúcar e outro grupo –OH na posição 3' da outra molécula de desoxirribose. Os nucleotídeos do DNA apresentam as bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), como mostra a Figura 1.3.

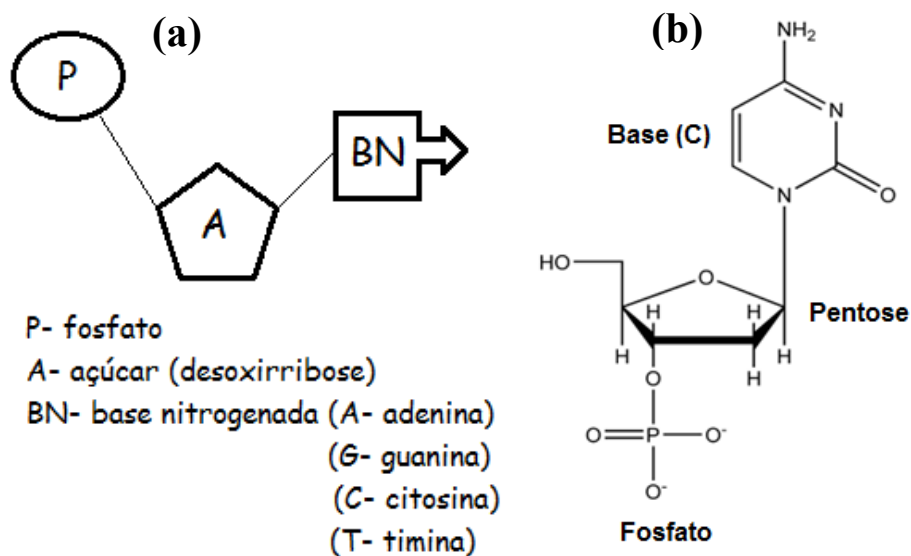


Figura 1.3. (a) Representação de um nucleotídeo contendo o grupo fosfato, o açúcar (pentose) e as bases nitrogenadas (A, G, C, T). (b) Estrutura química de um nucleotídeo.

Todos os seres vivos possuem DNA e RNA e somente os vírus possuem ou DNA ou RNA. Watson e Crick descobriram que o DNA é formado por dois filamentos, e que estes filamentos encontram-se enovelados juntos – a

conhecida estrutura de dupla hélice (Figura 1.4). Os lados da escada compreendem as porções fosfato-açúcar dos nucleotídeos adjacentes ligados juntos. O fosfato de um nucleotídeo é ligado covalentemente ao açúcar do próximo nucleotídeo. As ligações de hidrogênio entre os fosfatos fazem o filamento de DNA se torcer. As bases de nitrogênio apontam para dentro da escada e formam pares com bases no outro lado, como degraus. Cada par de bases é formado por dois nucleotídeos complementares presos juntos por ligações de hidrogênio. No DNA a quantidade de adenina é sempre igual a de timina, e a quantidade de guanina é sempre igual à de citosina. Isso porque a adenina está ligada à timina e a guanina se liga à citosina. Essas ligações são feitas por meio de pontes de hidrogênio, duas pontes nas ligações A-T e três pontes nas ligações C-G. O DNA carrega todas as informações das características físicas dos seres vivos que, essencialmente, são determinadas pelas proteínas. No DNA, cada proteína é codificada por um gene (uma sequência específica de nucleotídeos do DNA que especificam como uma única proteína será feita).

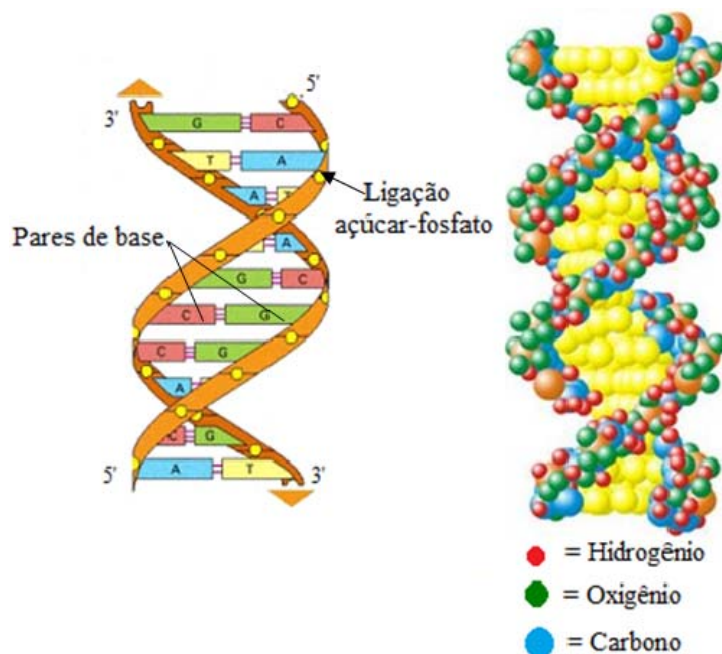


Figura 1.4. Estrutura em dupla hélice do DNA.

O emparelhamento de bases nitrogenadas complementares de duas fitas simples de DNA dá origem a uma dupla fita em forma de hélice. Sequências de bases totalmente complementares podem se unir, formando a fita dupla e esse processo é conhecido como hibridação. Esse fenômeno também ocorre para fitas de DNA que não são totalmente complementares, mas o número de bases não complementares afeta a estabilidade da fita dupla de DNA e, conseqüentemente, reduz a temperatura de fusão. A estabilidade termodinâmica de uma fita de DNA é frequentemente citado como a temperatura de fusão (T_m) na qual 50% da amostra é desnaturada. Essa temperatura varia de acordo com o tamanho e a sequência de bases nitrogenadas da cadeia de DNA e também do meio em que se encontra.

A ideia de imobilizar e hibridar moléculas de DNA em um suporte sólido foi proposta primeiramente por Denhardt e colaboradores, conduzindo ao desenvolvimento de metodologias de identificação de sequências no DNA genômico e de clonagem. Segundo Dyson, desde as descobertas de Denhardt e Southern³ as técnicas de hibridação em membranas tornaram-se gradativamente sofisticadas, principalmente devido à melhor compreensão acerca dos fatores que influenciam a taxa de hibridação e estabilidade dos híbridos.

Nos ensaios de hibridação convencionais, como eletroforese em gel e *Southern blotting* um ácido nucleico é fixado a uma membrana de nitrocelulose ou mais comumente *nylon*, e então outro ácido nucleico (sonda) marcado com radioisótopos, enzimas ou moléculas quimioluminescentes, por exemplo, é mantido em solução³. Esta membrana é mergulhada em um tampão com o DNA da sonda e incubada durante várias horas para que ocorra a hibridação, formando híbridos detectáveis por meio de técnicas espectrofotométricas devido à marcação da sonda. Nestes métodos em fase sólida, no entanto, é necessário fazer a separação das cadeias emparelhadas e não emparelhadas de ácidos nucleicos por filtração e as moléculas alvo de DNA são geralmente modificadas com moléculas fluorescentes ou radioativas para

detectar a hibridação em uma superfície sólida. São métodos com tempo relativamente longo para a análise dos resultados.

O desenvolvimento de um genossensor para avaliar a hibridação de uma sequência de DNA consiste primeiramente na imobilização de um oligonucleotídeo na superfície de um transdutor (suporte sólido). Os oligonucleotídeos (ODNs) são sequências curtas de DNA, contendo geralmente 20 bases nitrogenadas e são utilizados como sonda de DNA (ssDNA – *single strand DNA*) em uma camada de biorreconhecimento como mostra a Figura 1.5. A fita de DNA imobilizada no transdutor pode sofrer hibridação com uma sequência alvo complementar a fita imobilizada formando uma fita dupla (dsDNA – *double strand DNA*). Esta dupla fita de DNA formada na superfície do transdutor é conhecida como híbrido. O esquema geral de um genossensor é apresentado na Figura 1.7.

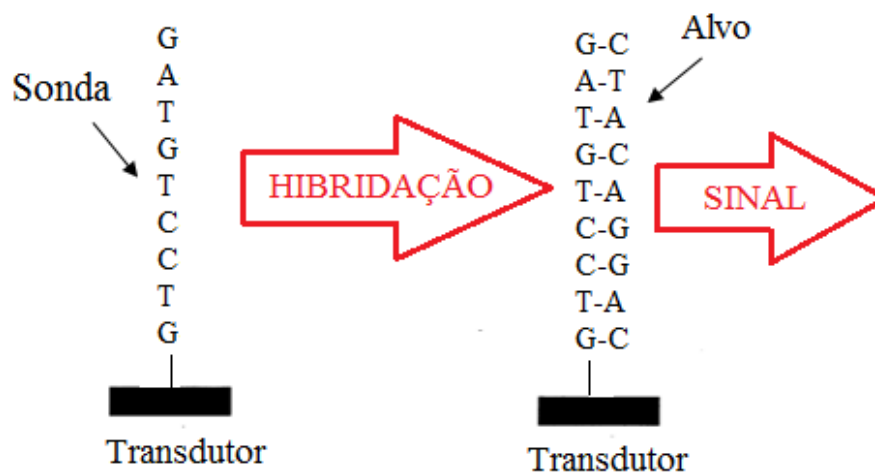


Figura 1.5. Diagrama esquemático de um biossensor de DNA. A hibridação entre a sonda e o alvo de DNA ocorre na camada de reconhecimento do transdutor, que transforma este evento em um sinal analítico mensurável. Figura adaptada do trabalho de GOODING *et al.*²².

As metas para melhorar a eficiência dos biossensores de DNA incluem um aumento na sensibilidade, a modificação da superfície, elevada densidade de sondas na superfície do transdutor, a estabilidade da camada de

DNA imobilizada e acessibilidade das moléculas de interação, bem como a minimização de interações não-específicas.

Apesar da semelhança entre os processos de hibridação convencionais em solução e em uma interface (genossensor), a porcentagem de hibridação em geral é maior no primeiro caso, assumindo sequências de DNA idênticas e nas mesmas condições. Isto pode ser atribuído à indisponibilidade parcial de muitos grupos de ligação da sonda de DNA por estarem eventualmente envolvidos no processo de imobilização. Nesse sentido um fator muito importante a ser considerado no desenvolvimento de um biossensor de DNA é a densidade da sonda imobilizada na superfície do transdutor pois isto pode afetar significativamente a eficiência da hibridação ¹². Uma alta densidade de DNA na superfície do transdutor pode diminuir a eficiência de hibridação devido a impedimentos estéricos entre as sondas assim como repulsão entre as moléculas alvo hibridizadas. A cinética de hibridação também pode ser alterada quando a sonda de DNA é imobilizada na superfície de um transdutor. Por isso, a eficiência de hibridação na interface eletrodo/solução deve ser otimizada em relação às condições ambientais como força iônica e temperatura e é necessário eliminar ou minimizar as adsorções não-específicas.

A questão-chave para o desenvolvimento de um genossensor é como aumentar a quantidade de imobilização da sonda de DNA, e, além disso, manter a acessibilidade da sonda para detecção de hibridação. A fim de aumentar a quantidade de imobilização de DNA sonda e aperfeiçoar a eficiência de hibridação de DNA, diferentes tipos de estratégias têm sido desenvolvidos, incluindo o uso de nanomateriais para modificação da superfície do eletrodo na fabricação de biossensores de DNA, devido à sua elevada área superficial, excelentes propriedades eletroquímicas e melhor orientação possível podem levar a um efeito benéfico na imobilização e hibridação DNA.

A natureza do substrato sólido no qual a sonda será imobilizada é outro parâmetro que pode influenciar a seletividade da ligação entre a sonda e o

alvo complementar no desenvolvimento de um genossensor. Geralmente, os materiais utilizados incluem ouro, sílica e substratos poliméricos, cada um deles apresenta propriedades diferentes em soluções aquosas que podem influenciar nas condições de trabalho tais como a funcionalização da superfície, o pH, força iônica e propriedades elétricas.

Quando o substrato escolhido como transdutor para ancorar a molécula de DNA é o ouro, a sonda é geralmente modificada com um grupo sulfeto em uma das extremidades para explorar a afinidade de tióis com o metal. Alguns autores demonstraram que a sonda de DNA tende a adsorver não especificamente com o ouro formando um complexo ²³. As sondas encontram-se “deitadas” na superfície o que impede ou diminui o processo de hibridação com a fita complementar. Neste trabalho o uso de moléculas de cadeia curta contendo tióis foi utilizado para evitar a adsorção não específica entre o DNA e o metal e diminuir os efeitos por impedimento estérico entre as sondas, melhorando com isso a eficiência de hibridação. O 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) é a molécula mais comumente utilizada para formação de monocamadas mistas contendo a sonda de DNA e o tiol como espaçador.

Os biossensores de ácidos nucleicos, ao contrário dos dispositivos que utilizam enzimas e anticorpos, são mais estáveis e facilmente reutilizáveis. O aquecimento térmico separa a dupla fita de DNA permitindo realizar uma nova hibridação com outro alvo complementar. O diagnóstico de doenças infecciosas, com biossensores de DNA permite distinguir diferentes linhagens de um patógeno pela escolha adequada de sondas específicas para obter um diagnóstico mais precoce em comparação com imunossensores. Por isso, os genossensores são intensamente estudados para aplicação em diagnóstico ⁵, monitoramento ambiental ²⁴ e controle de qualidade de alimentos ²⁵.

O desenvolvimento de um genossensor tem como objetivo a fabricação de um dispositivo comercial com alta sensibilidade e seletividade para detectar, por exemplo, um polimorfismo de nucleotídeo único nas cadeias

de DNA, utilizando-se amostras de pacientes diretamente (sem tratamento prévio) e em tempo real. Nas metodologias mais usadas para a detecção de um SNP ainda é necessário a amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase até atingir níveis detectáveis de DNA. O PCR é um método de amplificação do DNA sem o uso de um organismo vivo como as bactérias ou leveduras. Os esforços no desenvolvimento de genossensores estão voltados para produzir sistemas de detecção livres da amplificação por PCR com os atributos de sensibilidade e seletividade capazes de calibração interna e condicionamento de sinal adequado com pouco esforço necessário em termos de pré-tratamento das amostras para o desenvolvimento de dispositivos portáteis comerciais, mas entretanto, este objetivo ainda não foi plenamente alcançado.

1.3. Mecanismos de transdução usados no desenvolvimento de biossensores de DNA

Algumas técnicas analíticas capazes de avaliar fenômenos em superfícies e interfaces vêm adquirindo importância para o estudo e desenvolvimento de biossensores. A transdução do processo de hibridação de DNA em uma interface de reconhecimento tem sido feita por métodos eletroquímicos, ópticos, espectroscópicos, microscópicos e/ou acústicos como espectroscopia de impedância eletroquímica ²⁶, ressonância plasmônica de superfície (SPR – *surface plasmon resonance*) ²⁷, espectroscopia Raman ²⁸, microscopia de força atômica (AFM – *atomic force microscopy*) ²⁹ e microbalança de cristal de quartzo ³⁰ entre outros.

Os biossensores de DNA usando a QCM têm sido utilizados em diferentes áreas de pesquisa como no diagnóstico genético ³¹, na detecção de organismos geneticamente modificados ²⁵, na detecção de bactérias ³² e em toxicologia ³³. Além disso, estes dispositivos têm sido usados com sucesso para investigar vários mecanismos biomoleculares como a cinética de hibridação do

DNA na superfície do transdutor ¹⁵, a interação do DNA com proteínas ³⁴⁻³⁶, avaliação dos danos a cadeia de DNA provocados pela radiação UV-C ³⁷, interação do DNA com drogas ³³ e polimerização supramolecular do DNA ³⁸.

Uma sequência de bases nitrogenadas de DNA geralmente possui um alto peso molecular e o processo de hibridação da sonda com um alvo complementar irá causar um aumento de massa na superfície de um cristal de quartzo piezelétrico. O aumento de massa pode estar especificamente relacionado com uma mudança na frequência fundamental de ressonância do cristal. Este é o princípio de funcionamento da microbalança de cristal de quartzo, uma técnica eletrogravimétrica extremamente sensível que utiliza a propriedade ressonante de alguns materiais cristalinos. O material mais comumente utilizado é o quartzo α , que consiste de uma forma cristalina específica do dióxido de silício (SiO_2), na forma de discos com corte AT. Esta geometria fornece ao cristal uma oscilação estável sem influências da variação da temperatura (entre 20 e 40 °C) na frequência fundamental do material. Esses discos, normalmente, são circulares e possuem eletrodos metálicos, geralmente ouro ou prata, depositado em ambos os lados ³⁹⁻⁴¹. A Figura 1.6 mostra o cristal de quartzo utilizado na técnica de QCM e seu modo de cisalhamento.

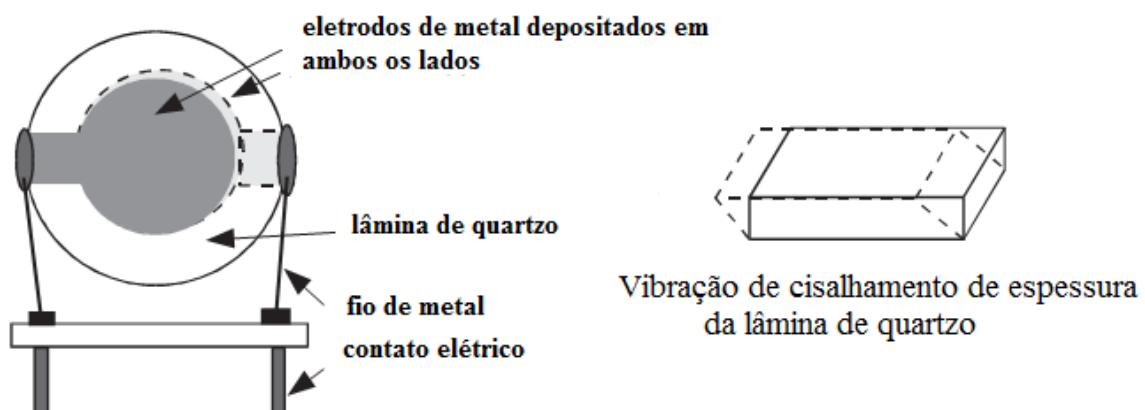


Figura 1.6. Cristal de quartzo com eletrodos de ouro depositados nos dois lados utilizados na técnica de microbalança de cristal de quartzo e seu modo de cisalhamento de espessura.

A adsorção de uma determinada massa, em um dos lados (ou em ambos) do eletrodo metálico, pequena quando comparada à massa do cristal de quartzo (até 2% da massa do cristal), causa um decréscimo na frequência de oscilação do cristal de quartzo proporcional à massa do filme depositado. Os transdutores piezelétricos são utilizados como sensores químicos desde a descoberta da relação entre a massa adsorvida de um filme rígido e as variações na frequência ressonante do cristal de quartzo, feita por Sauerbrey ⁴². A Equação 6 mostra a relação estabelecida por Sauerbrey em 1959.

$$\Delta f = -\frac{2f_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} \quad [\text{Eq. 6}]$$

A variação de frequência, Δf , da frequência de ressonância do cristal piezelétrico, f_0 , é diretamente proporcional a mudança de massa na superfície Δm . Desta forma, a variação de massa sobre a superfície do cristal pode ser determinada pela medida da diminuição da frequência ressonante.

A microbalança de cristal de quartzo tem aplicações nos mais diversos tipos de sistemas, tanto em meio gasoso ⁴³ como em meio líquido ⁴⁴. Observa-se um crescimento no número de publicações em meio líquido, especialmente às aplicações nos estudos de interações biomoleculares como a construção de imunossensores ⁴⁵⁻⁴⁷, no monitoramento de processos cinéticos de adsorção-desorção, no estudo dos problemas de imobilização molecular e em sistemas biomoleculares mais complexos, incluindo estudos com células vivas ⁴¹. Além disso, os experimentos podem ser realizados sem a necessidade de utilizar marcadores o que leva a uma economia tanto de tempo quando de custo ⁴⁸. Os genossensores são bastante sensíveis para investigar a hibridação de duas

cadeias complementares de DNA ⁴⁹, para detectar DNA não-marcado ³⁴, permitem identificar defeitos na fita de DNA ⁵⁰⁻⁵¹, podem ser reutilizáveis ²⁵ e permitem a realização de multi-análises ⁵²⁻⁵³. A confiabilidade dos resultados com a QCM tem sido verificada por diferentes métodos complementares tais como: espectroscopia de impedância eletroquímica ⁵⁴, análises de impedância piezométrica ⁵⁵⁻⁵⁶, espectroscopia de fluorescência ⁵⁶, ressonância de superfície plasmônica ^{7, 57}, microscopia de força atômica ⁵⁸⁻⁵⁹ e espectroscopia de fotoelétrons ⁶⁰.

Recentemente observa-se um grande desenvolvimento e aplicação da técnica de QCM combinada a técnicas eletroquímicas, de forma a gerar um conjunto grande de dados, simultaneamente conduzindo a medidas detalhadas dos sistemas interfaciais e superficiais e, assim, contribuindo de maneira decisiva para o entendimento destes processos. O uso de técnicas eletroquímicas no estudo da hibridação da molécula de DNA para o desenvolvimento de biossensores tem crescido em popularidade nos últimos anos na tentativa de oferecer métodos alternativos para o diagnóstico clínico.

As vantagens da transdução eletroquímica para detectar sequências específicas de DNA comparado, por exemplo, com outras técnicas utilizadas em biossensores, como fluorescência ⁶¹, são alta sensibilidade, compatibilidade com microfabricação, rapidez, baixo custo, baixo consumo de energia e instrumentação simples, que é compatível com dispositivos portáteis ². Várias abordagens para a detecção eletroquímica vem sendo desenvolvidas, incluindo o uso de eletrodos modificados, ampliações eletroquímicas com uso de nanopartículas, mediadores redox específicos e marcação da sonda de DNA com enzimas ou metais ⁶².

Em geral, um genossensor é composto de um componente de bioreconhecimento e um transdutor, que converte o evento de hibridação ou a presença de DNA na superfície em um sinal elétrico mensurável. A formação da dupla fita pode ser detectada direta ou indiretamente, após a associação de um

indicador adequado de hibridação ou através da modificação química de uma das fitas de DNA. Por isso, podemos dividir os biossensores de DNA em dois grupos, os marcados (*label-based*) e os não marcados (*label-free*). Os biossensores marcados em geral, utilizam uma substância eletroquimicamente ativa para a transdução do evento de hibridação. A molécula eletroativa pode ser associada ao eletrodo, a sonda ou ao alvo de DNA, ou estar presente na solução. Quando utiliza-se compostos que são diretamente ligados a molécula, estes são geralmente ligados a porção inferior ou superior da fita de DNA ou intercalados entre as duas fitas. Sistemas não marcados detectam o evento de hibridação através de uma mudança nas propriedades físicas da camada de reconhecimento, resultando em uma mudança no sinal elétrico mensurável. Os sistemas que utilizam marcadores geralmente apresentam como vantagem um aumento da sensibilidade de detecção, mas eles são sistemas muito mais complexos. Os oligonucleotídeos podem ser marcados com enzimas como a peroxidase e fosfatase alcalina⁶³⁻⁶⁴ ou substâncias eletroativas como ferroceno ou antraquinona⁶⁵⁻⁶⁶ para detecção indireta da hibridação. Complexos metálicos e corantes orgânicos também podem ser utilizados em biossensores de hibridação. As mudanças na resposta eletroquímica desses marcadores são, então, monitorados para detectar a hibridação.

Nos biossensores eletroquímicos indiretos, uma cadeia única de DNA é imobilizada em uma superfície eletricamente ativa (eletrodo), e mede-se as alterações nos parâmetros elétricos (corrente, potencial, condutividade, impedância ou capacitância), causados pela reação de hibridação na superfície do transdutor. A detecção eletroquímica da hibridação do DNA utilizando uma molécula marcadora (intercalador) é mostrada na Figura 1.7.

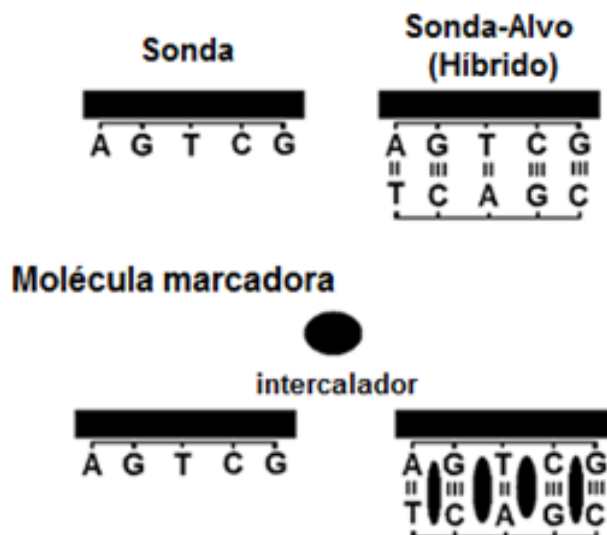


Figura 1.7. Representação esquemática utilizando uma molécula marcadora entre as fitas de DNA. O intercalador liga-se seletivamente ao híbrido provocando um aumento do sinal eletroquímico. Figura adaptada do trabalho de KERMAN *et al.* ⁶⁷.

As técnicas voltamétricas são ferramentas convenientes e frequentemente utilizadas para detecção de DNA. Amplificação do sinal eletroquímico de hibridação também pode ser alcançado por meio de modificação das cadeias de DNA com nanopartículas metálicas ⁶⁸⁻⁶⁹. A oxidação catalítica da guanina também é usada para detecção de DNA ⁷⁰, assim como ensaios mais sofisticados usando enzimas ligadas a substâncias redox que são ancoradas em uma das fitas de DNA formando uma estrutura tipo sanduíche ⁷¹⁻⁷².

A técnica de voltametria cíclica (*CV – cyclic voltammetry*) consiste na aplicação de potencial no eletrodo de trabalho, que varia continuamente no tempo de forma direta e reversa, por exemplo, é aplicado um potencial inicial que varia até um segundo potencial. Subsequentemente, o potencial do eletrodo retorna ao potencial inicial. Daí o nome voltametria cíclica. A variação do potencial conduz à ocorrência de reações de oxidação e redução entre o eletrodo e as espécies eletroativas da solução, causando, por consequência, variações no

valor da corrente, a qual é acompanhada ao longo da variação do potencial, obtendo-se um gráfico da variação da corrente em função do potencial. Dentre os diversos usos dessa técnica, podemos citar o estudo de mecanismos de reações eletroquímicas e identificação de espécies presentes em soluções. A técnica também vem sendo utilizada no desenvolvimento de genossensores eletroquímicos, imobilizando-se um ácido nucleico na superfície de um transdutor (eletrodo de trabalho)^{22, 73}. Quando a sonda de DNA imobilizada no eletrodo interage com uma molécula alvo complementar podemos observar tanto mudanças nas propriedades elétricas interface eletrodo/solução quanto variações em processos redox seja das bases nitrogenadas ou de marcadores eletroquímicos.

Uma outra técnica que torna-se cada vez mais popular para as medidas eletroquímicas de interações moleculares é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS - *electrochemical impedance spectroscopy*) que pode ser utilizada em uma variedade de aplicações incluindo o desenvolvimento de biossensores. Há um número crescente de publicações sobre o uso da técnica de EIS em genossensores utilizando eletrodos contendo sondas de DNA imobilizadas para detectar moléculas alvo complementares por meio do processo de hibridação das cadeias. Os usos da técnica, entretanto, não são limitados ao estudo de interações entre proteínas ou a hibridação de duas cadeias de DNA. Também encontram-se na literatura estudos nos quais o eletrodo foi modificado com a fita dupla de DNA (híbrido) e este foi usado para detectar moléculas específicas como fármacos com atividade anticarcinogênica⁷⁴⁻⁷⁵.

A EIS permite medir com grande sensibilidade a variação no processo de transferência de carga na superfície do eletrodo. A técnica é uma ferramenta muito comum na pesquisa e desenvolvimento de materiais, pois os resultados desta técnica podem frequentemente ser relacionados a diversas variáveis, tais como a microestrutura, influência da composição na

condutividade de sólidos, propriedades dielétricas, entre outras. A técnica de impedância pode ser caracterizada como uma técnica não estacionária, na qual é utilizada uma perturbação sobre um sistema que se encontra num estado estacionário. Podemos aplicar uma perturbação de potencial ou de corrente ao sistema. Não importa qual a forma da perturbação usada, o necessário é que a amplitude da perturbação seja pequena. A importância de se aplicar uma perturbação de pequena amplitude deve-se ao fato de que, desta forma, a resposta do sistema vai se manter linear.

Na técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica aplicando-se uma perturbação de pequena amplitude ao sistema, empregando poucos milivolts, podemos investigar fenômenos eletroquímicos próximos ao estado de equilíbrio. Além disto, é possível perturbar o sistema usando diferentes valores de frequência, pois a onda de potencial é senoidal. Uma vez que a perturbação no sistema sob investigação é de pequena amplitude é possível empregar a técnica para a análise de etapas de um mecanismo reacional. Na EIS surge uma corrente de natureza senoidal como resultado da aplicação de um potencial senoidal ao sistema. Mediante um monitoramento das relações entre o potencial aplicado e a corrente são obtidas a impedância do sistema e o ângulo de fase (defasagem da corrente em relação ao potencial aplicado). Do mesmo modo que no circuito elétrico, a interface eletroquímica, por exemplo, metal/solução, responde a uma variação em corrente ou potencial. Entretanto, esta variação não será mais função dos componentes elétricos, e sim dos diferentes processos eletroquímicos que ocorrem na interface, que são caracterizados pelas respectivas constantes de tempo ⁷⁶.

Os dados de impedância são registrados em uma ampla faixa de frequências, utilizando uma corrente alternada (AC) de pequena amplitude, por isso encontramos muitas vezes na literatura o termo impedância AC. O uso da técnica de impedância é menos destrutivo para medir interações biológicas porque é realizado em geral próximo ao potencial de circuito aberto do sistema

ao qual é aplicado uma estreita faixa de amplitude de potenciais. O método possui alta sensibilidade, facilidade de quantificação do sinal e capacidade de separar os eventos de ligação que ocorrem na superfície daqueles em solução, vantagens em comparação com outros métodos eletroquímicos que também são utilizados para caracterizar as interações moleculares na superfície de eletrodos como voltametria cíclica ou voltametria de pulso diferencial (DPV – *differential potential voltammetry*).

Espécies eletroquimicamente inertes também podem ser medidas por meio da técnica de EIS, sendo estas realizadas na presença de um par redox, como o ferri/ferrocianeto de potássio, que sofre oxidação e redução na superfície do eletrodo a um certo potencial aplicado durante a realização das medidas. A medida em que a área superficial disponível para a reação redox diminui, devido a imobilização de um analito, por exemplo, o valor de impedância aumenta. Os ácidos nucleicos podem ser imobilizados na superfície de um transdutor, e isso causa um bloqueio da superfície do eletrodo dificultando ou impedindo a oxidação/redução do ferro. Esta dificuldade na transferência de elétrons interfacial leva portanto, a uma mudança na resistência de transferência de carga, R_{tc} . Assim, a espectroscopia de impedância eletroquímica pode ser um meio eficaz para acompanhar a adsorção e imobilização de ácidos nucleicos em superfícies condutoras, e caracterizar os processos de hibridação de DNA na interface eletrodo/solução ⁷⁷. Por meio da técnica de EIS também podemos monitorar uma mudança na capacitância da dupla camada elétrica após hibridação do DNA. A dupla fita formada tem condutividade eletrônica significativa, devido ao emparelhamento dos pares de bases nitrogenadas no processo de hibridação e isso causa um aumento na condutividade que também pode ser medido com o uso da técnica de impedância.

Entretanto devido a alta sensibilidade do método o analista deve tomar cuidado na obtenção de dados confiáveis e reproduzíveis, controlando bem os parâmetros experimentais do sistema para evitar a aquisição de

resultados falso-positivos ou falso-negativos ⁷⁸. Um parâmetro importante a ser analisado quando se utiliza a técnica de EIS é a natureza do substrato sólido no qual a sonda de DNA será imobilizada que pode apresentar propriedades físicas diferentes, como comentado anteriormente nesta introdução. Essas propriedades interfaciais do substrato como carga da superfície e capacidade de ligação de hidrogênio, influenciam o grau em que os sinais falso-positivos podem ser gerados. Isto pode ser o resultado de processos como a adsorção não seletiva de materiais em solução e podem influenciar a estrutura das biomoléculas imobilizadas, fornecendo sítios de interação adsortiva entre a superfície do substrato e as biomoléculas imobilizadas alterando a capacidade de biomoléculas imobilizadas combinarem-se seletivamente.

Uma das limitações em eletroquímica era a incapacidade de realizar estudos de forma pontual. As medidas eletroquímicas eram resultados de uma média das propriedades eletroquímicas de uma grande área superficial porque o efeito da heterogeneidade superficial localizada era muito difícil de ser quantificado. Recentemente, no entanto, o surgimento da tecnologia de microfabricação permitiu a produção de eletrodos cada vez menores ⁷⁹. O comportamento destes eletrodos com dimensões muito menores é bem diferente do comportamento de eletrodos convencionais. Estas diferenças são causadas pela mudança nas condições do transporte de massa na solução em direção ao eletrodo e têm implicações práticas importantes, como um decréscimo na queda ôhmica de potencial, um rápido estabelecimento do sinal de estado estacionário, um aumento de corrente devido à melhora do transporte de massa nas vizinhanças do eletrodo e um aumento na razão sinal-ruído ⁸⁰. O uso de microeletrodos em técnicas eletroquímicas locais foi um grande avanço, pois permite obter informações químicas e físicas em escala microscópica.

A técnica de varredura de microscopia eletroquímica (SECM-*scanning electrochemical microscopy*) desenvolvida por Bard ⁸¹, consiste em movimentar um pequeno eletrodo sobre uma superfície para obter uma imagem

de sua topografia ou reatividade do substrato. Na maioria dos casos, o eletrodo utilizado é um ultramicroeletrodo (UME - *ultramicroelectrode*) e o sinal é uma corrente Faradaica da eletrólise das espécies em solução. Quando uma diferença de potencial é aplicada entre o substrato e o microeletrodo, o mediador sofrerá uma reação redox e a corrente registrada vai depender da distância entre eles e da natureza condutora ou isolante do substrato⁸². Através do monitoramento do comportamento das espécies eletroquimicamente ativas, a técnica de SECM gera informações em tempo real com alta resolução espacial, seletividade e versatilidade.

A técnica citada tem se mostrado útil no estudo de um número extenso de sistemas, desde os mais simples eletrólitos contendo uma única espécie eletroativa até sistemas biológicos complexos como a determinação de sequências específicas de DNA. Por ser muito versátil, a técnica pode ser usada para obter imagens topográficas de superfícies e para estudar a condutividade, a atividade química e atividade catalítica de um substrato⁸³⁻⁸⁴. Uma das primeiras aplicações da técnica foi a detecção de diferenças na atividade eletroquímica de materiais heterogêneos, como superfícies formadas de carbono-ouro, cobre-chumbo e carbono-platina.

Na técnica de SECM, o ultramicroeletrodo é usado para fazer uma varredura na superfície do substrato e também o volume de solução existente acima do mesmo, a fim de quantificar a concentração de espécies existentes ou geradas/consumidas nestes domínios. Um gráfico da corrente de microeletrodo, I , em função da distância entre o microeletrodo e o substrato, d , quando aquele é movido perpendicularmente de encontro ao substrato, é chamado de curva de aproximação (i vs d)⁸⁴.

Quando o ultramicroeletrodo é posicionado próximo a um substrato isolante, como um pedaço de vidro ou plástico (Figura 1.8 A), o substrato bloqueia parte da difusão da espécie oxidada para o microeletrodo e a corrente será menor. Quanto mais próximo o microeletrodo estiver do substrato, menor

será o valor de corrente. No limite, quando a distância entre eles se aproximar de zero, a corrente também se aproximará de zero. Este decréscimo na corrente em função da distância é chamado de “feedback negativo”⁸⁵. O fenômeno de “feedback positivo” ocorre quando o microeletrodo é posicionado próximo de um substrato condutor (Figura 1.8 B). Em um substrato condutor, no limite, quando a distância entre microeletrodo e substrato se aproxima de zero, o microeletrodo entrará num regime onde o tunelamento de elétrons ocorre e a corrente alcança valor muito elevado. O aumento da corrente em função da diminuição da distância é então chamado de “feedback positivo”^{83, 86}.

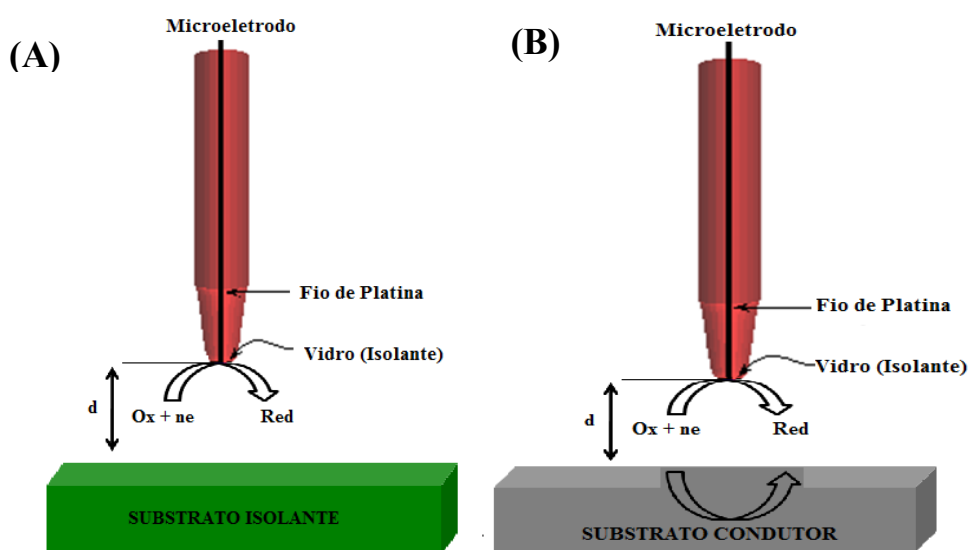


Figura 1.8. Representação dos modos: (A) “feedback negativo” (substrato isolante) e (B) “feedback positivo” (substrato condutor).

O transporte de carga através da molécula de DNA tem sido objeto de inúmeros estudos, pois o DNA pode ser descrito como um isolante, semicondutor, ou fio molecular⁸⁷. A auto-montagem de DNA também tem atraído grande atenção, por exemplo, com o uso de DNA como um modelo para a construção de nanocircuitos eletrônicos. Além disso, as camadas de DNA têm sido propostas como base de dispositivos eletroquímicos para reconhecer hibridação de DNA e, com isso, identificar sequências alvo de DNA.

Capítulo 2

Objetivo

2.1. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um genossensor para identificar sequências de bases nitrogenadas do DNA de algas da espécie *Alexandrium* por meio das técnicas de microbalança de cristal de quartzo e eletroquímicas como voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia de varredura eletroquímica.

Capítulo 3

Procedimiento Experimental

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais adotados durante o desenvolvimento deste trabalho, além dos equipamentos e reagentes utilizados.

O trabalho experimental dividiu-se em quatro partes: 1) medidas *in situ* das etapas de imobilização, hibridação e regeneração do genossensor utilizando a técnica de microbalança de cristal de quartzo; 2) medidas eletroquímicas das mesmas etapas de desenvolvimento do genossensor; 3) construção de um arranjo de microeletrodos (*microarrays*) para avaliar a resposta seletiva do processo de hibridação por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica; 4) medidas eletroquímicas com a técnica de microscopia eletroquímica de varredura.

3.1. Material e Métodos

3.1.1. Reagentes e Soluções

Foram utilizados os reagentes ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanossulfônico (tampão HEPES), 6-mercaptop 1-hexanol (MCH), nitrato de potássio (KNO_3), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) e ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), todos Sigma–Aldrich e ácido sulfúrico (H_2SO_4) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) Synth. As soluções foram preparadas com água purificada por um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, USA).

Para a imobilização das sondas de DNA sobre a superfície do cristal de quartzo foi utilizada uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl. Os experimentos de hibridação foram realizados com solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, pH 7,2 ajustado com gotas de uma solução 1 mol L^{-1} de NaOH. A regeneração da superfície do cristal, ou seja, a dehibridação foi realizada com uma solução de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e 3 mol L^{-1} de NaCl. O tiol 6-mercaptop 1-hexanol em uma concentração de

1 mmol L⁻¹ foi utilizado como reagente de bloqueio para melhorar a eficiência de hibridação após o processo de dehibridação com NaOH e NaCl.

3.1.2. Sondas e Alvos de DNA

Foram utilizadas sondas de DNA com números diferentes de bases nitrogenadas e seus respectivos alvos complementares. Também foram utilizadas sequências alvo não complementares. As sondas e os alvos de DNA utilizados consistiam de fitas simples de DNA liofilizadas e purificadas por cromatografia de afinidade (Eurogentec)⁵³. Todas as sequências das sondas e alvos de DNA utilizadas neste trabalho são sequências parciais do gene que codificam o RNA ribossomal da grande subunidade das espécies *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catanella* e *Alexandrium tamarense*, algas tóxicas responsáveis pela produção de toxinas que causam a morte de ostras e mariscos nas costas americana, asiática e européia. Os nomes das sondas e alvos e as sequências de bases nitrogenadas serão apresentados na Tabela 3.1 e serão novamente apresentados no Capítulo 4 para facilitar a compreensão dos resultados obtidos.

Tabela 3.1. Estrutura das sondas de DNA (S1 a S4) e do alvo complementar de DNA (Alvo A) e estrutura da sonda de DNA (P) e dos alvos de DNA (T1 a T6). Neste caso, as complementaridades sonda-alvo são indicadas em negrito em ambas as sequências.

S1	HS-(CH ₂) ₆ - 5'-AAG CCC TTA CAC ATC AGT GCT GGC A- 3'
S2	HS-(CH ₂) ₃ -3'-A CGG TCG TGA CTA CAC ATT CCC GAA- 5'
S3	HS-(PO ₄)-(CH ₂) ₆ -3'-A CGG TCG TGA CTA CAC ATT CCC GAA- 5'
S4	HS-(PO ₄)-(CH ₂) ₆ -5'-AAG CCC TTA CAC ATC AGT GCT GGC A-3'
Alvo <u>A</u>	5'-TGC CAG CAC TGA TGT GTA AAG GCT T- 3'
P	HS-(CH ₂) ₆ -5'- AGCAC TGATG TGTA GGGCT- 3'
T1	3'-CCTTG GTCTG TGTTT CAAGA- 5'
T2	3' - ACTAC CCCGA - 5'
T3	3' - TCGTG ACTAC ACTAC CCCGA - 5'
T4	3' - TCGTG ACTAC ACTAC CCCGA T1 - 5'
T5	3' ACGTT ACGAG TTTT TCATT CGAAA- 5'
T6	3' TCGTG ACTAC ACTAC CCCGA T5 - 5'
AM	HS - (CH ₂) ₆ - 5'-AAG CCC TTA CAC ATC AGT GCT GGC A- 3'
Alvo AM	3'- T TCG GGA ATG TGT AGT CAC GAC CGT - 5'
AC	HS - (CH ₂) ₆ -5 -GAT TTC CTC AGT GAG ATT GTA GTG C- 3'
Alvo AC	3'- C TAA AGG AGT CAC TCT AAC ATC ACG - 5'
AT	HS - (CH ₂) ₆ -5'- GAT GCT TCC TTC CTT GGA CTT ACA A - 3'
Alvo AT	3'- C TAC GAA GGA AGG AAC CTG AAT GTT - 5'

Cabe ressaltar que as sequências de bases nitrogenadas das sondas S1 e S2, S3 e S4 e AM, são as mesmas, ou seja, pertence à subunidade da alga *Alexandrium minutum*. Como as medidas iniciais, utilizando a técnica de microbalança de cristal de quartzo, tinham como objetivo avaliar a interferência do uso de moléculas para alongar a cadeia de DNA, as sondas foram denominadas S1 a S4. Entretanto, nos experimentos com as técnicas eletroquímicas utilizaremos a denominação AM, referente a espécie de alga utilizada, assim como utilizaremos AC para alga *Alexandrium catanella* e AT para alga *Alexandrium tamarense*.

3.1.3. Preparação do genossensor

3.1.3.1. Limpeza

Os cristais de quartzo foram inicialmente limpos utilizando-se uma solução “piranha” recém preparada que consiste de uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio a 30% na proporção 7:3, respectivamente. Em seguida, estes foram enxaguados com água e secos ao ar.

Para a realização das medidas de voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microscopia eletroquímica de varredura, após a limpeza química dos cristais piezelétricos, foram realizadas limpezas eletroquímicas dos mesmos⁸⁸⁻⁸⁹. Para isto, antes da realização das medidas foram realizados 10 ciclos em meio de uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido sulfúrico, em um intervalo de potencial de -0,1 a 1,2 V, com velocidade de varredura de 100 m Vs⁻¹.

Os eletrodos de ouro recém limpos foram colocados em contato com uma solução 0,5 mol L⁻¹ de NaCl contendo 10 µg mL⁻¹ de uma das sondas de DNA modificadas com grupo sulfeto (Tabela 3.1) por duas horas. Após a imobilização do DNA sobre os eletrodos de ouro, estes foram colocados em solução de tampão HEPES contendo 10 µg mL⁻¹ do alvo de DNA de sequência complementar para hibridação também por duas horas em temperatura ambiente. Em uma segunda etapa do trabalho, adotou-se uma nova estratégia de modificação da superfície do quartzo. Após a imobilização da sonda, os eletrodos foram colocados em 1 mmol L⁻¹ do tiol 6-mercaptop 1-hexanol em etanol por uma hora em temperatura ambiente.

3.2. Instrumentação

3.2.1. Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

O ressonador utilizado na microbalança de cristal quartzo foi um disco de quartzo de corte planar (14 mm de diâmetro) com uma frequência de oscilação fundamental de 9 MHz com dois eletrodos de ouro idênticos com 5 mm de diâmetro e 200 nm de espessura depositados em ambos os lados da superfície do cristal de quartzo (Elchema), como mostra a Figura 3.1. O contato elétrico entre o eletrodo de ouro e o suporte metálico foi feito utilizando-se cola de prata.

Um circuito oscilador desenvolvido no LISE (*Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques*) pertencente ao CNRS (*Centre National de la Recherche Scientifique*) foi utilizado para monitorar a frequência de oscilação de um cristal de quartzo de 9 MHz oscilando no terceiro harmônico, em 27 MHz. Para aumentar a estabilidade do circuito eletrônico todos os componentes do oscilador possuem temperatura controlada por um termostato Watlow com estabilidade de $0,1^{\circ}\text{C}$. O cristal de quartzo era inserido em uma célula de acrílico, também desenvolvida no LISE, sendo o cristal inserido na mesma utilizando dois *o*-rings de silicone para evitar que a solução entrasse em contato com o suporte metálico, como mostra a Figura 3.1. O volume de solução dentro da célula era de 50 μL . Uma microbomba peristáltica Pharmacia com vazão de $50 \mu\text{L min}^{-1}$ foi utilizada para injeção da amostra na célula. A temperatura das soluções era controlada por termostato Huber com temperatura constante de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Além disso, foi utilizado um software para realizar as medidas de frequência que foi desenvolvido pelo LISE (CNRS) e um frequencímetro Fluke modelo PM 6685. A microbalança de cristal de quartzo foi calibrada e sua sensibilidade obtida foi de 350 pg Hz^{-1} e o erro relativo menor do que 5%. O arranjo experimental utilizado é apresentado na Figura 3.2.

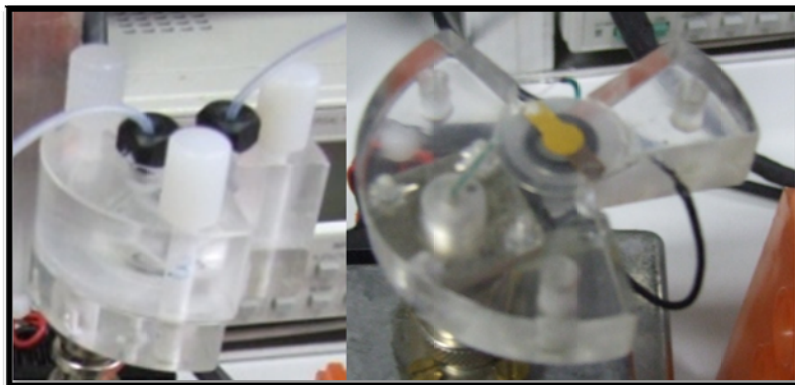


Figura 3.1. Imagens do cristal de quartzo e da célula de fluxo utilizados para as medidas com a técnica de microbalança de cristal de quartzo.

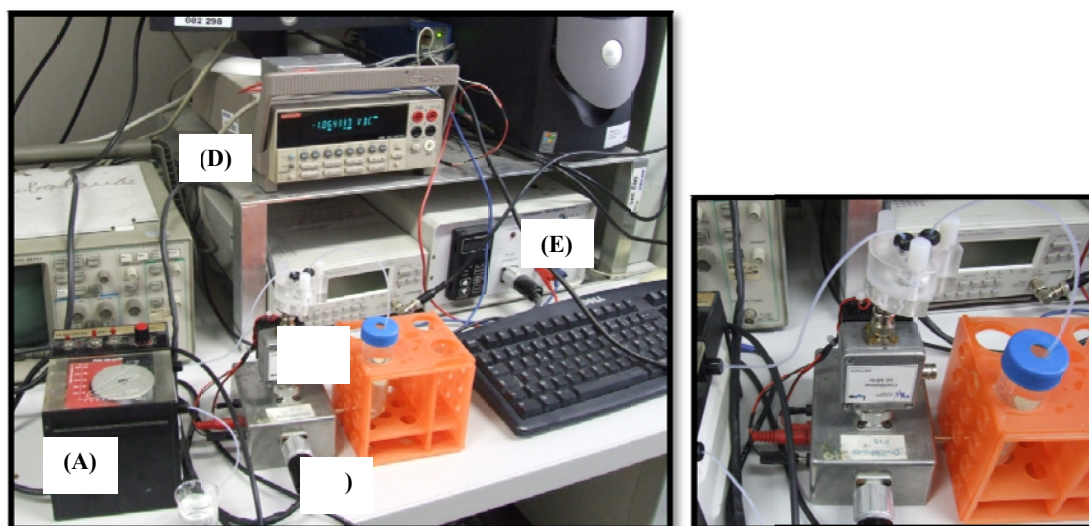


Figura 3.2. Imagens do arranjo experimental utilizado para realização das medidas com a técnica de microbalança de cristal de quartzo; (A) bomba peristáltica, (B) circuito oscilador LISE, (C) célula de fluxo, (D) frequencímetro e (E) controlador de temperatura.

3.2.2. Medidas Eletroquímicas

3.2.2.1. Voltametria Cíclica (CV)

As medidas de voltametria cíclica foram realizadas utilizando-se um potenciostato modelo PGSTAT 30 da Autolab, interfaceado a um

computador e controlado pelo software GPES. As voltametrias foram realizadas em uma célula convencional de três eletrodos à temperatura ambiente, sendo utilizado um eletrodo de calomelano saturado (ECS) como eletrodo de referência (RE), uma rede de platina com uma área de $0,25 \text{ cm}^2$ como contra-eletrodo (CE) e o cristal de quartzo com eletrodo de ouro como eletrodo de trabalho (WE). O cristal de quartzo era inserido em um suporte de acrílico o contato elétrico era realizado com cola de prata e cola de silicone para vedação dos mesmos, como mostra a Figura 3.3.

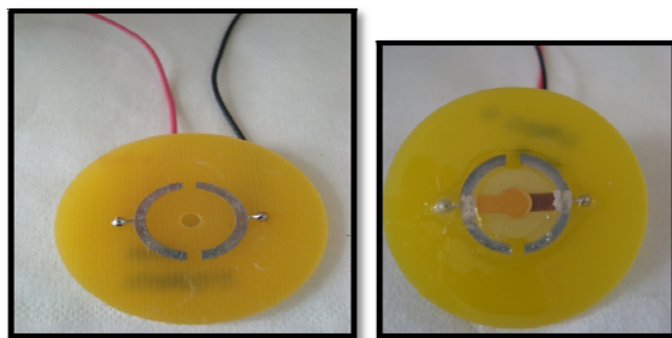


Figura 3.3. Imagem do suporte utilizado para fixar o cristal de quartzo utilizado para realização das medidas eletroquímicas.

Os suportes eram preparados com antecedência de um dia, para completa secagem da cola de silicone, e estes eram então, inseridos em uma célula eletroquímica, desenvolvida no LISE-CNRS. A Figura 3.4 mostra a célula utilizada, com o eletrodo de trabalho (cristal de quartzo), o contra eletrodo, e o eletrodo de referência (ECS).

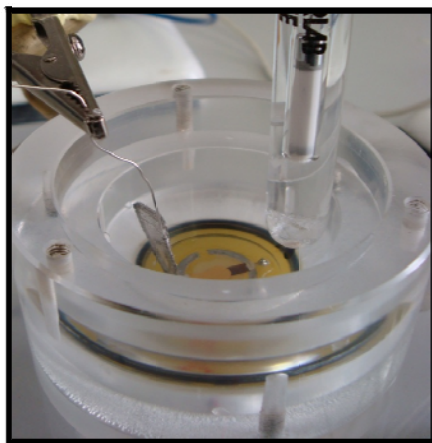


Figura 3.4. Célula eletroquímica com uma configuração de três eletrodos utilizada para as medidas de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

3.2.2.2. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

As medidas de impedância foram realizadas com um potenciostato desenvolvido pelo LISE-CNRS, com um analisador de impedância da marca Solartron modelo 1254A, um osciloscópio digital Agilent 54602B e uma célula eletroquímica de três eletrodos (Figura 3.4). A Figura 3.5 apresenta um diagrama esquemático da montagem utilizada para realização das medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica.

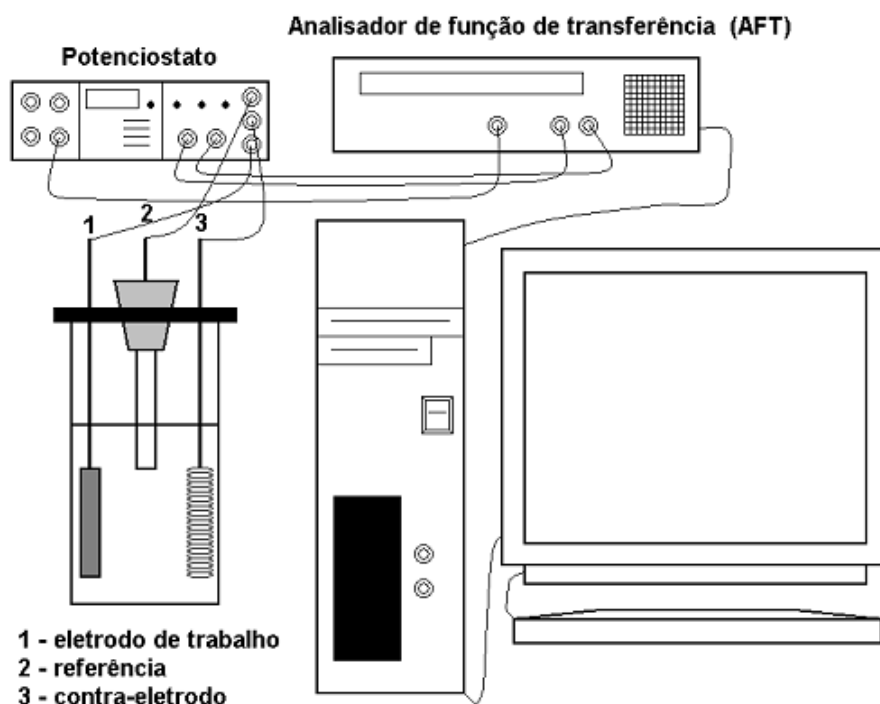


Figura 3.5. Esquema de instrumentação para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

3.2.2.3. Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)

A instrumentação utilizada para realização das medidas de SECM foi construída pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Vincent Vivier, no LISE-CNRS [22,23]. O sistema consiste de um microposicionador em três dimensões VP-25XA (Newport) impulsionados por controladores de motor codificador de movimento (ESP300, Newport) permitindo uma resolução espacial de 100 nm em todas as três direções. As medidas eletroquímicas foram realizadas com um bipotentiostato desenvolvido no LISE-CNRS, acoplado a um conversor de voltagem-corrente para tensão com baixo nível de ruído Femto modelo DLPCA200, BFI Optilas com um alcance ajustável. A Figura 3.6 mostra um diagrama esquemático da instrumentação utilizada no LISE para realização das medidas de SECM.

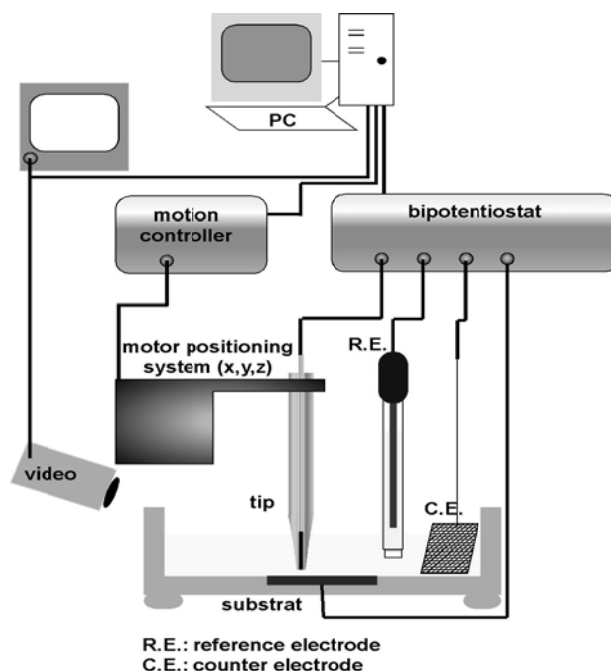


Figura 3.6. Diagrama esquemático do microscópio eletroquímico de varredura acoplado ao sistema de aquisição de dados construído no LISE-CNRS ⁹⁰.

A Figura 3.6 ilustra, de forma geral, o microscópio eletroquímico de varredura conectado a um computador. Um aspecto importante da instrumentação é o sistema de posicionamento, o qual inclui o transdutor de estágios e os motores controladores. Idealmente, estes elementos devem permitir à sonda mover-se a uma taxa desejada de varredura, da ordem de micrometros por segundo ($\mu\text{m/s}$), sobre um determinado sentido.

A Figura 3.7 mostra a célula eletroquímica utilizada para realização das medidas de SECM com a sonda de platina (eletrodo de trabalho) posicionada sobre a superfície do cristal de quartzo (substrato). Utilizou-se uma rede de platina como contra-eletrodo e um eletrodo de calomelano saturado como eletrodo de referência.

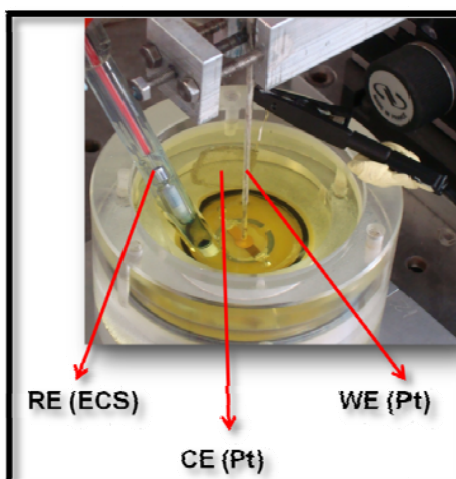


Figura 3.7. Imagem da célula Eletroquímica utilizada para realização das medidas com a técnica de microscopia eletroquímica de varredura.

A Figura 3.8 mostra a bancada com o equipamento instalado com o arranjo experimental no qual o ultramicroeletrodo e o substrato (cristal de quartzo) foram posicionados. O instrumento é controlado externamente por um computador padrão PC em ambiente Windows através de um software desenvolvido pelo LISE-CNRS que possui funções pré-programadas permitindo, entre outras coisas, o controle do posicionamento da sonda (ultramicroeletrodo), a aquisição e análise de dados.

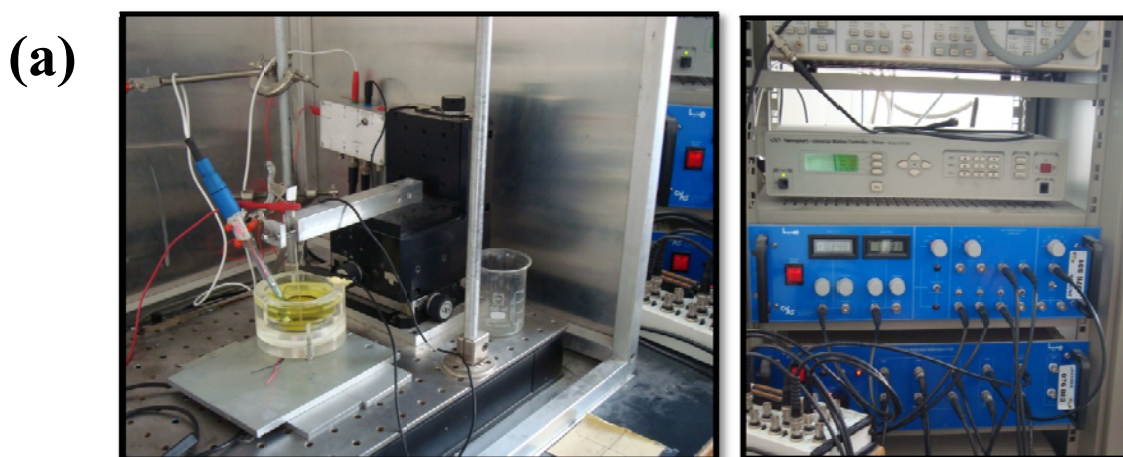


Figura 3.8. Microscópio eletroquímico montado sobre a bancada com a gaiola de Faraday (a) e sistema com bipotenciostato *home made* (b) para realização das medidas com a técnica de microscopia eletroquímica de varredura.

3.2.2.3.1. Preparação dos ultramicroeletrodos – SECM

Neste trabalho foram utilizados ultramicroeletrodos de platina como sonda para as medidas de SECM seguindo o método descrito por Fernández e Bard ⁹¹. Os ultramicroeletrodos com 10 μm de diâmetro foram construídos por meio de encapsulamento do fio de platina em um capilar de vidro. O fio de platina foi colocado no interior do capilar e este foi então, conectado a uma bomba de vácuo, tendo uma das extremidades fechada por aquecimento. Dessa forma, o vidro é selado sobre o fio sem a exposição deste às altas temperaturas. Após esse procedimento, o fio de platina foi conectado a um fio de Ni utilizando-se cola de prata para realizar o contato elétrico. A extremidade inicialmente selada foi polida mecanicamente com lixas de diferentes granulometrias (grana: 3000 e 4000) ⁹² a fim de expor a fibra de platina. A verificação do estado da superfície foi feita num microscópio óptico com aumento de 500 vezes. A Figura 3.9 ilustra as etapas de preparo do ultramicroeletrodo de 10 μm no qual se observa o fio de platina, o revestimento de vidro e a cola de prata

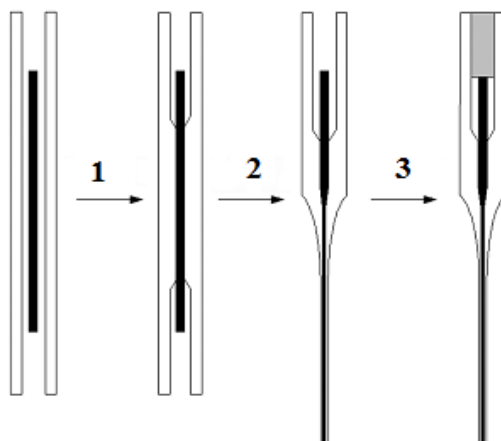


Figura 3.9. Representação esquemática das etapas de fabricação de um ultramicroeletrodo de Pt ⁹³. (1): Processo de selagem térmica do fio de platina de 10 μm no vidro; (2): Processo de afinamento térmico/mecânico do conjunto vidro e fio de platina e (3): Formação do contato elétrico externo com cola de prata. Figura adaptada do trabalho de PAIXÃO *et al.* ⁹⁴.

Cada experimento com a técnica de SECM foi repetido ao menos três vezes, a fim de confirmar os resultados obtidos. Antes de cada ensaio, o potencial do ultramicroeletrodo foi ciclado entre valores adequados para cada caso até que voltamogramas reprodutivos fossem obtidos, para só então dar-se início ao experimento propriamente dito. Antes da realização dos ensaios para obter curvas de aproximação, o ultramicroeletrodo foi posicionado a uma distância suficientemente grande do substrato e a corrente limite foi medida durante um período de tempo até que o seu valor se tornasse estável. É importante lembrar que, segundo Fernández e Bard ⁹¹, a corrente do ultramicroeletrodo deve ser suficientemente pequena para evitar a saturação da solução por hidrogênio e a subsequente formação de bolhas, o que tornaria as medidas imprecisas.

3.2.2.4. Arranjo de microeletrodos – *Microarrays*

O arranjo de microeletrodos foi construído para realização de medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica com as sondas e os respectivos alvos complementares das sequências das algas AM, AC e AT.

Os microeletrodos de disco foram construídos separadamente por meio de encapsulamento do fio de ouro em um capilar de vidro. Foram construídos utilizando um fio de ouro de 250 μm utilizando o mesmo procedimento descrito acima para construção do ultramicroeletrodo de platina. Foram construídos três microeletrodos de ouro que foram fixados em um suporte de teflon com resina epóxi (Epoxy Technology, Billerica, MA) e com distância igual entre eles, como mostra a Figura 3.10.

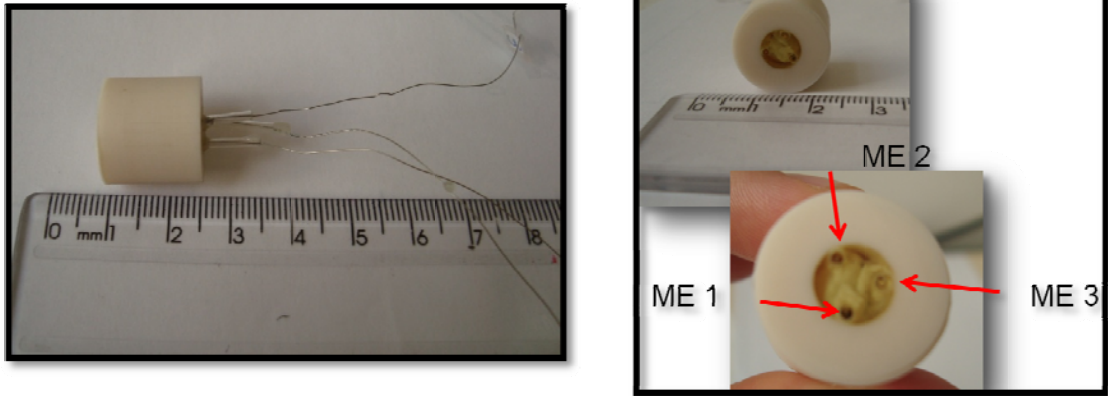


Figura 3.10. Imagem do arranjo com três microeletrodos de ouro utilizado para realização das medidas com a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS).

A célula eletroquímica utilizada para medidas de EIS com o arranjo de microeletrodos é mostrada na Figura 3.11.

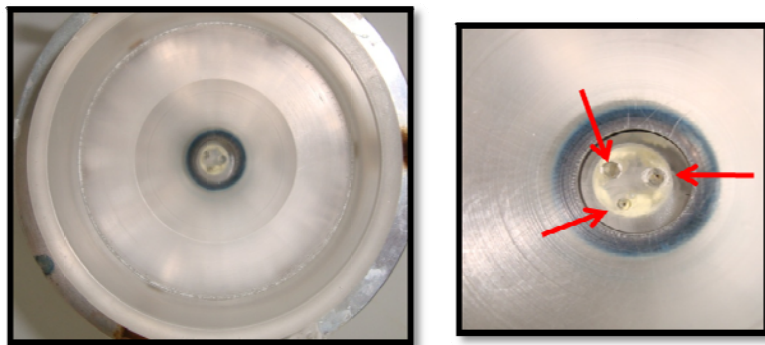


Figura 3.11. Imagem da célula eletroquímica com o arranjo de três microeletrodos de ouro para medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica com DNA. As setas na cor vermelha indicam os microeletrodos de ouro.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Os resultados das etapas do desenvolvimento de um genossensor piezelétrico serão apresentados neste capítulo. Para isto, os processos de imobilização e hibridação de moléculas de DNA foram analisados por meio da variação de massa na superfície de um cristal piezelétrico utilizando a técnica de QCM. Também foi possível realizar um estudo do mecanismo de hibridação das sequências de DNA em um ambiente interfacial. Outra etapa deste trabalho foi realizar a análise da imobilização e hibridação de moléculas de DNA utilizando-se técnicas eletroquímicas, como voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e alguns experimentos com a técnica de microscopia eletroquímica de varredura.

As medidas com as sequências de DNA das algas AM, AC e AT foram realizadas no período de estágio sanduíche no LISE (Paris, França) sob orientação do Prof. Dr. Hubert Perrot.

4.1. Medidas Eletrogravimétricas – Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

A microbalança de cristal de quartzo é uma técnica bastante usada para o desenvolvimento de biossensores de DNA⁹⁵⁻⁹⁷, sendo bastante sensível para detectar o DNA não-marcado e também defeitos na fita de DNA. Os biossensores de DNA com a técnica de QCM podem ser construídos por diferentes métodos de imobilização da sonda de oligonucleotídeos na superfície do cristal de quartzo. Os mais eficientes e mais usados para imobilização da sonda de DNA são os métodos irreversíveis, como a ligação covalente do DNA na superfície do ouro sendo este modificado com um grupo dissulfeto ou tiol^{25, 98-100}, ligação covalente de uma sequência de DNA modificada com um grupo amina em uma superfície modificada com um grupo silano ou derivados¹⁰¹⁻¹⁰², formação de um complexo avidina-biotina entre a cadeia de DNA marcadas com biotina e uma superfície modificada com avidina¹⁰³, uma camada de

avidina-dextrano¹⁰⁴⁻¹⁰⁵ ou uma camada tiol-avidina^{34, 106-107}. Como estas técnicas de imobilização da sonda de DNA sobre a superfície do transdutor são irreversíveis, são necessários diferentes biossensores de DNA para cada fita diferente de DNA.

Avaliamos neste trabalho o processo *in situ* da imobilização irreversível da sonda de DNA e a sua hibridação com um alvo de sequência complementar à sonda imobilizada. A primeira etapa monitorada é a imobilização irreversível de diferentes sondas de 25 bases nitrogenadas modificadas com um grupo sulfeto na superfície do cristal de quartzo contendo um depósito de ouro¹⁰⁸. Esta etapa é seguida pela hibridação reversível da sonda com um alvo complementar. A cinética do biossensor de DNA, antes e após a imobilização da sonda e após o processo de hibridação, foram estudados e comparados.

Inicialmente, foram utilizadas quatro sondas de DNA da microalga *Alexandrium minutum* com a mesma sequência de bases nitrogenadas, todas modificadas com grupos sulfeto. As diferenças entre as sondas é a posição na qual a cadeia foi modificada com o grupo sulfeto, em duas sondas a modificação foi feita no carbono 3' e nas outras duas no carbono 5'. Outra diferença é que em duas destas sondas o grupo sulfeto é ligado a um grupo alceno $[HS-(CH_2)_n]$, e nas outras duas um grupamento fosfato $[HS-(PO_4)-(CH_2)_n]$ é ligado ao grupo alceno prolongando a cadeia de DNA. A molécula alvo de DNA utilizada possui uma sequência de bases nitrogenada complementar as quatro sondas.

As sondas de DNA utilizadas foram denominadas de S1 a S4 para facilitar a representação. O alvo comum a todas as sondas foi chamado de A, e as sequências de bases nitrogenadas são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Sequência de bases nitrogenadas das sondas 1 a 4 e do alvo complementar A

S1	HS-(CH ₂) ₆ -5'-AAG CCC TTA CAC ATC AGT GCT GGC A-3'
S2	HS-(CH ₂) ₃ -3'-A CGG TCG TGA CTA CAC ATT CCC GAA-5'
S3	HS-(PO ₄)-(CH ₂) ₆ -3'-A CGG TCG TGA CTA CAC ATT CCC GAA-5'
S4	HS-(PO ₄)-(CH ₂) ₆ -5'-AAG CCC TTA CAC ATC AGT GCT GGC A-3'
Alvo <u>A</u>	5'- TGC CAG CAC TGA TGT GTA AAG GCT T – 3'

Alguns parâmetros importantes para o desenvolvimento do genossensor tais como porcentagem de cobertura da superfície e eficiência de hibridação, foram determinados pelas técnicas de microbalança de cristal de quartzo e espectroscopia de impedância eletroquímica. Apresentaremos neste item, os resultados obtidos com a técnica de QCM.

A frequência de oscilação do cristal de quartzo foi monitorada durante a imobilização das sondas de DNA e também na etapa de hibridação com a molécula alvo complementar, como mostra a Figura 4.1.

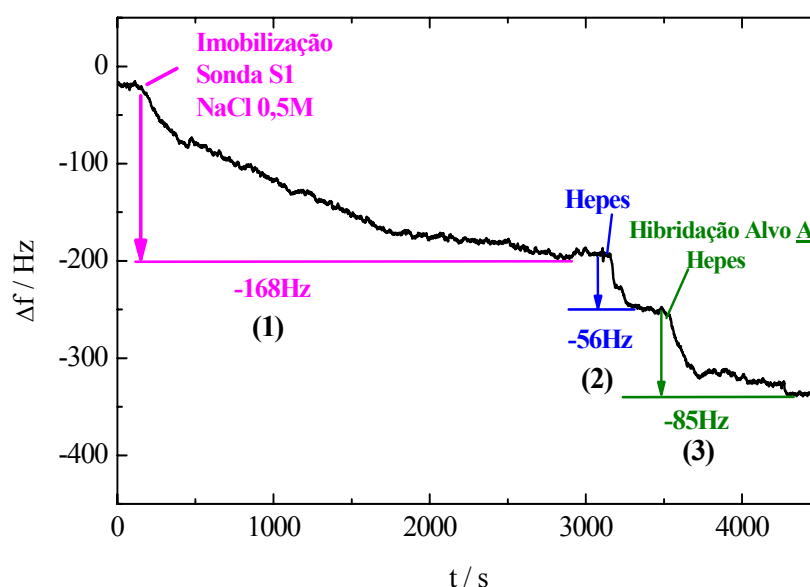


Figura 4.1. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as seguintes adições: (1) Solução 10 μg mL⁻¹ da sonda S1 em meio de NaCl 0,5

mol L⁻¹; (2) Mudança da solução carregadora de NaCl 0,5 mol L⁻¹ para solução 0,05 mol L⁻¹ de tampão HEPES com 0,5 mol L⁻¹ de NaCl e 1 mol L⁻¹ de NaOH, pH 7,2; (3) Solução 10µg mL⁻¹ do Alvo A.

Observa-se na Figura 4.1 que a adição da sonda de DNA de 25 bases causou um decréscimo na frequência de oscilação do cristal de quartzo de 168 Hz indicando um aumento de massa sobre a superfície do cristal que pode ser atribuído a imobilização da sonda por meio da ligação do grupo tiol com o ouro depositado sobre o cristal. Após a adição da sonda foi feita troca da solução carregadora de NaCl 0,5 mol L⁻¹ para solução 0,05 mol L⁻¹ de tampão HEPES com 0,5 mol L⁻¹ de NaCl e 1 mol L⁻¹ de NaOH em pH 7,2. Essa troca nas soluções carregadoras causa uma mudança na viscosidade do meio e por isso observa-se uma variação na frequência de oscilação do cristal de 56 Hz. Ressalta-se, neste ponto, a importância da “ambientação” do cristal de quartzo a nova solução carregadora antes da adição da molécula alvo de DNA, para assegurar que a variação observada para o alvo é resultado de uma interação específica e não devido a mudanças nas propriedades da solução. A hibridação da sonda de DNA com a molécula alvo complementar ocorreu após a adição do Alvo A de 25 bases nitrogenadas, que causou uma variação de frequência de 85 Hz.

Uma solução contendo 0,5 mol L⁻¹ de NaOH e 3 mol L⁻¹ de NaCl foi utilizada para a regeneração do genossensor. A Figura 4.2 apresenta um gráfico das etapas de hibridação da sonda com o Alvo A, a regeneração da superfície do biossensor e uma nova hibridação com a mesma molécula alvo.

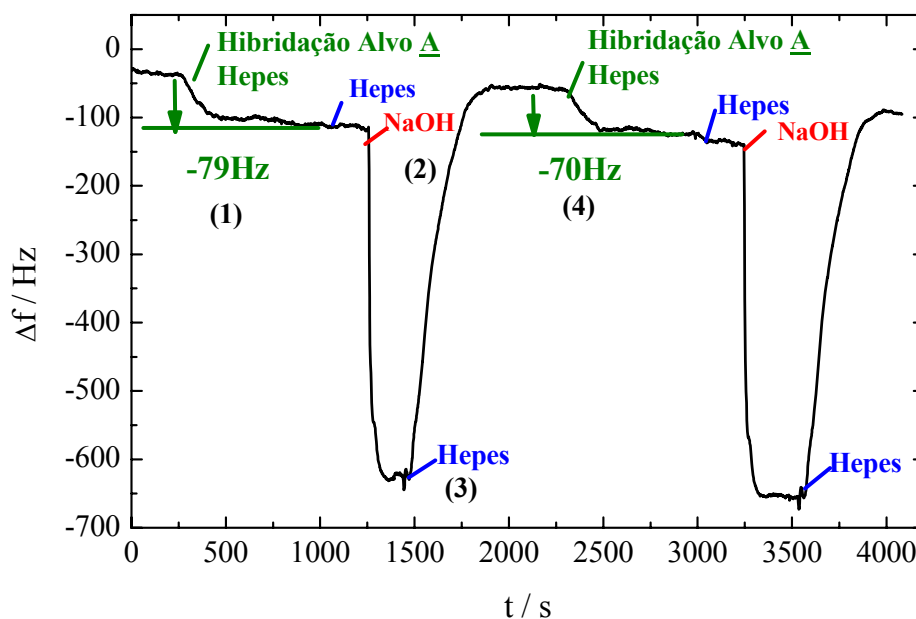


Figura 4.2. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as seguintes adições: (1) Solução $10\mu\text{g. mL}^{-1}$ do Alvo A à sonda S1 imobilizada em meio de uma solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH em pH 7,2; (2) Solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e 3 mol L^{-1} de NaCl ; (3) Solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH, pH 7,2; (4) Solução $10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ do alvo A à superfície regenerada do genossensor.

Observa-se na Figura 4.2 que após a adição da solução de regeneração (NaOH e NaCl) houve uma grande queda na variação de frequência de oscilação do transdutor e após a troca da solução de regeneração para o tampão HEPES a frequência volta próxima ao valor observado antes da adição do alvo complementar, indicando que a molécula alvo foi removida pela solução de regeneração. Observa-se também que após a regeneração foi possível reutilizar o biossensor contendo a sonda de DNA imobilizada adicionando-se novamente uma solução contendo a molécula Alvo A. As variações de frequência obtidas para a primeira e a segunda adição da molécula alvo complementar de 25 bases nitrogenadas são bem próximas, 79 e 70 Hz, respectivamente. Baseado nisto, podemos dizer que é possível reutilizar o cristal

contendo a sonda de DNA imobilizada, substituindo-se a molécula alvo de DNA por uma sequência complementar ou não e com número variado de bases nitrogenadas.

A Figura 4.3 ilustra as etapas envolvidas nos processos de imobilização da sonda, a hibridação com a respectiva molécula Alvo A, e regeneração da superfície do cristal.

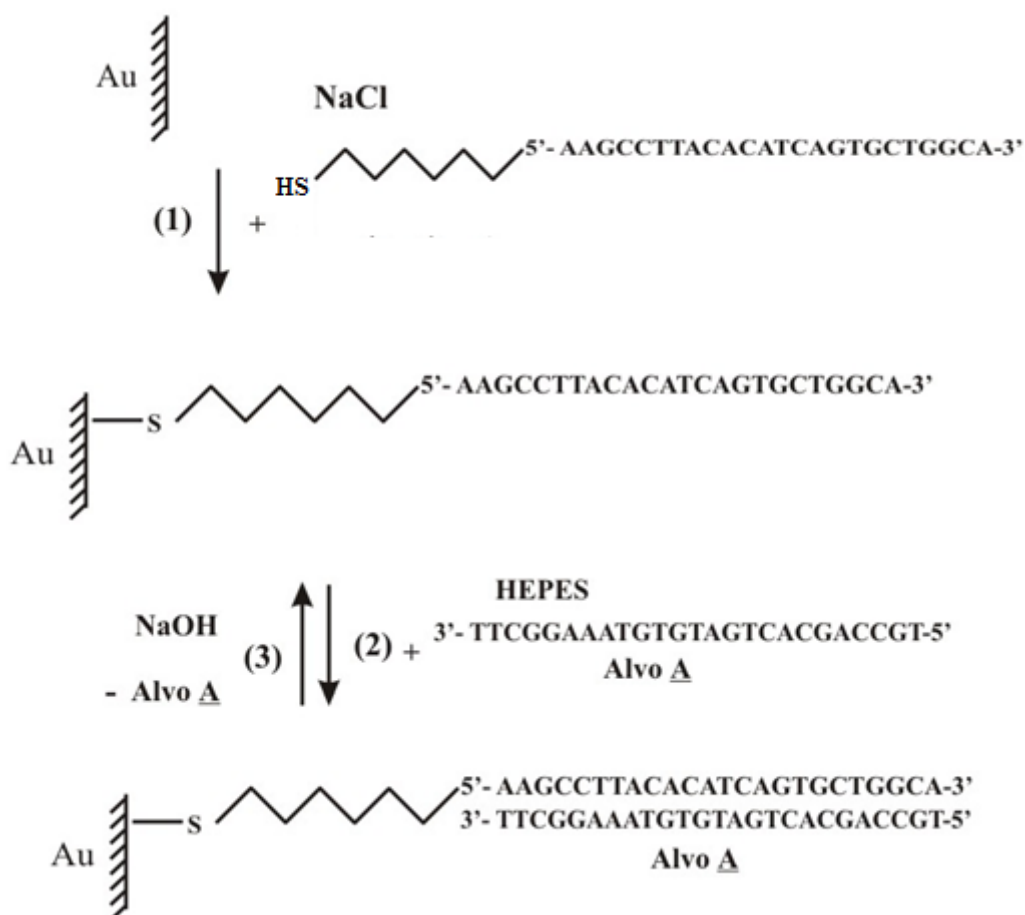


Figura 4.3. Etapas de imobilização das sondas de DNA modificadas com sulfeto, hibridação com a respectiva molécula alvo complementar e a regeneração da superfície do biossensor.

Os experimentos de imobilização foram realizados para as quatro sondas de DNA descritas anteriormente e também foi realizado o estudo da hibridação com a respectiva molécula Alvo A de 25 bases nitrogenadas. Baseado nos resultados obtidos para as sondas de DNA utilizadas foram

realizados cálculos da porcentagem de imobilização (τ) das sondas de acordo com a Equação 4.

$$\tau = |\Delta f_{\text{diss}}| \cdot S_{\text{QCM}} \cdot N_A \cdot A_{\text{diss}} / A_{\text{QCM}} \cdot M_{\text{diss}} \quad [\text{Eq. 4}]$$

Δf_{diss} é a variação de frequência observada após adição da sonda, S_{QCM} a sensibilidade experimental da microbalança (350 pg/Hz)^{38, 109}, N_A o número de Avogrado ($6,023 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), A_{diss} a área média da sonda imobilizada ($2,2 \text{ nm}^2$)⁹⁹, A_{QCM} a área ativa do cristal de quartzo ($0,2 \text{ cm}^2$) e M_{diss} a massa molecular da sonda modificada com um grupo sulfeto em g mol^{-1} .

Utilizando-se a Equação 4 pode-se calcular a porcentagem de imobilização para as quatro sondas de DNA estudadas, como mostrado na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Cálculos da porcentagem de cobertura da sondas de DNA na superfície do cristal de quartzo.

Sondas	Porcentagem de Imobilização (τ) / %
Amin 25-5'Tiol C ₆ (S1)	68 ± 2
Amin 25-3'Tiol C ₃ (S2)	75 ± 3
Amin 25-3'Tiofosfato (S3)	21 ± 2
Amin 25-5'Tiofosfato (S4)	19 ± 3

* n = 40 determinações

** n = 10 determinações

Os cálculos relativos a porcentagem de imobilização das sondas de DNA referem-se à quantidade de moléculas de DNA covalentemente ligadas ao ouro depositado sobre a superfície do cristal de quartzo. As sondas contendo o grupo fosfato apresentam menor porcentagem de cobertura da superfície que as sondas que não possuem este grupamento. Isto pode ser atribuído a um maior

impedimento estérico causado pelo grupo fosfato dificultando a ligação do enxofre com o metal na superfície do cristal.

Foram realizados cálculos para determinar a porcentagem de hibridação (λ) da molécula complementar de 25 bases nitrogenadas, Alvo A, com as quatro sondas de DNA imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo³⁸. A Tabela 4.3 apresenta o valor médio das variações de frequência obtidos para a hibridação da molécula Alvo A com as quatro sondas de DNA imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo que foram utilizados para calcular a porcentagem de hibridação da molécula Alvo A com as sondas de DNA.

Tabela 4.3. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo para hibridação da sonda com o alvo de DNA.

Sondas	$\Delta f_{\underline{A-B}}$ (Hz)
Amin 25-5'Tiol C ₆ (S1)	55 ± 5*
Amin 25-3'Tiol C ₃ (S2)	43 ± 4*
Amin 25-3'Tiofosfato (S3)	57 ± 3**
Amin 25-5'Tiofosfato (S4)	51 ± 5**

* n = 40 determinações

** n = 10 determinações

A partir dos dados apresentados na Tabela 4.3 foi possível calcular a porcentagem de hibridação (λ) da molécula Alvo A com as quatro sondas de DNA imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo, de acordo com a Equação 4. A eficiência de hibridação λ pode ser calculada pela Equação 5.

$$\lambda = N_{\underline{A-B}} - N_{\text{diss}} = \Delta f_{\underline{A-B}} M_{\text{diss}} / \Delta f_{\text{diss}} M_{\underline{A-B}} \quad \text{[Eq. 5]}$$

Onde $\Delta f_{\underline{A-B}}$ é a variação de frequência obtida para hibridação de uma sonda de DNA com o alvo A complementar, M_{diss} é a massa molecular da sonda de DNA modificada com sulfeto, Δf_{diss} é a variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo obtida para imobilização da sonda de DNA e $M_{\underline{A-B}}$ é a soma da massa molecular da sonda de DNA com o alvo A complementar

A partir da Equação 5 foi possível calcular a porcentagem de hibridação da molécula alvo A com as quatro sondas de DNA. Estes dados são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA adicionada às sondas imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo.

Sondas	Eficiência de Hibridação (λ) / %
Amin 25-5'Tiol C ₆ (S1)	20*
Amin 25-3'Tiol C ₃ (S2)	27*
Amin 25-3'Tiofosfato (S3)	46**
Amin 25-5'Tiofosfato (S4)	41**

* n = 40 determinações

** n = 10 determinações

Os valores das porcentagens de hibridação encontrados estão de acordo com alguns trabalhos na literatura para sondas de DNA modificadas com o grupo sulfeto^{99, 111}.

Alguns estudos demonstraram que o uso de monocamadas mistas contendo as sondas de DNA e moléculas hidrofílicas de tióis como o mercaptoetanol¹¹² melhoram a eficiência de hibridação após a regeneração do genossensor. Neste trabalho foi estudado o uso de uma solução 1 mmol. L⁻¹ do tiol após a regeneração do genossensor com uma solução de NaOH e NaCl. Após o uso deste reagente, efetuaram-se novamente os cálculos da porcentagem

de hibridação e estes resultados foram comparados com aqueles obtidos antes do uso do MCH. Devido às dificuldades em reproduzir os experimentos com as sondas S3 e S4 pelos motivos já descritos acima, o uso do tiol foi avaliado apenas para as sondas S1 e S2, que não continham um grupo fosfato ligado ao alceno da cadeia de bases nitrogenadas.

A Figura 4.4 ilustra o uso do tiol como reagente de bloqueio para melhorar a eficiência de hibridação e a Tabela 4.5 apresenta os valores das porcentagens de hibridação do Alvo A com duas das quatro sondas de DNA utilizadas.

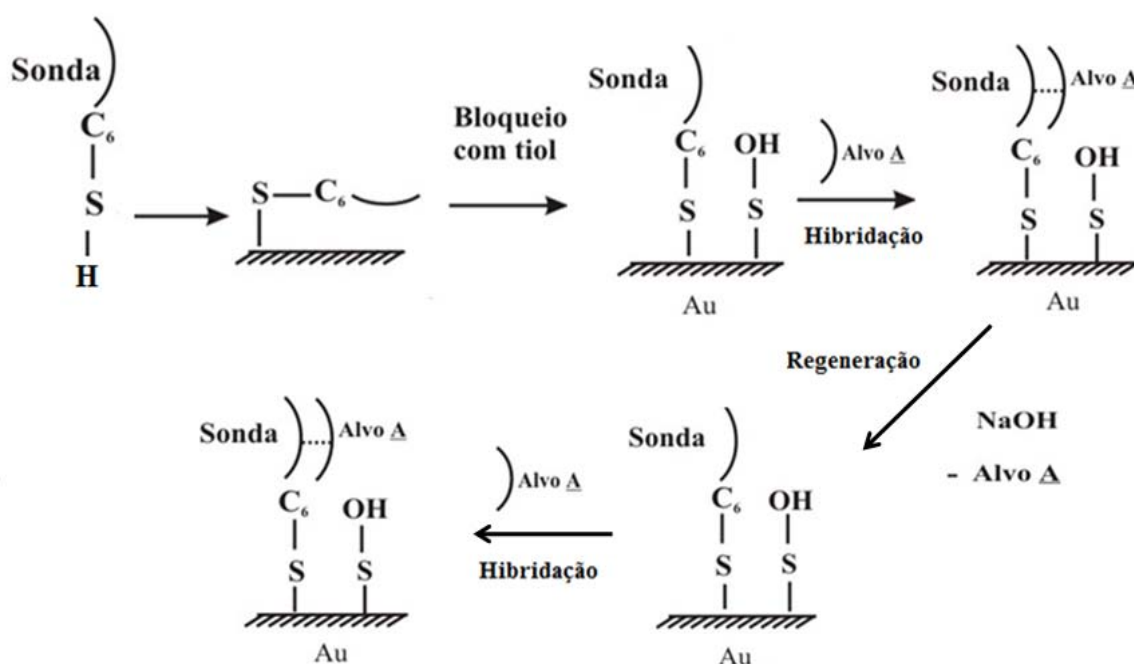


Figura 4.4. Uso do tiol como reagente de bloqueio no processo de hibridação da sonda de DNA com a fita Alvo A.

Após o uso do tiol com o objetivo de melhorar a eficiência de hibridação, foi possível calcular, utilizando-se a Equação 8, a nova porcentagem de hibridação do Alvo A com as sondas de DNA. Estes dados são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA adicionada às sondas imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo antes e após a utilização do tiol mercapto-hexanol (MCH).

Sondas	λ (%) sem uso do	λ (%) após uso do
	MCH	MCH
Amin 25-5'Tiol C ₆ (S1)	20	35
Amin 25-3'Tiol C ₃ (S2)	27	32

Os dados mostrados na Tabela 4.5 confirmam que o uso do tiol melhora a eficiência de hibridação após a regeneração da superfície contendo a sonda de DNA imobilizada. O 6- mercapto 1-hexanol é usado como reagente de bloqueio e liga-se covalentemente ao eletrodo de ouro sobre a superfície do cristal de quartzo, ocupando posições nas quais a sonda de DNA não foi imobilizada. Este reagente pode repelir negativamente a cadeia alquílica da sonda de DNA quando imobilizada sobre o eletrodo de ouro, possibilitando uma melhor orientação destas moléculas, melhorando com isso, a regeneração do biossensor, como mostra a Figura 4.5.

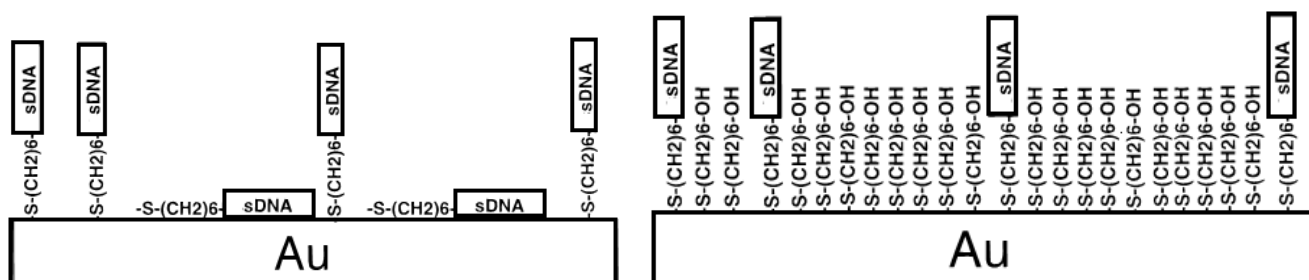


Figura 4.5. Representação esquemática do uso do tiol para melhorar a orientação das moléculas de DNA imobilizadas na superfície do cristal de quartzo.

A sensibilidade dos biossensores são frequentemente abordadas nos trabalhos científicos, podendo-se obter controle deste parâmetro explorando, por exemplo, as diferenças na estabilidade termodinâmica das duplas fitas de DNA, complementares e aquelas não complementares na sequência de bases nitrogenadas. Realizou-se com a técnica de QCM, adição de uma solução contendo um alvo não complementar e outra solução contendo um alvo de sequência complementar para observar a interferência da sequência não complementar no processo de hibridação. Neste experimento foram usadas sondas e alvos com diferentes sequências de bases nitrogenadas, todos de microalgas do gênero *Alexandrium*.

A Figura 4.6, apresenta os resultados obtidos após a adição de uma solução contendo um alvo com uma sequência de bases nitrogenadas não complementar a sonda e em seguida a adição de uma solução contendo o alvo de sequência complementar da espécie *Alexandrium catanella* e a Figura 4.7 mostra os resultados obtidos somente com o alvo de sequência complementar.

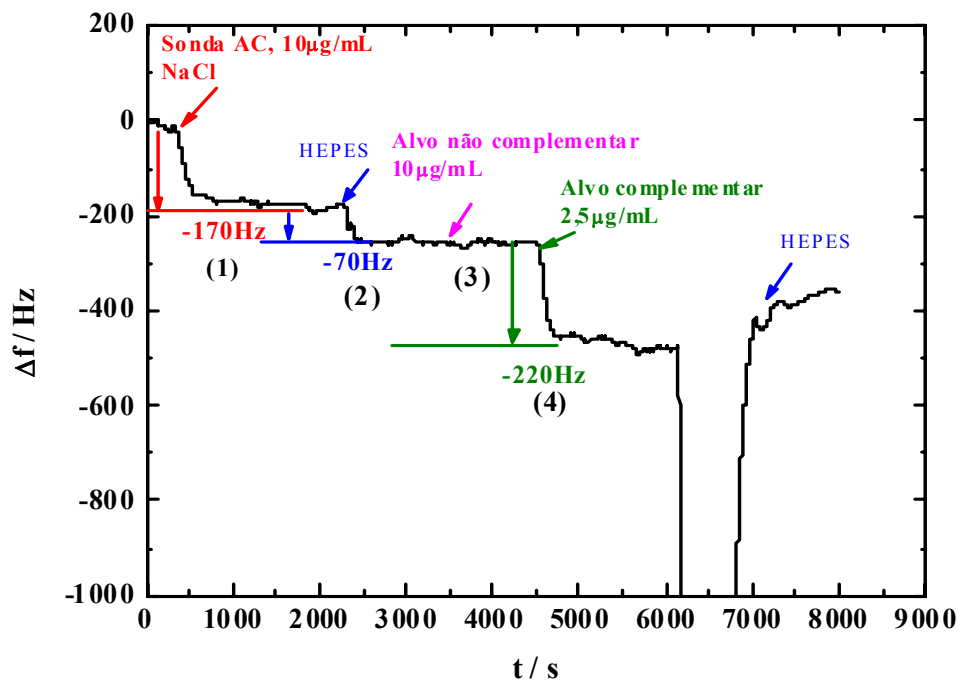


Figura 4.6. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as adições: (1) Solução $10\mu\text{g mL}^{-1}$ da sonda AC em meio de uma solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl; (2) Solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH em pH 7,2; (3) Solução $10\mu\text{g mL}^{-1}$ de um alvo não complementar a sonda AC em meio de uma solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH, pH 7,2; (4) Solução $2,5\mu\text{g mL}^{-1}$ do alvo complementar AC à superfície do genossensor.

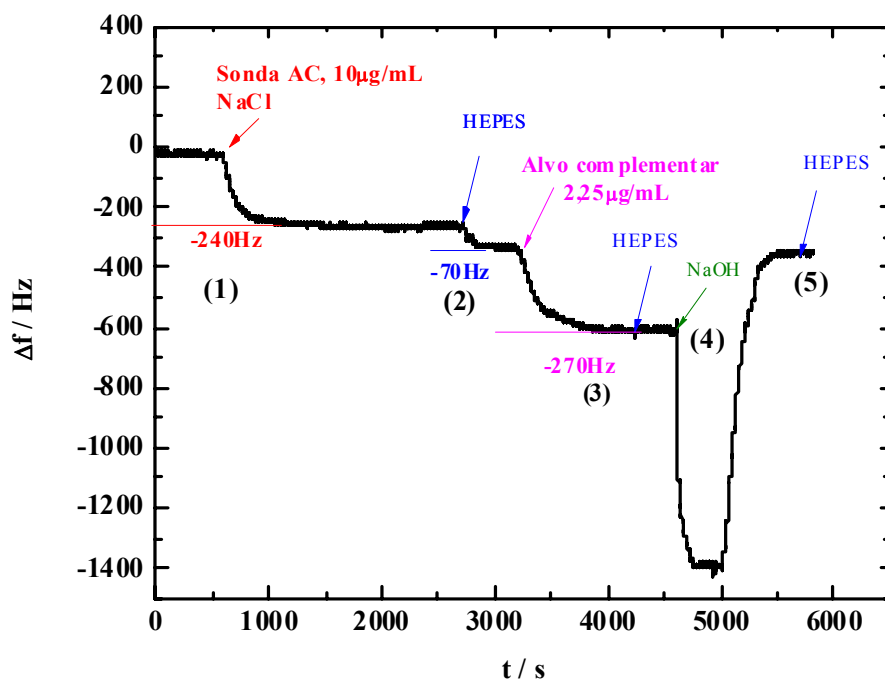


Figura 4.7. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as adições: (1) Solução $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da sonda AC em meio de uma solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl; (2) Solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH em pH 7,2; (3) Solução contendo a mistura de $2,25\mu\text{g mL}^{-1}$ do alvo complementar AC no mesmo meio da etapa 2; (4) Solução 3 mol L^{-1} de NaCl e $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaOH; (5) Solução $0,05\text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH, pH 7,2.

Como pudemos observar nos dois gráficos apresentados acima (Figuras 4.6 e 4.7), a adição de uma molécula de DNA com sequência de bases nitrogenadas não complementares a sonda de DNA utilizada não causou mudança na variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo, indicando que não ocorreu a hibridação entre as duas fitas de DNA, como era esperado. Além disso, pudemos observar também, que a adição de uma solução contendo o alvo não complementar anterior a adição de uma solução contendo o alvo complementar não interfere no processo de hibridação, pois as variações de frequência observadas são muito semelhantes (220 e 270 Hz).

Com o objetivo de avaliar a interferência de outras sequências não complementares no processo de hibridação, foram realizados experimentos utilizando soluções contendo um alvo de sequência complementar a sonda de DNA imobilizada na superfície do quartzo e um alvo de sequência não complementar em concentração superior ao alvo complementar, como mostra a Figura 4.8.

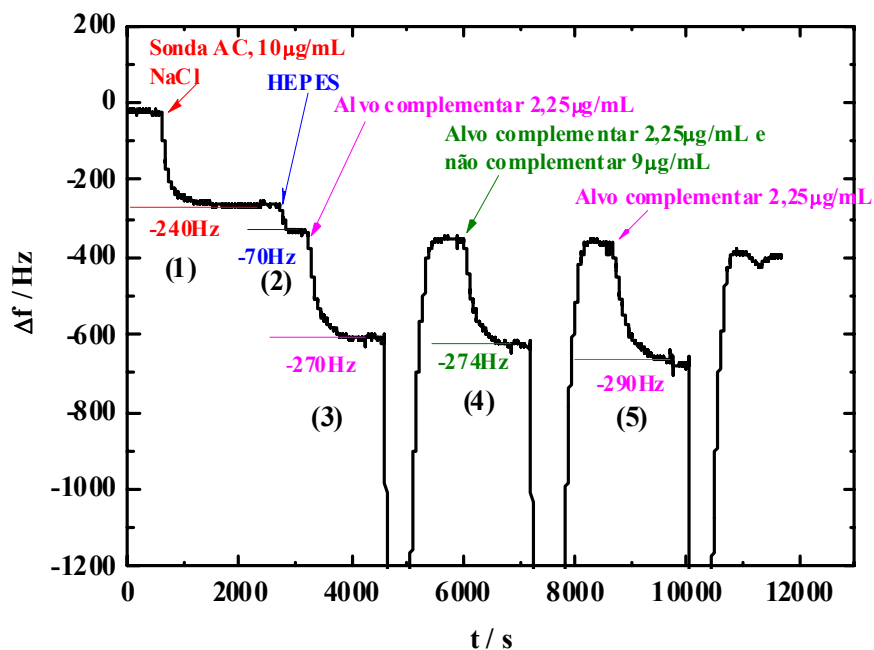


Figura 4.8. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo durante as seguintes adições: (1) Solução $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ da sonda AC em meio de uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl; (2) Solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES com $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl e 1 mol L^{-1} de NaOH, pH 7,2; (3) Solução $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de um alvo não complementar; (4) Solução contendo o alvo complementar AC ($2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) e não complementar ($9 \mu\text{g mL}^{-1}$); (5) Solução $2,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ do alvo complementar AC.

Observa-se na Figura 4.8 que as variações de frequência de oscilação do cristal de quartzo são praticamente iguais para adição de uma solução contendo apenas a molécula alvo com sequência de bases nitrogenadas complementar a sequência da sonda imobilizada e uma solução contendo a

molécula alvo complementar e uma molécula não complementar, 270 e 274 Hz respectivamente. Isto indica que a presença de um alvo com sequência não complementar não interfere no processo de hibridação, e este ocorre mesmo que a molécula alvo complementar esteja em concentrações muito pequenas quando comparada a concentração do alvo não complementar utilizada.

A compreensão e o entendimento da cinética e termodinâmica da hibridação do DNA em fase sólida são muito importantes para aperfeiçoar o estudo e desenvolvimento de genossensores, porque a estabilidade termodinâmica pode ditar a seletividade do processo de hibridação. Sendo assim, a partir dos resultados obtidos utilizando sequências alvo complementares e não complementares, em uma segunda etapa deste trabalho, investigou-se o mecanismo de hibridação das cadeias de DNA.

4.1.2. Cinética de Hibridação em um Genossensor Piezelétrico

A investigação do mecanismo de hibridação de um ácido nucleico em um ambiente interfacial foi feita por meio de um biossensor utilizando uma microbalança de cristal de quartzo de 9 MHz (terceiro harmônico) constituído de uma monocamada da sonda de 20 bases nitrogenadas (sonda P, Tabela 4.6, p. 71) imobilizada no eletrodo de ouro na superfície do cristal de quartzo.

A análise cinética, por um mecanismo de duas etapas é apropriada para ajustar as curvas cinéticas de dois alvos complementares de 20 e 40 bases nitrogenadas em diferentes concentrações. A primeira etapa, reversível, consiste na adsorção de Langmuir de alvos na superfície do biossensor, ou seja, adsorção física não específica. A segunda etapa, irreversível e que determina a taxa (velocidade), consiste na hibridação do alvo difundindo na superfície do biossensor com a sonda ancorada (imobilizada), ou seja, adsorção química.

A constante cinética de adsorção de primeira ordem $k(s^{-1})$, calculada a partir das curvas de hibridação, é igual a $K_1.k_2.C / (1 +K_1.C)$, onde

C (mol L^{-1}) é a concentração do alvo no seio da solução, K_1 (M^{-1}) a constante de equilíbrio da adsorção não específica de Langmuir e k_2 (s^{-1}) a constante cinética da hibridação específica na superfície. Os valores de K_1 e k_2 , calculados a partir das curvas de hibridação, dependem drasticamente do comprimento das cadeias dos alvos, mas em um caminho oposto: K_1 aumenta e k_2 diminui com o tamanho do alvo.

Para o estudo da cinética de hibridação utilizou-se uma sequência de DNA da microalga *Alexandrium minutum* com 20 bases nitrogenadas (Tabela 3.1, p. 39) e sequências complementares e não complementares de 20 e 40 bases nitrogenadas em diferentes concentrações. A sonda foi denominada P (*probe*) e os alvos complementares e não complementares denominados T (*target*) sendo T1, T2, T3, T4, T5 e T6. As sequências de bases nitrogenadas da sonda e das moléculas alvo utilizadas são apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Estrutura da sonda de DNA (P) e dos alvos de DNA (T1a T6). As complementaridades sonda-alvo são indicadas em negrito em ambas as sequências.

P	5' disulfeto C6 AGCAC TGATG TGTAAGGGCT 3'
T1	3' CCTTG GTCTG TGTTT CAAGA 5'
T2	3' ACTAC CCCGA 5'
T3	3' TCGTG ACTAC ACTAC CCCGA 5'
T4	3' TCGTG ACTAC ACTAC CCCGA T1 5'
T5	3' ACGTT ACGAG TTTTT TCATT CGAAA 5'
T6	3' TCGTG ACTAC ACTAC CCCGA T5 5'

4.1.2.1. Modelo do biossensor, eficiência de hibridação e regeneração

O biossensor foi desenvolvido por meio da imobilização da sonda P na superfície de ouro do cristal piezométrico. A imobilização da sonda,

hibridação seletiva com alvo complementar e a regeneração do biossensor foram monitoradas por meio da variação da frequência de oscilação do quartzo (Figura 4.9).

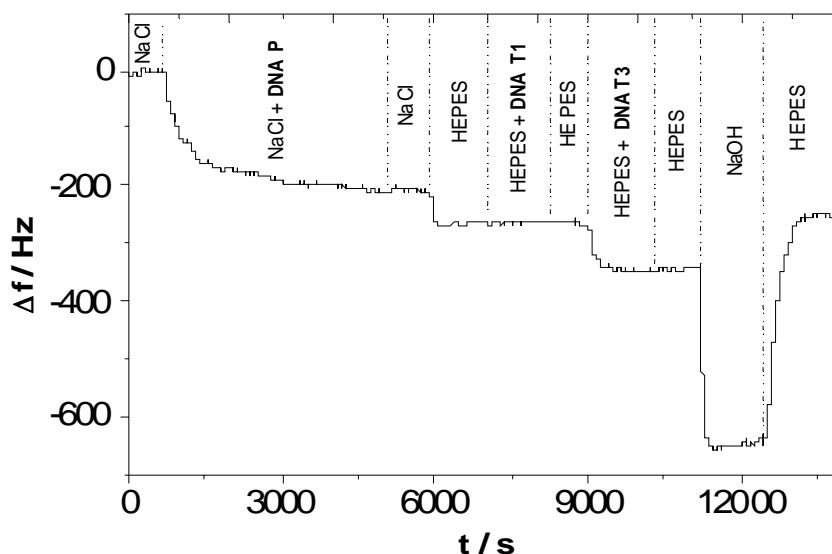


Figura 4.9. Curva da variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo para imobilização da sonda, hibridação com a molécula alvo e após a regeneração do biossensor.

Foi observada uma variação na frequência de oscilação do cristal de 205 Hz (Figura 4.9) durante a adição de uma solução $3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sonda P em uma solução salina ($\text{NaCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Não foi observada variação na frequência de oscilação durante a adição somente da solução salina ($\text{NaCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$), indicando que a sonda foi imobilizada irreversivelmente na superfície do sensor. A porcentagem de imobilização τ (cobertura) na superfície do sensor foi calculada de acordo com a Equação 7, apresentada anteriormente.

A porcentagem de cobertura (τ) calculada foi de 74%. Não se observou variação na frequência de oscilação durante a adição de uma molécula alvo não complementar, T1 ($\text{T1 } 3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$, $\text{NaCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,2), indicando que não ocorrem adsorções físicas não específicas. Uma variação de 83 Hz foi obtida durante a adição da molécula alvo complementar T2 ($\text{T2 } 3,2 \mu\text{mol L}^{-1}$,

NaCl 0,5 mol L⁻¹, pH 7,2), indicando que a hibridação ocorre especificamente entre o alvo complementar e a sonda imobilizada. Durante a adição do tampão salino (NaCl 0,5 mol L⁻¹ pH 7,2) não houve decréscimo na frequência de oscilação do cristal, o que indica que a hibridação é irreversível. A eficiência de hibridação λ foi calculada utilizando-se a Equação 5 (p. 59).

A eficiência de hibridação λ calculada é de 41%. Observa-se uma variação na frequência de oscilação no sentido oposto quando adicionado uma solução de regeneração (NaOH 0,5 mol.L⁻¹ e NaCl 3 mol.L⁻¹), ou seja, um aumento na frequência (82 Hz) o que indica remoção da molécula alvo hibridizada da superfície do biossensor. A hibridação e regeneração podem ser repetidas sucessivas vezes. A variação na frequência de oscilação do quartzo para adição do alvo T3 é constante, igual a 62 ± 6 Hz, indicando sucesso na regeneração do biossensor como mostra a Figura 4.10.

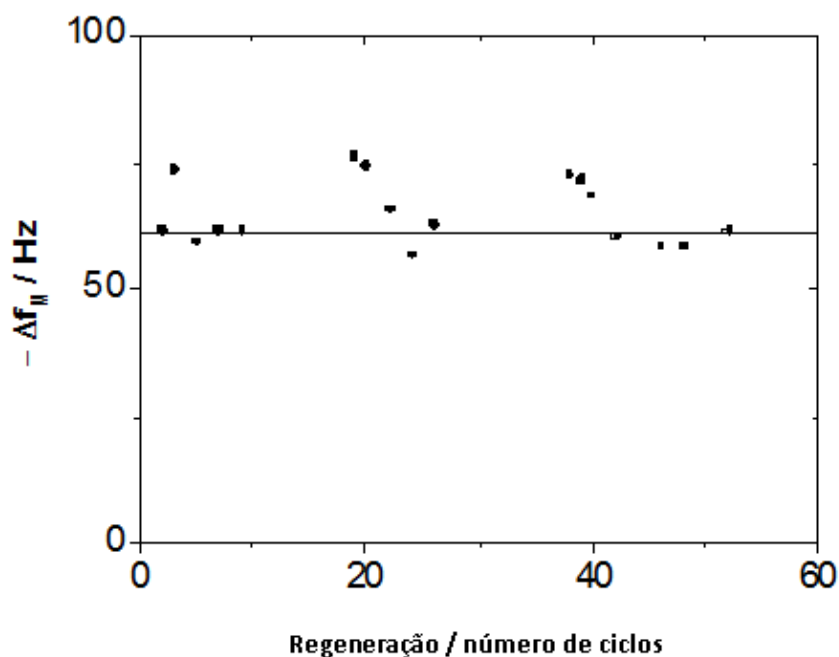


Figura 4.10. Variação de frequência de oscilação do cristal de quartzo correspondente a hibridação com a molécula alvo e o número de ciclos de regeneração do biossensor.

4.1.2.2. Resposta do biossensor para alvos com tamanhos variados (número de bases nitrogenadas)

A imobilização de uma molécula biológica (neste caso, o DNA) pode induzir um comportamento viscoelástico do oscilador. Para estudar tal efeito, realizou-se a hibridação de alvos com diferentes números de bases nitrogenadas, de 10 a 45 bases (T2, T3, T4 e T6). A evolução da variação na frequência de oscilação do quartzo de acordo com o tamanho do alvo é linear como mostra a Figura 4.11 e 4.12.

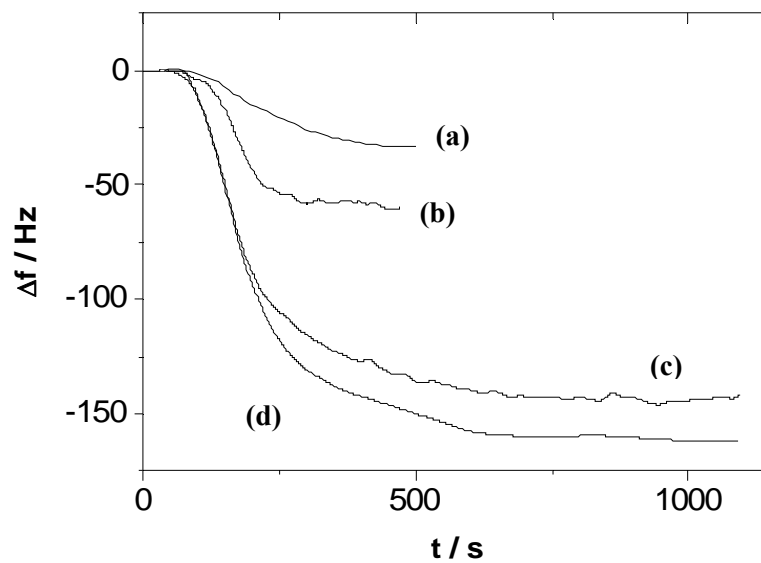


Figura 4.11. Variação na frequência de oscilação durante a hibridação dos alvos complementares de (a) 10 bases, alvo T2, (b) 20 bases, alvo T3, (c) 40 bases, alvo T4 e (d) 45 bases T6.

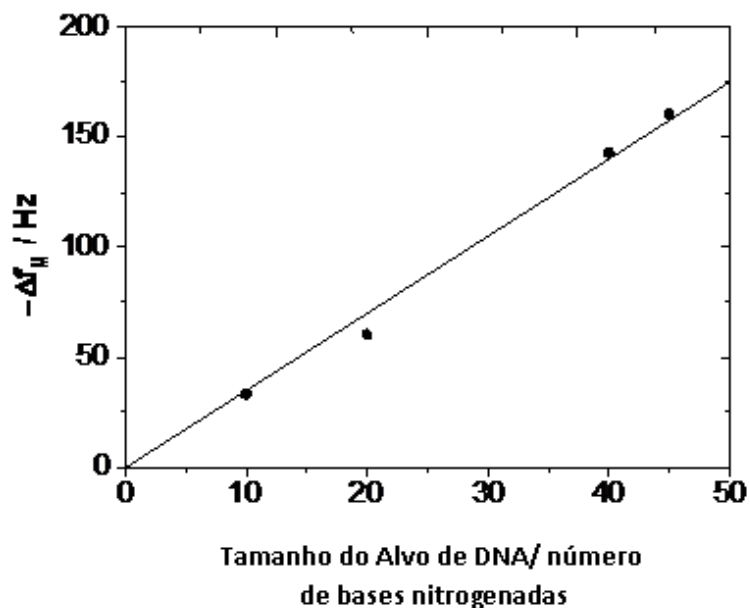


Figura 4.12. Variação da frequência de oscilação do cristal de quartzo de acordo com tamanho dos alvos complementares de DNA.

O coeficiente linear S é igual a $3,5 \pm 0,1$ Hz / base ($R^2 = 0,997$), e foi calculado de acordo com a Equação 6.

$$-\Delta f_M = s.n \text{ [Eq. 6]}$$

O biossensor responde linearmente para alvos de DNA com até 45 bases nitrogenadas, como observar-se na Figura 4.12.

4.1.2.3. Cinética de Hibridação

A cinética de hibridação para alvos de 20 bases (T3) e 40 bases nitrogenadas (T4) foi feita para diferentes concentrações. A cinética foi normalizada para T3 e T4, $1 - \Delta f / \Delta f_M$ e é mostrada na Figura 4.13 (A), (B), (C) e (D).

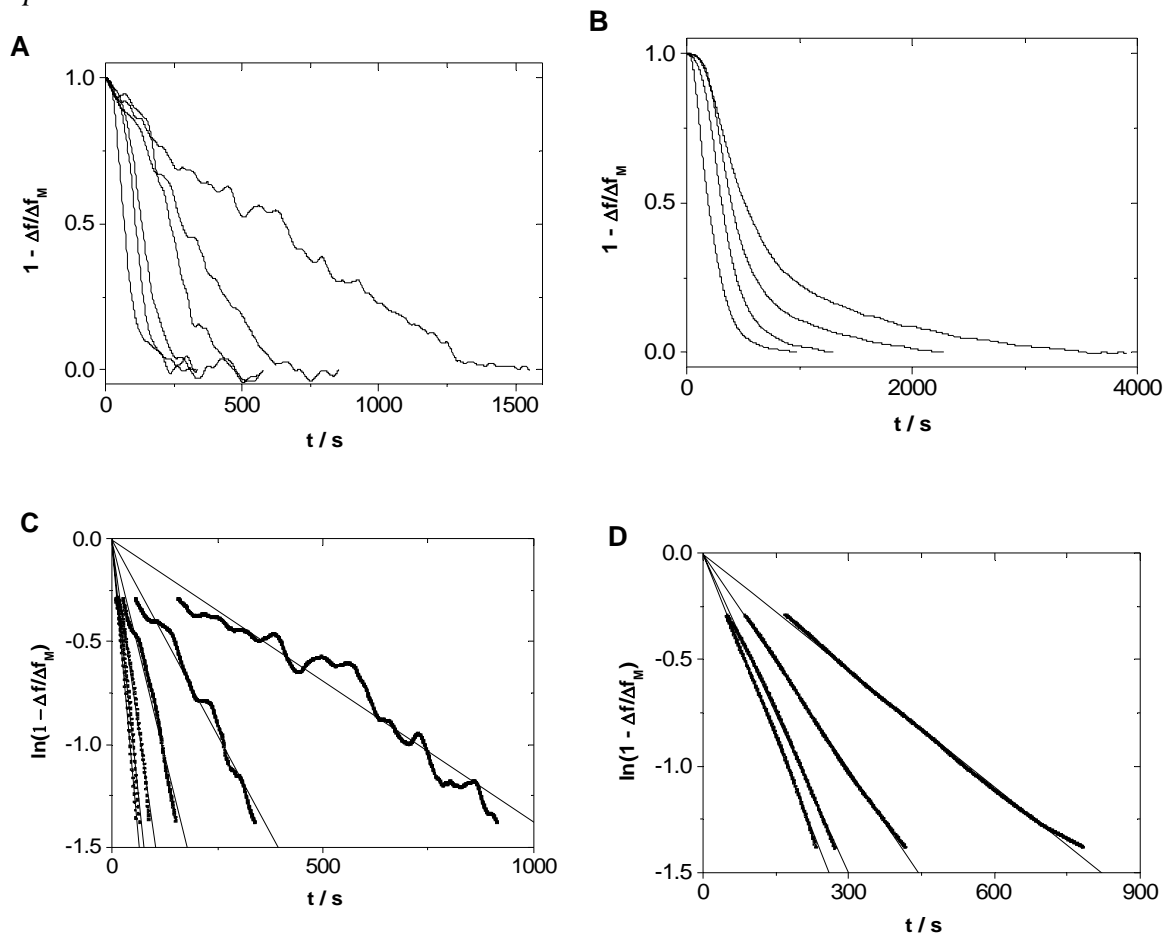


Figura 4.13. Curvas de hibridação normalizadas dos alvos complementares de 20 bases nitrogenadas T3 nas concentrações $6,7 \cdot 10^{-7}$; $1,7 \cdot 10^{-6}$; $6,7 \cdot 10^{-6}$; $1,7 \cdot 10^{-5}$; $3,3 \cdot 10^{-5}$ e $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (A). Curvas de hibridação normalizadas para o alvo complementar de 40 bases nitrogenadas T4 nas concentrações $1,7 \cdot 10^{-6}$; $3,3 \cdot 10^{-6}$; $6,7 \cdot 10^{-6}$ e $1,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (B). Curvas logarítmicas da hibridação dos alvos complementares de 20 bases nitrogenadas T3 (C) e 40 bases nitrogenadas T4 (D).

A hibridação em um ambiente interfacial pode ser descrita por uma lei cinética de primeira ordem [1] que é igual, no caso de medidas de variação de frequência a:

$$\ln(1 - \Delta f / \Delta f_M) = -k.t \quad \text{[Eq. 7]}$$

A evolução das curvas experimentais de $\ln(1 - \Delta f / \Delta f_M)$ são lineares para ambos os alvos complementares T3 (Figura 4.13-C) e T4 (Figura

4.13-D). Os valores das constantes cinéticas calculados são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7. Constante cinética de primeira ordem calculada para curvas cinéticas de hibridação das moléculas alvo de DNA complementares, T3 e T4.

T3				T4			
C_{DNA}	k	Δk	R^2	C_{DNA}	k	Δk	R^2
mol L ⁻¹	s ⁻¹			mol L ⁻¹	s ⁻¹		
$6,7 \cdot 10^{-7}$	$1,38 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-5}$	0,94	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$1,83 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-6}$	0,998
$1,7 \cdot 10^{-6}$	$3,81 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-5}$	0,97	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$3,39 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-6}$	0,999
$6,7 \cdot 10^{-6}$	$8,49 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,97	$8,3 \cdot 10^{-6}$	$5,01 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-5}$	0,998
$1,7 \cdot 10^{-5}$	$1,46 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-4}$	0,99	$1,7 \cdot 10^{-5}$	$5,79 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-5}$	0,998
$3,3 \cdot 10^{-5}$	$1,99 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	0,98				
$6,7 \cdot 10^{-5}$	$2,32 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-4}$	0,99				

O desvio padrão para os valores de k calculados estão próximos de 1% para o alvo T3 e 0,5 para o alvo T4, indicando que a lei de adsorção de primeira ordem é apropriada para descrever a cinética de hibridação de ambos os alvos para toda faixa de concentração utilizada.

Os valores cinéticos k descrevem o comportamento geral da cinética de hibridação. A Figura 4.14 descreve os valores da cinética de hibridação k versus a concentração C dos alvos. A curva experimental k-C não é linear indicando que as curvas de hibridação não podem ser ajustadas usando a Equação 1 e o mecanismo pode ser descrito com uma etapa de hibridação como mostrado na Figura 1.1. k atinge um limite horizontal em valores de concentração elevada. Considerando a observação experimental, presume-se que há uma saturação da superfície do biossensor em uma alta concentração da molécula alvo de DNA.

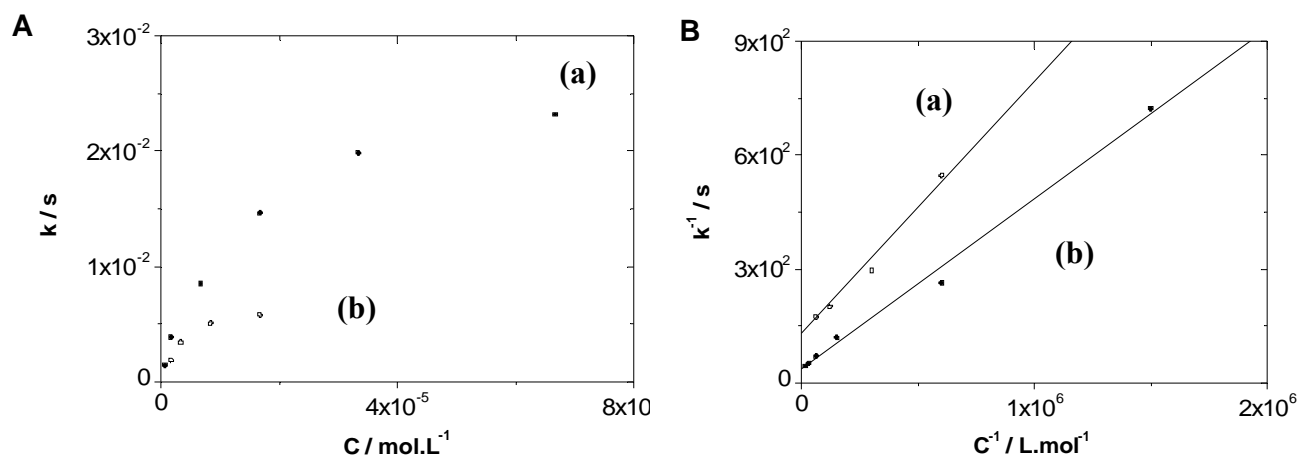


Figura 4.14. Curvas k - C (A) e k^{-1} - C^{-1} (B), para alvos complementares de DNA T3 (a) e T4 (b).

A Equação 8 corresponde a um mecanismo de duas etapas produzindo uma relação linear entre k^{-1} e C^{-1} .

$$k^{-1} = 1 / k_2 + 1 / (K_1.k_2).C^{-1} \text{ [Eq. 8]}$$

A curva experimental k^{-1} - C^{-1} (Figura 4.14-B) é linear, indicando que a hibridação pode ser descrita por um mecanismo de duas etapas. É importante notar que a Equação 8 é largamente utilizada e pode ser usada para descrever a hibridação em baixas concentrações do alvo, como as curvas k - C da Figura 4.14-A é linear para baixas concentrações. A correlação linear dos coeficientes R^2 são 0,970 e 0,992 para os alvos T3 e T4, respectivamente. K_1 e os produtos k_2 obtidos por meio de um ajuste linear são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Constantes cinéticas para um mecanismo de hibridação de duas etapas.

Alvo T3		Alvo T4	
K_1	k_2	K_1	k_2
(M^{-1})	(s^{-1})	(M^{-1})	(s^{-1})
$(7,7 \pm 1,0).10^4$	$(2,9 \pm 1,0).10^{-2}$	$(1,9 \pm 0,4).10^5$	$(7,7 \pm 1,0).10^{-3}$

T3			T4		
K_1	k_2	k_{eff}	K_1	k_2	k_{eff}
M^{-1}	s^{-1}	$M^{-1}.s^{-1}$	M^{-1}	s^{-1}	$M^{-1}.s^{-1}$
$(7,7 \pm 1,0).10^4$	$(2,9 \pm 1,0).10^{-2}$	$2,2.10^2$	$(1,9 \pm 0,4).10^5$	$(7,7 \pm 1,0).10^{-3}$	$1,5.10^2$

Observa-se pelos dados apresentados na Tabela 4.8 que a constante K_1 é maior para o alvo de maior massa molecular, indicando que a adsorção física não específica na superfície do biossensor é maior para o maior alvo. k_2 é maior para o alvo de maior massa molecular, indicando que a difusão na superfície é maior para o alvo maior (T4). É interessante apontar, por meio destes resultados, que a os valores de K_1 e k_2 de acordo com o número de bases nitrogenadas são opostos, e depende do tamanho do alvo, e os valores k_{eff} diminuem.

4.3. Medidas Eletroquímicas

As etapas de imobilização da sonda de DNA sobre um eletrodo de ouro e após o processo de hibridação com o alvo complementar também foram eletroquimicamente estudadas por meio das técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Para estas medidas foram utilizadas sondas com sequências de bases nitrogenadas das algas *Alexandrium minutum*, *Alexandrium catanella* e *Alexandrium taylori*, e os respectivos alvos complementares destas sondas, que serão novamente apresentados na Tabela

4.9. Os resultados obtidos com as técnicas eletroquímicas serão apresentados nos itens a seguir.

4.3.1. Preparação do Genossensor

Os cristais de quartzo do biossensor de DNA foram preparados em três etapas. Entre cada uma das etapas foram realizadas medidas de voltametria cíclica e de espectroscopia de impedância eletroquímica, sendo o mesmo procedimento para ambas. Na primeira etapa, ao cristal de quartzo previamente limpo, a sonda de DNA modificada com um tiol foi imobilizada covalentemente no eletrodo de ouro. Na segunda etapa, foi adicionado ao eletrodo uma solução contendo a molécula alvo de sequência complementar a sonda para o estudo da hibridação entre as fitas complementares. Na terceira etapa, o quartzo foi colocado em contato com uma solução 3 mol L^{-1} de NaCl e $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e novamente realizada uma medida eletroquímica para avaliar a regeneração do genossensor, ou seja, a retirada da molécula alvo de DNA. A Figura 4.15 mostra as etapas de preparação do genossensor.

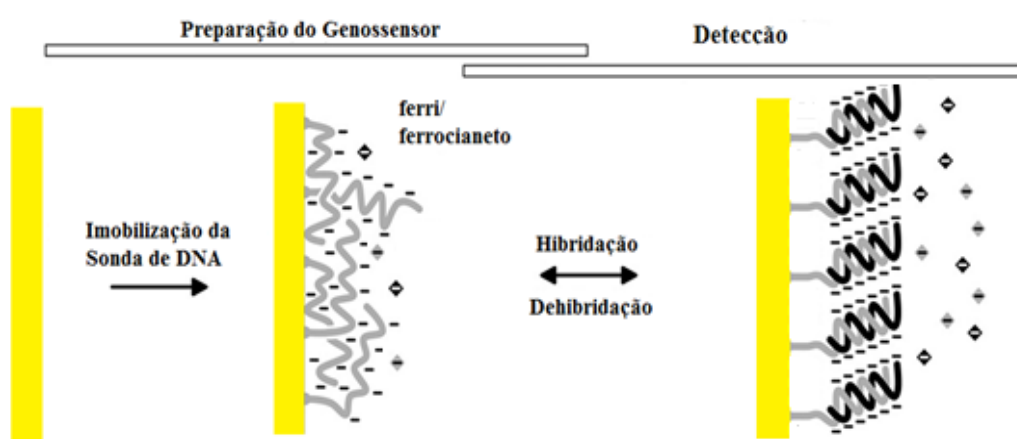


Figura 4.15. Representação das etapas de preparação do genossensor para detecção eletroquímica. Figura adaptada do artigo de KAFKA *et al.*¹¹³.

Visando melhorar o desempenho do genossensor por meio do aumento na eficiência de hibridação, foi utilizado um reagente de bloqueio, o 6-mercaptop 1-hexanol. Sendo assim, ao procedimento realizado acima foi adicionado mais uma etapa, a imobilização do tiol. A adição deste reagente foi feita após a imobilização da sonda de DNA, sendo que este método de preparação consiste de quatro etapas. O MCH foi adicionado na segunda etapa de preparação, após a modificação do eletrodo com a sonda, a fim de remover as sondas de DNA ligadas inespecificamente à superfície durante a etapa de imobilização e melhorar a orientação das fitas de DNA ligadas a superfície visando aumentar a eficiência de hibridação²³. A Figura 4.16 mostra as etapas de preparação do genossensor para realização das medidas eletroquímicas utilizando o reagente MCH.

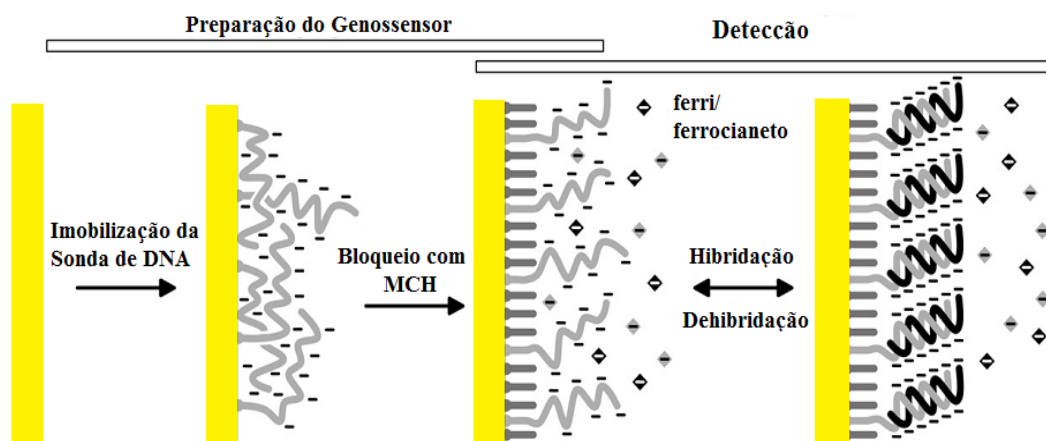


Figura 4.16. Etapas de preparação do genossensor para detecção eletroquímica utilizando o MCH. Figura adaptada do artigo de KAFKA *et al.*¹¹³.

Esses dois métodos mostrados anteriormente foram utilizados para as medidas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica, cujos resultados serão apresentados nos itens abaixo.

4.3.2. Voltametria Cíclica (CV)

As técnicas voltamétricas são ferramentas convenientes e frequentemente utilizadas para detecção de moléculas de DNA. Neste item do trabalho, apresentaremos a detecção das etapas de imobilização, hibridação e regeneração de um biossensor de DNA utilizando-se a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. Como mediador redox utilizou-se o par ferricianeto/ferrocianeto de potássio, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. As sequências de bases nitrogenadas das sondas e alvos utilizados são apresentadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9. Estrutura das sondas de DNA das microalgas do gênero *Alexandrium* (AM, AC e AT) e os respectivos alvos complementares de DNA (Alvo AM, Alvo AC, Alvo AT).

AM	HS - $(\text{CH}_2)_6$ - 5'-AAG CCC TTA CAC ATC AGT GCT GGC A-3'
Alvo AM	3'- T TCG GGA ATG TGT AGT CAC GAC CGT -5'
AC	HS - $(\text{CH}_2)_6$ -5 -GAT TTC CTC AGT GAG ATT GTA GTG C-3'
Alvo AC	3'- C TAA AGG AGT CAC TCT AAC ATC ACG - 5'
AT	HS - $(\text{CH}_2)_6$ -5'- GAT GCT TCC TTC CTT GGA CTT ACA A - 3'
Alvo AT	3'- C TAC GAA GGA AGG AAC CTG AAT GTT - 5'

Depois de limpo com solução “piranha” e eletroquimicamente, os cristais de quartzo foram utilizados como eletrodo de trabalho para realização das medidas de CV em uma solução de ferri/ferrocianeto de potássio, como mostrado na Figura 4.17.

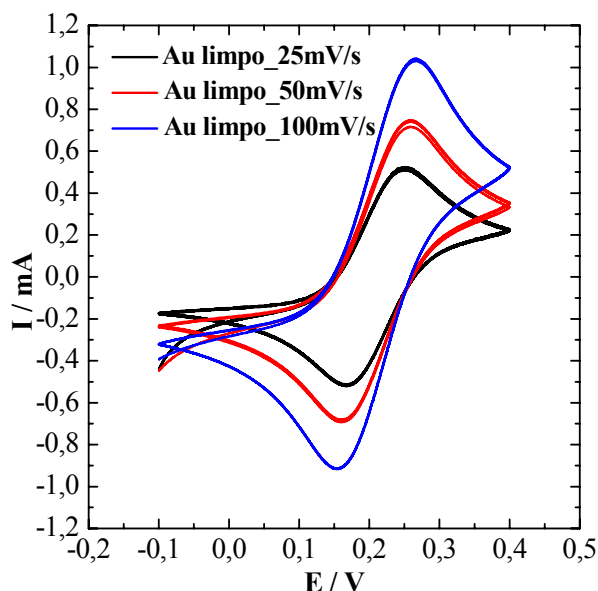


Figura 4.17. Voltamogramas do cristal de quartzo limpo realizados em uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 1 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. $v = 25, 50$ e 100 m Vs^{-1} .

A Figura 4.17 mostra as voltametrias cíclicas do cristal de quartzo em solução contendo em três diferentes velocidades de varredura. A partir dos voltamogramas apresentados na Figura 4.18, calculou-se os valores de potenciais de pico anódico (E_{pa}) e catódico (E_{pc}) e as correntes anódica (I_a) e catódica (I_c) para as três velocidades de varredura utilizadas. Os valores calculados são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Valores de E_{pa} , E_{pc} e I_a e I_c do voltamograma da Figura 4.17.

v / mVs^{-1}	E_{pa} / V	I_a / mA	E_{pc} / V	I_c / mA
25	$0,247 \pm 0,004^*$	$0,615 \pm 0,005$	$0,170 \pm 0,005$	$-0,522 \pm 0,006$
50	$0,259 \pm 0,006$	$0,805 \pm 0,007$	$0,161 \pm 0,005$	$-0,782 \pm 0,004$
100	$0,265 \pm 0,005$	$1,104 \pm 0,006$	$0,156 \pm 0,004$	$-0,882 \pm 0,007$

*Desvio padrão calculado para 10 eletrodos.

A Figura 4.17 mostra o voltamograma cíclico da superfície do cristal de quartzo limpo e os valores de potencial e corrente calculados são característicos da oxidação e redução do ferro em um eletrodo de ouro. O voltamograma obtido após a modificação do eletrodo com a sonda de DNA e o alvo de sequência complementar, é apresentado na Figura 4.18.

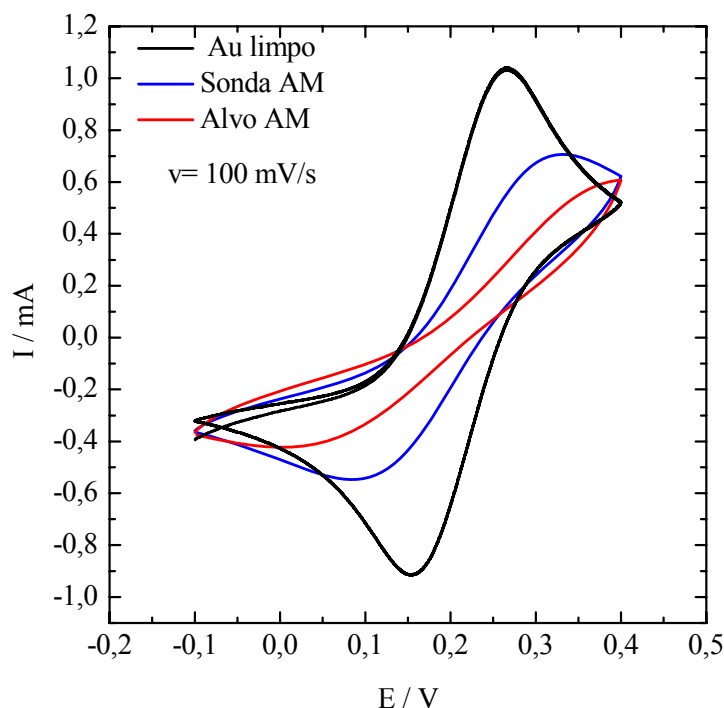


Figura 4.18. Voltamograma cíclico do cristal de quartzo realizados em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ nas seguintes condições: Cristal de quartzo limpo (curva na cor preta); Após imobilização da sonda AM de DNA, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor azul); Após a hibridação com o alvo AM complementar, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor vermelha). $v=100 \text{ m Vs}^{-1}$.

A Figura 4.18 apresenta o voltamograma cíclico em $1 \text{ mM} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,5 \text{ M}$ de KNO_3 do eletrodo de ouro modificado sequencialmente. O comportamento eletroativo do par ferri/ferro foi utilizado para mostrar a transferência de carga na superfície do eletrodo de ouro para cada etapa de modificação do mesmo bem com as etapas de hibridação. Os

valores de potencial de pico anódico e catódico (E_{pa} , E_{pc}), assim como os valores de corrente anódica e catódica (I_a , I_c) do voltamograma apresentado na Figura 4.19 são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Valores de E_{pa} , E_{pc} e I_a e I_c do voltamograma da Figura 4.18.

Cristal	E_{pa} / V	I_a / mA	E_{pc} / V	I_c / mA
V=100 mVs⁻¹				
Au limpo	0,260±0,003**	1,104±0,002	0,156±0,005	-0,882±0,004
Sonda AM	0,326±0,004	0,840±0,003	0,098±0,004	-0,110±0,005
Alvo AM	0,402±0,003	0,894±0,004	*N/P	*N/P

*N/P – Não foi possível obter o dado.

**Média de obtida para 10 eletrodos.

O voltamograma do eletrodo de Au limpo (curva na cor preta, Figura 4.18), apresenta os mesmos valores de potencial de pico anódico e catódico para o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ encontrados anteriormente (Tabela 4.11), em 0,260 e 0,156 V, respectivamente. Após a imobilização da sonda AM de DNA (Figura 4.18, curva na cor azul), observa-se que a corrente de pico anódica diminuiu significativamente quando comparada ao valor encontrado para o eletrodo limpo. Isto pode ser atribuído a modificação da superfície do ouro com a sonda de DNA que contém um grupo sulfeto na posição 5', por meio da ligação entre o enxofre e o ouro, bloqueando parcialmente a transferência de elétrons entre o eletrodo e o par redox¹¹⁴. Após esta etapa, o eletrodo foi imerso em uma solução 0,05 mol L⁻¹ de tampão HEPES contendo a molécula alvo com sequência complementar a sonda por 1h para a hibridação entre as fitas complementares de DNA. A hibridação do DNA também leva a uma diminuição nos valores de potencial e de corrente anódica (Tabela 4.11.). Isto também pode ser atribuído ao bloqueio da superfície do eletrodo que dificulta o

processo de transferência de carga do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, após a formação da dupla fita (híbrido).

Observa-se na Tabela 4.11, um aumento no potencial de pico anódico após a etapa de hibridação quando comparamos o eletrodo contendo a fita simples (sonda) e a fita dupla de DNA (eletrodo após hibridação com alvo AM). Isto pode ser atribuído a uma maior densidade de carga negativa na dupla fita comparada com a fita simples antes da hibridação, devido aos grupos fosfatos carregados negativamente¹¹⁵. Segundo Lee *et al.*⁸⁷ a dupla fita de DNA apresenta maior condutividade que a fita simples, que está em concordância com os resultados obtidos. Estes resultados indicam que a mudança nas propriedades da superfície do eletrodo após a imobilização e hibridação de DNA pode ser investigada pela alteração do perfil voltamétrico.

Avaliou-se a regeneração do genossensor utilizando-se uma solução contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH e 3 mol L^{-1} de NaCl, empregada anteriormente nos experimentos com a técnica de QCM, e os voltamogramas são apresentados na Figura 4.19.

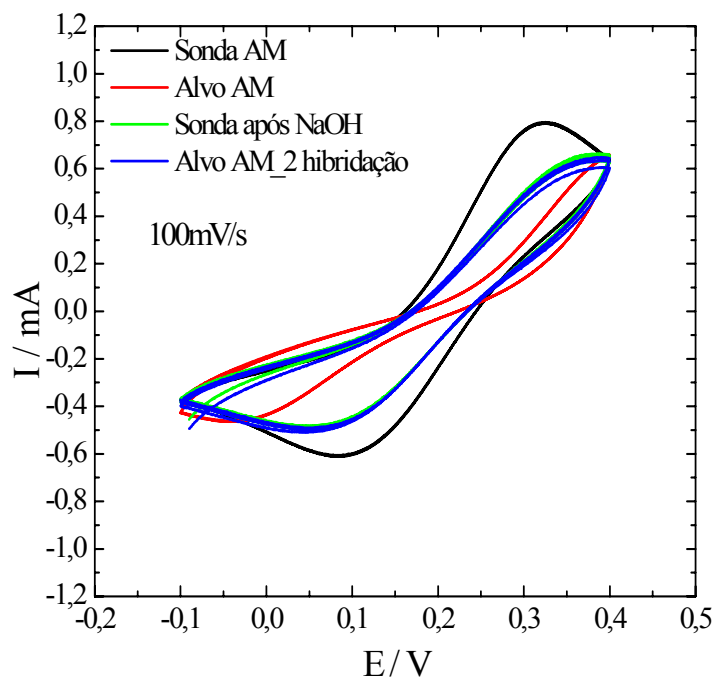


Figura 4.19. Voltamogramas do cristal de quartzo realizados em uma solução 0.5 mol L^{-1} de KNO_3 contendo $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ nas seguintes condições: após imobilização da sonda AM, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor preta); após hibridação com o alvo AM, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor vermelha); após a regeneração (curva na cor verde); após nova hibridação com a molécula alvo AM complementar, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor azul). $v = 100 \text{ m Vs}^{-1}$.

Observamos a partir da Figura 4.19 que a imobilização da sonda AM e a primeira hibridação estão em concordância com os resultados apresentados anteriormente (Fig. 4.19). As moléculas de DNA bloqueiam a superfície do eletrodo, dificultando a transferência de carga entre o par redox e o metal e isso causa uma diminuição na intensidade de corrente. Entretanto, após a regeneração do genossensor com uma solução contendo NaOH e NaCl, não foi possível observar diferenças entre a remoção da molécula alvo (curva na cor verde) e a nova hibridação (curva na cor azul). Era esperado um voltamograma com perfil semelhante a etapa de imobilização da sonda AM de DNA após a regeneração já que o uso desta solução promove a retirada da

molécula alvo complementar, como já foi mostrado pelos experimentos realizados com a técnica de microbalança de cristal de quartzo. No entanto, pode ocorrer que parte das espécies redox como caso Fe(II)/Fe(III) não sejam completamente removidas durante o processo de regeneração do filme sobre o eletrodo e, portanto, não diminua significativamente a resposta redox do sensor. Por outro lado, pode ocorrer que o processo de regeneração (NaOH e NaCl) leve a uma alteração significativa na estrutura do filme formado sobre a superfície do eletrodo que facilite o processo de transferência de carga e que, portanto não gera uma diminuição na resposta redox.

Realizaram-se também experimentos com concentrações crescentes da molécula alvo complementar de DNA, como mostra a Figura 4.20.

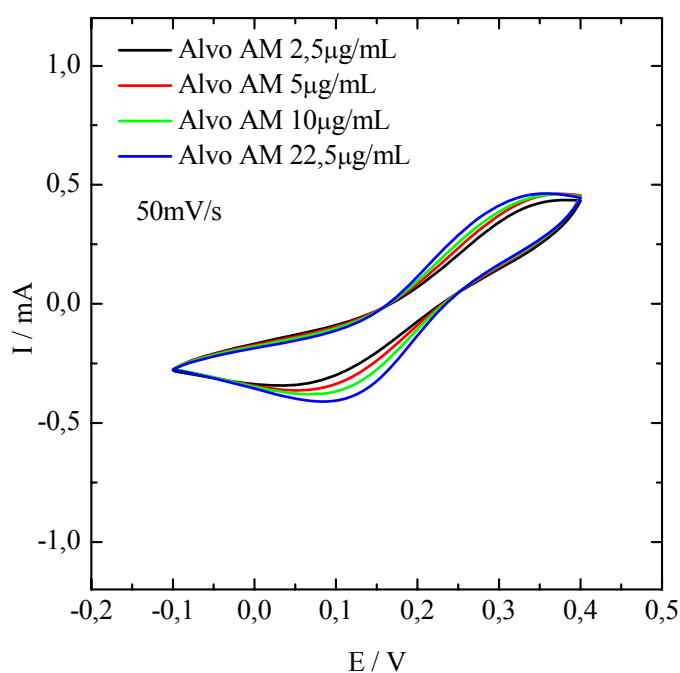


Figura 4.20. Voltamogramas do cristal de quartzo contendo a sonda AM realizados em uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ após adições da molécula alvo AM complementar nas concentrações 2,5 (curva na cor preta); 5 (curva na cor vermelha); 10 (curva na cor verde) e $22,5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor azul). $v = 50 \text{ m Vs}^{-1}$.

A partir da Figura 4.20 observa-se que na medida em que aumentamos a concentração da molécula alvo utilizada há um pequeno aumento na intensidade de corrente que pode estar relacionado ao processo de hibridação que pode levar a uma melhor orientação das moléculas de DNA na superfície do eletrodo evitando interações não específicas.

Nesta etapa do trabalho também foi avaliado o uso do tiol 6-mercaptop 1-hexanol após a imobilização da sonda de DNA visando melhorar a eficiência de hibridação. O cristal de quartzo foi colocado em 1 mmol L^{-1} do MCH em álcool etílico por 1 h e após esta etapa foram realizadas medidas de voltametria cíclica. Seguindo o procedimento apresentado anteriormente, após a adição do tiol, o quartzo foi colocado em uma solução $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão HEPES contendo a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ da molécula alvo complementar a sonda de DNA e novamente foram realizadas medidas de voltametria cíclica. A Figura 4.21 mostra um gráfico de voltametria cíclica para todas as etapas estudadas, desta vez, utilizando o reagente MCH.

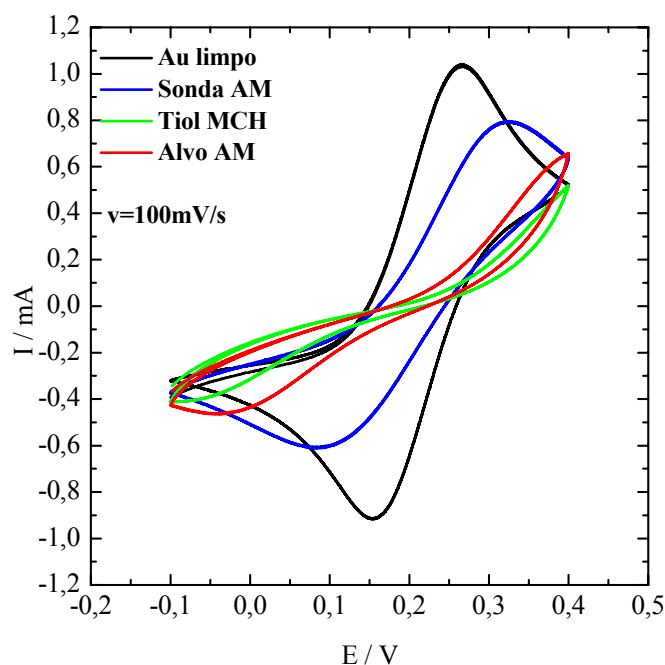


Figura 4.21. Voltamograma cíclico do cristal de quartzo realizados em uma solução contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 1 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ nas seguintes condições: Cristal de quartzo limpo (curva

na cor preta); Após imobilização da sonda AM, $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor azul); Após a adição do tiol MCH (curva na cor verde); Após a hibridação com o alvo AM complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$ (curva na cor vermelha). $v= 100 \text{ m Vs}^{-1}$.

Os valores de potencial de pico anódico e catódico (E_{pa} , E_{pc}), assim como os valores de corrente anódica e catódica (I_a , I_c) do voltamograma apresentado na Figura 4.21 são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12. Valores de E_{pa} , E_{pc} e I_a e I_c do voltamograma da Figura 4.21.

Cristal	E_{pa} / V	I_a / mA	E_{pc} / V	I_c / mA
$V=100 \text{ mVs}^{-1}$				
Au limpo	$0,260\pm 0,003^{**}$	$1,104\pm 0,002$	$0,156\pm 0,005$	$-0,882\pm 0,004$
Sonda AM	$0,324\pm 0,004$	$0,863\pm 0,003$	*N/P	*N/P
Tiol MCH	$0,397\pm 0,005$	$0,808\pm 0,004$	*N/P	*N/P
Alvo AM	$0,398\pm 0,003$	$0,935\pm 0,003$	*N/P	*N/P

*N/P – Não foi possível obter o dado.

**Média obtida para 10 eletrodos.

Observa-se na Figura 4.21 que após a adição de 1 mmol. L^{-1} de 6-mercaptop 1-hexanol, os picos de oxidação/redução dos íons ferro sofrem uma grande redução nas intensidades de corrente (curva na cor verde), o que pode estar associado a um maior bloqueio da superfície do eletrodo. O MCH apesar de possuir uma cadeia curta de carbonos leva a uma diminuição no processo de transferência de carga na interface eletrodo solução como observado na Figura 4.21. Em seguida, o eletrodo modificado com a sonda de DNA e o tiol MCH foi colocado em uma solução contendo a molécula alvo complementar por 2 horas, para hibridação (curva na cor azul). Observa-se na Figura 4.21, um pequeno aumento na intensidade de corrente após a hibridação, quando utilizamos o MCH. Acredita-se que a hibridação de DNA pode melhorar o processo de transferência de carga na superfície modificada, como discutido acima devido a

uma melhor ordenamento que ocorre com a hidratação quando comparado com a fita simples na superfície do eletrodo. Mesmo com um ligeiro aumento na corrente anódica e catódica que está associado a maior condutividade na dupla fita de DNA (híbrido), acredita-se que o DNA dificulte a transferência de elétrons entre o par redox $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ após a imobilização ou a hibridação de DNA sobre a superfície do eletrodo de ouro. Este resultado está de acordo com o esperado, em comparação com a fita simples, uma vez que após a formação da dupla fita há uma resistência maior para a chegada do par redox a superfície do eletrodo/sensor.

4.3.3. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A espectroscopia de impedância eletroquímica vem se tornando popular para monitorar as interações moleculares no estudo e desenvolvimento de biossensores. Neste trabalho, nós aplicamos a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica nos sistemas de sensores de DNA reutilizáveis para detectar eventos específicos de hibridação entre a sonda imobilizada e o alvo de DNA sem a utilização de moléculas marcadoras. O processo de hibridação foi monitorado por meio da mudança na resistência de transferência de carga para o par redox ferri/ferrocianeto no eletrodo modificado com DNA antes e após a hibridação. Os dados foram representados por gráficos de Nyquist que apresenta a impedância real em função da impedância imaginária (ReZ vs. $-ImZ$) para as diferentes superfícies como mostra a Figura 4.3. Cada ponto representa um valor da parte real (ReZ) e parte imaginária (ImZ) medidos em uma frequência específica. O espectro é composto de um semicírculo em regiões de alta frequência e de uma reta em baixas frequências. O semicírculo descreve processos de transferência de elétrons entre o eletrodo e a superfície, e a porção linear contém informações sobre o transporte de íons.

A sondas e alvos utilizados para as medidas de EIS são as mesmas descritas anteriormente no item que apresenta os resultados de voltametria cíclica (Tabela 4.11). Todas as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica que serão apresentadas neste item foram realizadas utilizando um potencial de modulação senoidal aplicado de 5 mV. A faixa de frequência aplicada foi de 63 kHz a 100 mHz.

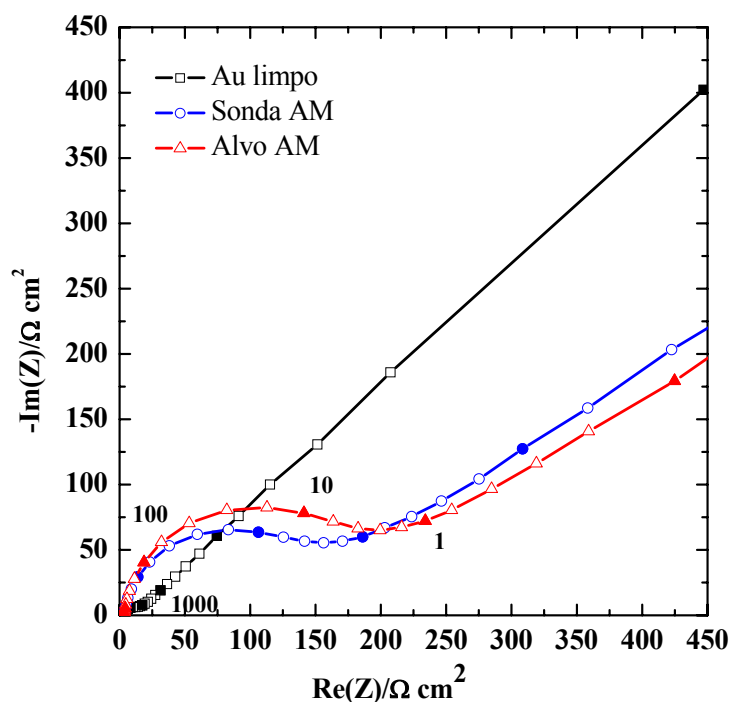


Figura 4.22. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do cristal de quartzo nas seguintes condições (—□—) Cristal de quartzo limpo; (—○—) Após imobilização da sonda AM, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—△—) Após hibridação com molécula alvo AM complementar. Solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1\text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

O gráfico de Nyquist, apresentado na Figura 4.22, mostra a impedância em cada uma das etapas de modificação da superfície do biossensor. Para o eletrodo limpo (curva na cor preta) observamos um pequeno semicírculo na região de alta frequência e uma linha reta na região de baixa frequência. O sinal em baixas frequências indica que o processo de transferência de elétrons do par redox é controlado por difusão. O gráfico após a

imobilização da sonda de DNA (curva na cor azul) apresenta uma porção semicircular na região de maior frequência, o que corresponde a um processo de transferência de elétrons limitado, e uma linha reta na região de baixa frequência que representa que o processo de transferência de elétrons ocorre por difusão.

Os espectros de impedância obtidos foram analisados por meio de um circuito equivalente básico mostrado na Figura 4.23, constituído por um circuito RC em paralelo e uma resistência da solução em série. Este circuito que consiste de dois resistores (R) e elemento de fase constante (CPE) é o que melhor descreve as características elétricas do sistema estudado. A introdução do CPE no lugar de uma capacitância é feito apenas para um melhor ajuste da curva. Normalmente utiliza-se também neste tipo de circuito a impedância de Warburg. Neste trabalho este parâmetro pôde ser excluído, pois utilizou-se uma faixa de frequência na qual não foi observado o comportamento difusional e a impedância interfacial foi dominante.

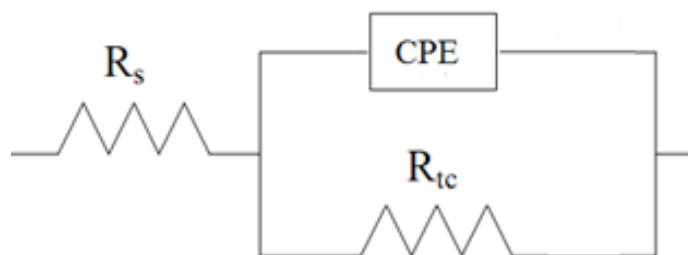


Figura 4.23. Circuito equivalente. R_s : Resistência da solução, R_{tc} : Resistência à transferência de carga, CPE: Elemento de fase constante (capacitância).

O comportamento da dupla camada elétrica pode ser comparado a um capacitor de placas paralelas e a resistência à transferência de carga na interface eletrodo/solução a um resistor desta forma a obtenção de informações a partir dos dados de impedância eletroquímica pode ser feita por meio da utilização de circuitos elétricos equivalentes, relacionando-se o comportamento da célula eletroquímica a um circuito elétrico de resistores, capacitores e

indutores. A interface eletrodo/solução pode ser simplificada como mostrado no diagrama esquemático na Figura 4.24.

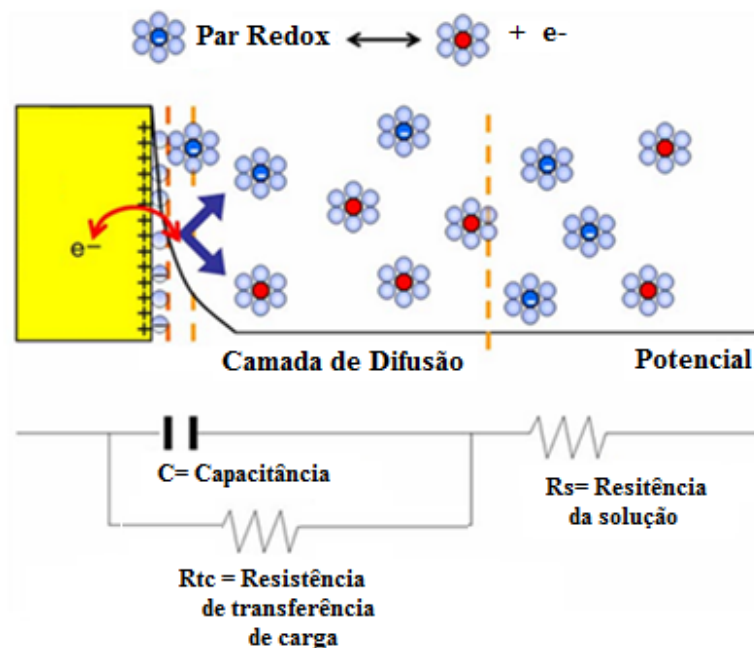


Figura 4.24. Diagrama esquemático do circuito elétrico equivalente relacionado à interface eletrodo/eletrolito utilizado para ajustar os dados de impedância. Figura extraída e adaptada do trabalho de PARK *et al.*¹¹⁶.

Quando aplica-se um potencial alternado ao eletrodo de trabalho no caso do cristal de quartzo, os contra-íons solvatados formam uma dupla camada elétrica alinhando-se ao longo da superfície do eletrodo, que pode ser representado por uma capacitância C . Uma vez que a corrente que passa na interface eletrodo/solução é conduzida pelos íons em solução, o efeito resistivo na solução sobre a migração dos íons é representado por uma resistência Z_w . Por outro lado, a introdução de elementos capacitivos em um circuito promove uma defasagem entre a corrente e o potencial. Desta forma, uma representação comum para a impedância em sistemas compostos por resistores e capacitores é realizada por meio de um diagrama de fasores no qual a impedância apresenta uma componente real (resistiva) e imaginária (capacitiva). A resistência de transferência de carga (R_{tc}), que é a resistência de polarização em um potencial de equilíbrio, é utilizada como principal indicador para realização das medidas

de impedância. Os pares redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ou $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{2+/3+}$ são frequentemente utilizados como indicadores redox para a cinética de eletrodo na interface, que é modificado por uma camada de substrato, bem como DNAs sonda e alvo na superfície do eletrodo^{22, 117}.

No gráfico apresentado na Figura 4.22, observa-se que a impedância do sistema aumenta nesta ordem: Au limpo < sonda de DNA imobilizada < alvo de DNA e hibridação. Os dados referentes aos elementos do circuito são apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist da Figura 4.22.

	Au limpo	Sonda AM	Alvo AM
R_{tc} (Ω/cm^2)	17,5	149	188
C (μF)	0,470	0,36	0,40
χ^2	$19 \cdot 10^{-3}$	$8,25 \cdot 10^{-3}$	$9,30 \cdot 10^{-3}$

Os valores de R_{tc} (Tabela 4.13) aumentam com a imobilização da sonda de DNA e posterior hibridação com a molécula alvo de DNA, sendo de 17,5 Ω para o eletrodo de ouro, indo para 149 Ω com a imobilização da sonda e 188 Ω após hibridação. O aumento de R_{ct} ocorre devido a formação da monocamada de DNA na superfície do eletrodo que dificulta o processo de transferência de carga do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ como mencionado anteriormente. Comparando as curvas de impedância, do eletrodo de ouro antes e após a formação da monocamada de DNA (imobilização e hibridação), observamos uma mudança no processo de transferência de elétrons e consequente diminuição da cinética de transferência de carga pela redução da área ativa do eletrodo, diminuindo a quantidade de ferro que se aproxima da superfície do eletrodo. Observa-se também um pequeno aumento nos valores de capacitância após a hibridação com a fita complementar, que pode estar relacionado com o aumento de grupos fosfato na dupla fita de DNA próximos à

interface do eletrodo. Os resultados de impedância obtidos para o cristal de quartzo modificado com a sonda de DNA e esse após a hibridação com a molécula alvo complementar estão em concordância com os resultados encontrados na literatura para sistemas semelhantes¹¹³.

Para regenerar o biossensor foi utilizado uma solução de NaOH e NaCl e foram realizadas medidas de impedância, como mostrado na Figura 4.25. Após a regeneração do eletrodo, podemos observar o mesmo perfil da curva de impedância, confirmando a regeneração e a nova hibridação do biossensor.

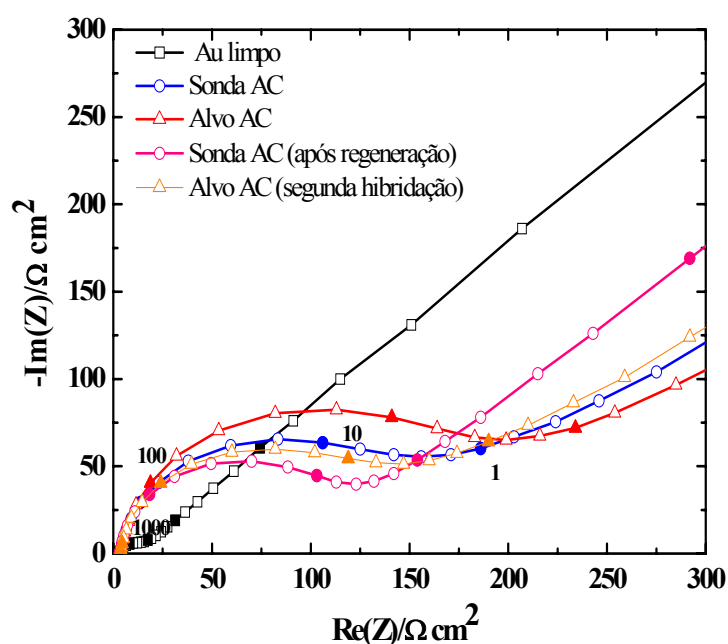


Figura 4.25. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do cristal de quartzo nas seguintes condições: (—□—) Cristal de quartzo limpo; (—○—) Após imobilização da sonda AC, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—△—) Após hibridação com molécula alvo AC complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—○—) Após regeneração; (—△—) Após nova hibridação com molécula alvo AC complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 1 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Os espectros de impedância da Figura 4.25 também foram ajustados usando o mesmo sistema equivalente apresentado anteriormente (Figura 4.24) e os valores calculados são mostrados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist da Figura 4.25.

	Au limpo	Sonda AC	Alvo AC	Sonda AC / Regeneração	Alvo AC / Nova hibridação
R_{tc} (Ω)	17,5	149	188	120	153
C (μF)	0,47	0,36	0,40	0,44	0,42
χ²	19.10 ⁻³	8,25. 10 ⁻³	9,30. 10 ⁻³	3,72. 10 ⁻³	1,03. 10 ⁻³

Observa-se na Figura 4.26 que a R_{tc} diminui após a regeneração com uma solução de NaOH e NaCl para o eletrodo contendo a sonda AC de DNA, e diminui também para a segunda hibridação com o alvo complementar. A disponibilidade da superfície do eletrodo para a reação redox diminui com a imobilização do analito, no caso o DNA, observamos com isso um aumento da impedância. A partir da Equação 9 calculou-se a porcentagem de cobertura (τ) da superfície do eletrodo ¹¹⁸.

$$\tau = \left| R_{tc (Au)} - R_{tc (ssDNA)} \right| / R_{tc (Au)} \quad \text{[Eq. 9]}$$

Onde R_{tc (Au)} é a resistência de transferência de carga para o eletrodo de ouro limpo e R_{tc (ssDNA)} a resistência de transferência de carga para o eletrodo de ouro modificado com a sonda de DNA, valores de R_{tc} obtidos em frequência de 100 MHz. A Tabela 4.15 apresenta os valores calculados com a Equação 12.

Tabela 4.15. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA adicionada às sondas imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo.

Sondas	λ (%)
Alexandrium minutum (AM)	20
Alexandrium catanella (AC)	27
Alexandrium taylori (AT)	25

O uso do reagente de bloqueio, o tiol mercapto-hexanol, para reduzir as interações não-específicas também foi avaliado, e os gráficos são apresentados nas Figuras 4.26.

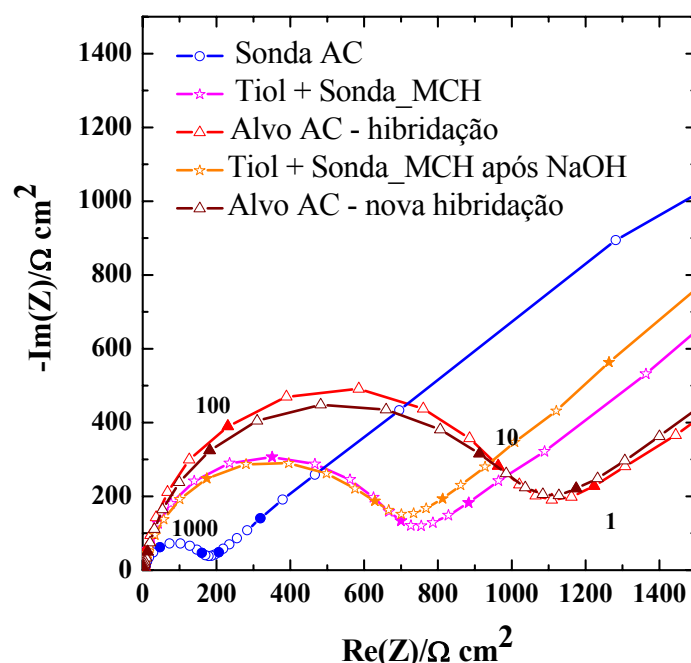


Figura 4.26. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do cristal de quartzo nas seguintes condições: (—○—) Após imobilização da sonda AC, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—★—) Após adição do tiol MCH; (—▲—) Após hibridação com a molécula alvo AC complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—★—) Após regeneração; (—▲—) Após nova hibridação com a molécula alvo AC complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1\text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Os espectros de impedância da Figura 4.27 foram ajustados usando o mesmo sistema equivalente (Figura 4.24) e os valores calculados são mostrados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Parâmetros obtidos do circuito equivalente ajustado ao diagrama de Nyquist da Figura 4.26.

	Sonda AC	Tiol MCH	Alvo AC / Hibridação	Sonda AC / Regeneração	Alvo AC / Nova hibridação
R_{tc} (Ω)	175	693	1111	710	1070
C (μF)	0,33	0,22	0,32	0,49	0,43
χ^2	$7,12 \cdot 10^{-3}$	$5,43 \cdot 10^{-3}$	$4,88 \cdot 10^{-3}$	$6,76 \cdot 10^{-3}$	$5,80 \cdot 10^{-3}$

Os valores de impedância da Figura 4.26 foram ajustados e os valores calculados mostraram que o uso do tiol MCH após a imobilização da sonda de DNA melhora a reprodutibilidade das medidas. Sabe-se que os valores de R_{tc} aumentam de acordo com o aumento do número de carbonos na cadeia dos tióis, porque os tióis de cadeias longas formam monocamadas mais ordenadas e compactas¹¹⁸. Entretanto, o MCH apesar de ser um tiol de cadeia curta promoveu uma diminuição no processo de transferência de carga na interface eletrodo solução, e isso causou um aumento nos valores de R_{tc} como mostra a Tabela 4.16.

Após o uso do tiol, os valores de R_{tc} da sonda antes e após a regeneração com NaOH e NaCl são bem próximos, assim como os valores de R_{tc} para primeira e a segunda hibridação. Segundo o trabalho de McEwen *et al.*¹¹⁹ que realizou medidas de microscopia de tunelamento (STM - *Scanning tunneling microscopy*), as moléculas de DNA possuem melhor orientação quando se utiliza o tiol 6-mercaptop 1-hexanol. De acordo com o trabalho, após o uso do reagente MCH as moléculas de DNA são orientadas perpendicularmente à superfície do eletrodo, pois o uso do tiol pode formar monocamadas mais densas e ordenadas na superfície do ouro. Os valores de capacitância sofrem um ligeiro aumento após a modificação da superfície do eletrodo com a sonda de

DNA. Com base nestes resultados, observados para todas as sondas e alvos de DNA utilizados, AM, AC e AT, foram calculadas as eficiências de hibridação antes e após o uso do tiol MCH, de acordo com a Equação 13.

$$\lambda = \left| R_{tc \text{ (ssDNA)}} - R_{tc \text{ (dsDNA)}} \right| / R_{tc \text{ (ssDNA)}} \text{ [Eq. 13]}$$

Onde $R_{tc \text{ (ssDNA)}}$ é a resistência de transferência de carga para o eletrodo de ouro modificado com a sonda de DNA e $R_{tc \text{ (dsDNA)}}$ a resistência de transferência de carga para o eletrodo de ouro modificado com a sonda de DNA após a hibridação com o alvo complementar, ou seja, a dupla fita de DNA (valores de R_{tc} obtidos em frequência de 100 MHz). A Tabela 4.18 apresenta os valores calculados com a equação 13 para os resultados obtidos sem o uso do tiol e utilizando o tiol MCH.

Tabela 4.17. Cálculos da porcentagem de hibridação da molécula alvo de DNA adicionada às sondas imobilizadas sobre a superfície do cristal de quartzo antes e após a utilização do tiol mercapto-hexanol (MCH).

Sondas	λ (%) sem uso do	λ (%) após uso do
	MCH	MCH
Alexandrium minutum (AM)	20	35
Alexandrium catanella (AC)	24	32
Alexandrium taylori (AT)	25	33

Analisando os dados obtidos por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica, observamos que o genossensor foi capaz de distinguir claramente entre a superfície do eletrodo contendo a sonda e após a adição do alvo de DNA complementar (hibridação). O eletrodo foi caracterizado na presença de um sistema redox clássico (ferri/ferrocianeto)

antes e depois da hibridação do DNA. As análises de impedância mostraram que a resistência de transferência de carga, R_{ct} , foi aumentando após cada modificação da superfície do eletrodo com maior aumento após a formação da dupla fita de DNA (híbrido), ao mesmo tempo em que os valores de capacitância não sofreram alterações significativas. A variação relativa do R_{ct} foi utilizada como parâmetro do sensor. O genossensor foi reutilizável após o uso de uma solução de regeneração permitindo a dissociação da dupla fita de DNA. O uso do tiol MCH após a imobilização da sonda de DNA permitiu uma melhora na eficiência de hibridação após a regeneração do biossensor (5 vezes), resultados que também foram observados utilizando a técnica de microbalança de cristal de quartzo (item 4.1).

4.3.3.1. Microeletrodos – Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

O termo microeletrodo refere-se aos sensores químicos com dimensões micrométricas ou sub-micrométricas⁸⁰. Estes dispositivos podem ser fabricados isoladamente ou na forma de arranjos podendo apresentar diferentes configurações como disco, anel, cilíndrico, cônico, esfera e um arranjo interdigitado, dentre outras. As diferenças entre os microeletrodos e os eletrodos convencionais são causadas por mudanças nas condições do transporte de massa do meio da solução em direção a superfície do eletrodo e tem várias implicações práticas importantes tais como diminuição do potencial de queda ôhmica possibilitando estudos eletroquímicos de sistemas redox em solventes com elevada resistência ou na ausência de eletrólito suporte, a razão sinal/ruído em condições de estado estacionário é melhorada quando comparada com eletrodos de tamanho convencional. Estas diferenças do uso de eletrodos com dimensões muito pequenas são vantajosas em muitas áreas da química eletroanalítica. A partir da década de 1980, com os avanços na área de microeletrônica, foi possível medir variações de corrente muito pequenas com confiabilidade e

reprodutibilidade, o que ampliou o estudo e aplicação dos microeletrodos⁸⁰. A aplicação dos microeletrodos foi reforçada pelo aumento da demanda em química analítica, como por exemplo, a necessidade de pequenos eletrodos em células com alta sensibilidade de detecção ou em sensores eletroquímicos e também em bioquímica para realização de medidas eletroanalíticas *in situ* em organismos vivos¹²⁰.

Neste item do capítulo, serão apresentados os resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica para um arranjo de microeletrodos (*microarray*) para a detecção da hibridação de fragmentos de DNA não marcado. O sistema de microeletrodos foi desenvolvido no Laboratoire Interfaces et Systèmes Electrochimiques (LISE-CNRS) em Paris, França. Um *microarray* de DNA é um arranjo pré-definido de moléculas de DNA (fragmentos de DNA genômico ou oligonucleotídeos) quimicamente ligados a uma superfície sólida. Os *microarrays* são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos provenientes de amostras biológicas, por meio da hibridação do alvo complementar, geralmente marcado com uma molécula fluorescente, com a sonda de DNA fixada no suporte sólido (*array*).

O sistema desenvolvido consiste de três microeletrodos de ouro com 250 μm de espessura, fixos em um suporte de teflon como mostrado na Figura 4.27. O sistema foi utilizado para medidas de EIS com as três sondas e os três alvos complementares de DNA, visando distinguir entre alvos complementares e não complementares.

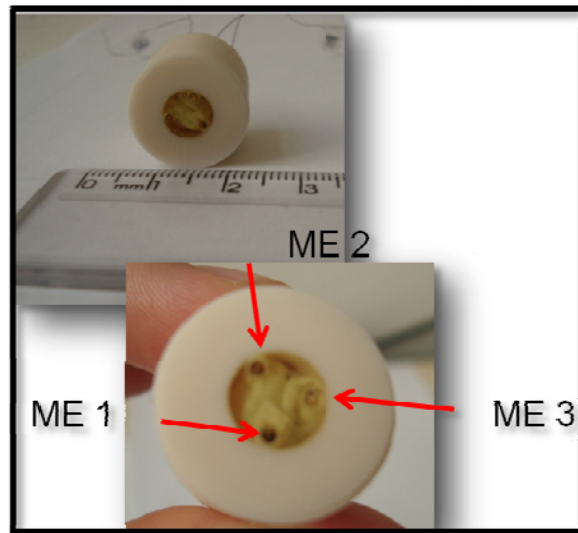


Figura 4.27 Arranjo de três microeletrodos de ouro de 250 μm cada desenvolvido no LISE-CNRS para medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica com DNA.

Com o formato miniaturizado do arranjo de microeletrodos desenvolvidos, pretendíamos observar a possibilidade de automação deste sistema podendo determinar simultaneamente diversos eventos de hibridação de moléculas de DNA diferentes. A portabilidade e um menor consumo de reagentes são algumas vantagens dos sistemas utilizando microeletrodos.

As medidas de EIS foram realizadas modificando-se a superfície de cada microeletrodo com uma sonda diferente, *Alexandrium taylori* (AT), *Alexandrium catanella* (AC) e *Alexandrium minutum* (AM). Após esta etapa, a cada microeletrodo foi adicionada a mesma sequência alvo AT, complementar apenas à sonda adicionada ao microeletrodo 1. As Figuras 4.28, 4.29 e 4.30 apresentam as medidas de EIS realizadas em cada um dos microeletrodos do arranjo construído.

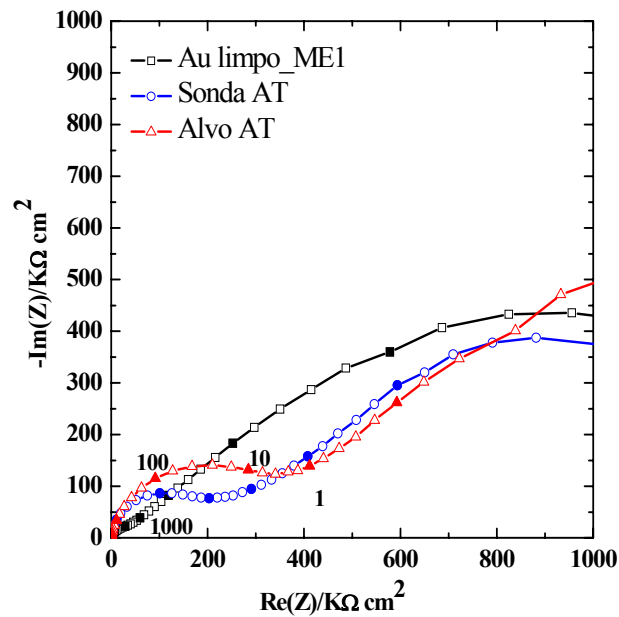


Figura 4.28. Gráfico de Nyquist para as medidas de EIS do Microeletrodo 1 nas seguintes condições: (—□—) Microeletrodo limpo; (—○—) Após imobilização da sonda AT, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—▽—) Após hibridação com molécula alvo AT complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 m mol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1\text{ m mol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

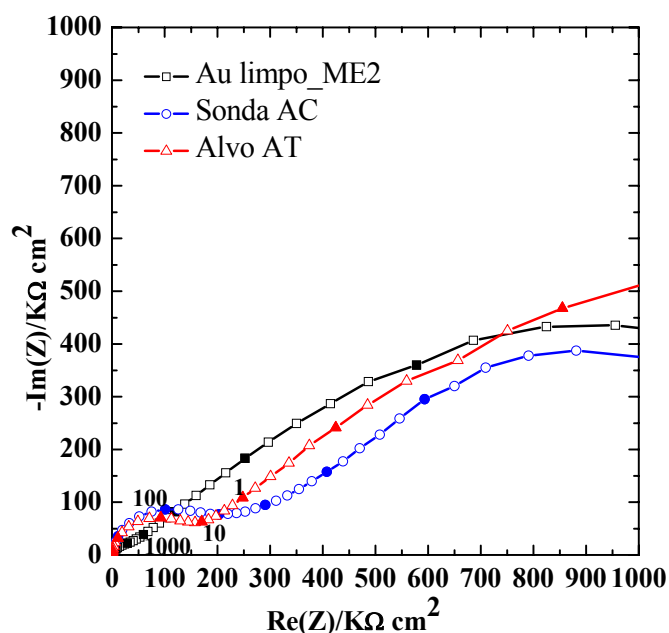


Figura 4.29. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica do Microeletrodo de ouro 2 nas seguintes condições: (—□—) Microeletrodo limpo; (—○—) Após imobilização da sonda AC, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—▽—) Após a hibridação com molécula alvo AT não complementar, $10\mu\text{g mL}^{-1}$. Solução $0,5\text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1\text{ mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

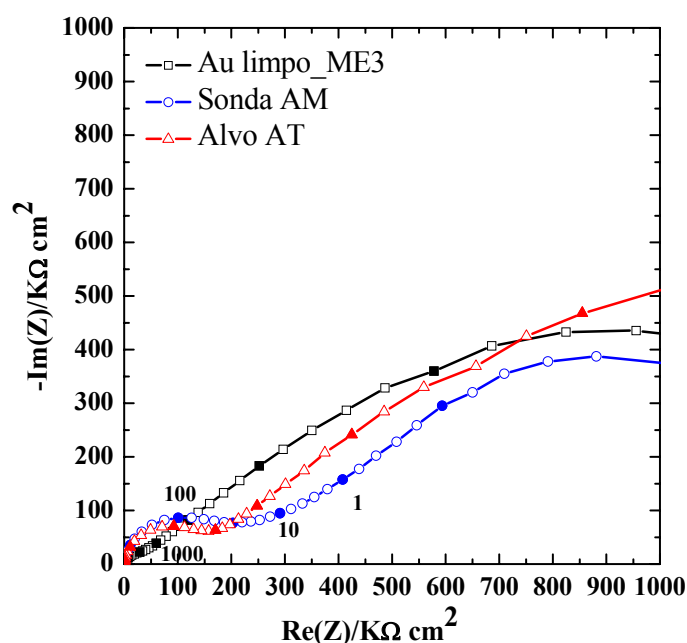


Figura 4.30. Medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica do Microeletrodo de ouro 3 nas seguintes condições: (—□—) Microeletrodo limpo; (—○—) Após imobilização da sonda AM, $10\mu\text{g mL}^{-1}$; (—▽—) Após hibridação com

molécula alvo AT não complementar, 10µg/mL. Solução 0,5 mol L⁻¹ de KNO₃ contendo 1 mmol L⁻¹ K₄Fe(CN)₆/1 mmol L⁻¹ K₃Fe(CN)₆

Os microarranjos de DNA, nos quais diferentes reações de hibridação são realizadas em paralelo, são normalmente usados para caracterização de amostras biológicas. Os biossensores são desenvolvidos para tarefas específicas, como a detecção de um pequeno número de sequências de um analito (DNA), com aquisição de dados, muitas vezes realizados em tempo real. A capacidade de discriminar entre uma fita dupla de DNA e uma fita simples é de extrema importância em biologia molecular básica e aplicada. Diferenciar a hibridação de uma fita de DNA com DNA ou com RNA complementar é importante para identificação de sequências de RNA viral e sequências de DNA humano. Estes experimentos confirmam a possibilidade de discriminar sondas e alvos com sequências diferentes, em um microarranjo, apresentando-se como uma promissora ferramenta para o desenvolvimento de biossensores de DNA ¹²¹.

4.3.4. Microscopia Eletroquímica de Varredura (SECM)

A microscopia eletroquímica de varredura opera pelo rastreamento de uma pequena sonda, um ultramicroeletrodo, sobre uma superfície a ser mapeada, cujo sinal é uma corrente gerada pela eletrólise das espécies químicas em solução. Contudo, duas características distinguem a microscopia eletroquímica das técnicas de microscopia de tunelamento e de força atômica e são elas, a sensibilidade química da sonda e o uso da transformação de íons ou moléculas em solução como sinal para formação da imagem ¹²². Nesta técnica, a atividade eletroquímica é medida por intermédio do fluxo de corrente que por sua vez está diretamente relacionada com a velocidade das reações de oxidação-redução.

Neste item do capítulo, serão apresentados os resultados obtidos com a técnica de SECM utilizando-se o cristal de quartzo como eletrodo de trabalho e um ultramicroeletrodo de 10 μm .

O UME empregado para monitorar o fluxo de corrente local é de platina com diâmetro de 10 μm . As medidas foram realizadas utilizando-se um sistema composto de três eletrodos, o mediador redox, ferricianeto/ferrocianeto de potássio, $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}]$ e uma solução de nitrato de potássio $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. O potencial adequado para ser utilizado nos experimentos de SEMC foi determinado por meio da voltametria cíclica do ultramicroeletrodo de platina, como mostra a Figura 4.31.

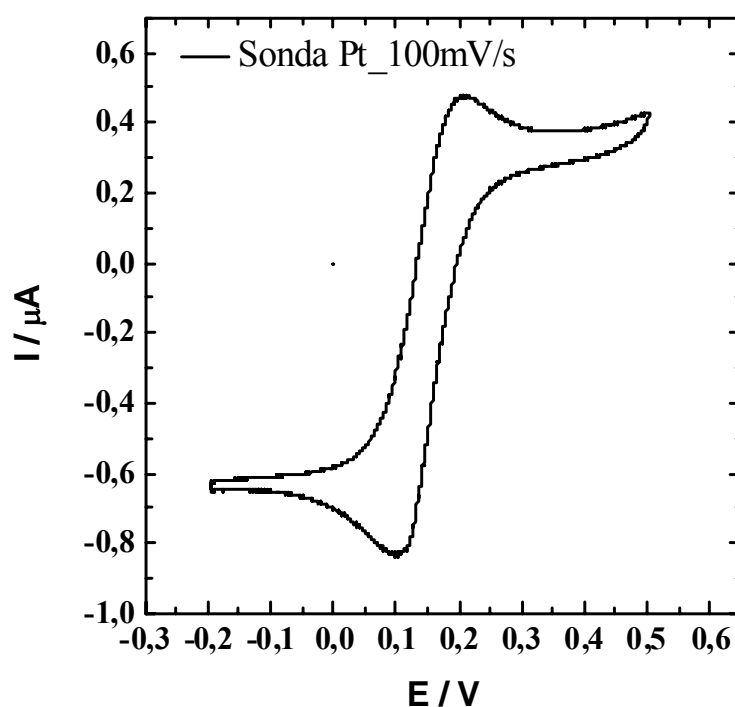


Figura 4.31. Voltamograma cíclico do UME de platina em solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 1 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. $v= 100 \text{ mV s}^{-1}$.

Utilizando-se o potencial adequado para a oxidação/redução do mediador redox (ferri/ferrocianeto), foram obtidas curvas de aproximação do cristal de quartzo após as etapas de modificação e hibridação das moléculas de DNA. A movimentação do ultramicroeletrodo em uma direção perpendicular à

superfície do cristal de quartzo permite traçar as curvas de aproximação que representam a variação de corrente da sonda de platina em função da distância sonda-substrato. A velocidade de aproximação do ultramicroeletrodo da superfície do substrato é controlada e medida em micrômetros por segundo.

Os gráficos das curvas de aproximação obtidas por meio da técnica de SECM são apresentados na forma adimensional, fazendo-se a corrente do microeletrodo normalizada I ($I=i/i_{\infty}$, a corrente do ultramicroeletrodo normalizada pela corrente limite à distância infinita do substrato) versus distância normalizada, d ($d=D/r$, distância ultramicroeletrodo-substrato normalizada pelo raio do ultramicroeletrodo). Uma vez que estes gráficos envolvem apenas variáveis adimensionais, eles não dependem da concentração e nem do coeficiente de difusão das espécies que reagem. A Figura 4.32 mostra uma curva de aproximação do cristal de quartzo após os procedimentos de limpeza.

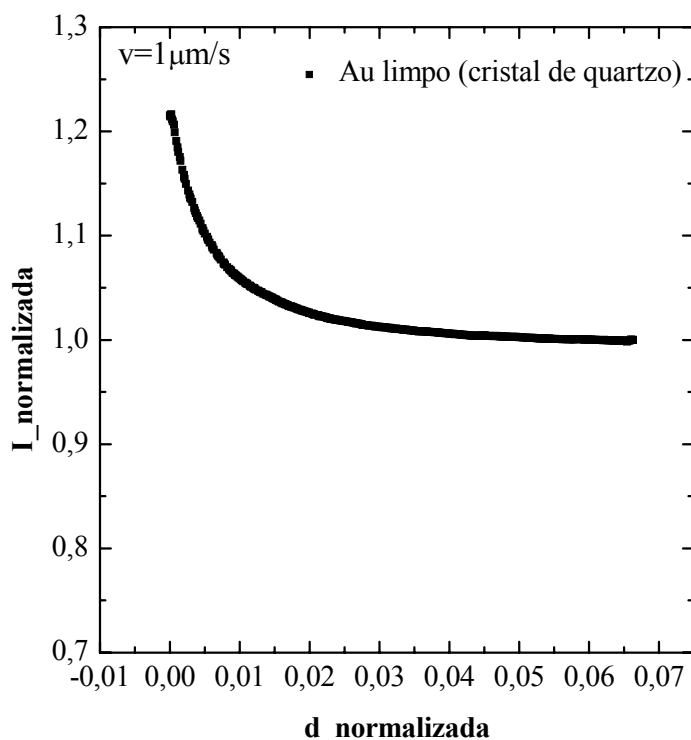


Figura 4.32. Curva de aproximação normalizada do UME-substrato (■). Solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo 1 mmol L^{-1} $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 1 mmol L^{-1} $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. $v= 1 \mu\text{m s}^{-1}$.

Nas curvas de aproximação, quando a sonda move-se em direção ao substrato, a corrente de difusão limitada pode aumentar ou diminuir, dependendo das propriedades de transferência de carga do substrato. Observa-se na Figura 4.32 que quando a sonda aproxima-se da superfície do substrato, há um aumento nos valores de corrente. Este comportamento é observado quando o substrato utilizado é condutor ou eletroquimicamente ativo. Neste caso, o metal depositado sobre a superfície do cristal de quartzo é um substrato condutor, e o mediador redox é, então reciclado na superfície do metal, tornando-se mais uma vez disponível a sofrer reações no ultramicroeletrodo. No limite, quando a distância entre ultramicroeletrodo e substrato se aproxima de zero, o ultramicroeletrodo está em um regime em que ocorre o tunelamento de elétrons e a corrente alcança valor muito elevado, como observado na Figura 4.32. Esta abordagem, na qual a ponta age como a fonte e o detector do mediador redox é denominado de imagem feedback, e a curva de aproximação apresentada na Figura 4.32 é chamada de “feedback positivo”, pois é obtida de um substrato condutor e/ou eletroquimicamente ativo. Da mesma maneira, a aproximação da sonda a superfície de um substrato isolante e/ou inerte, fornece uma curva de aproximação denominada de “feedback negativo”.

Foram realizadas diferentes curvas de aproximação do cristal de quartzo após as etapas de imobilização do DNA e hibridação. A Figura 4.33 mostra as curvas de aproximação para as etapas de imobilização de uma sonda de DNA e posterior hibridação com alvo complementar.

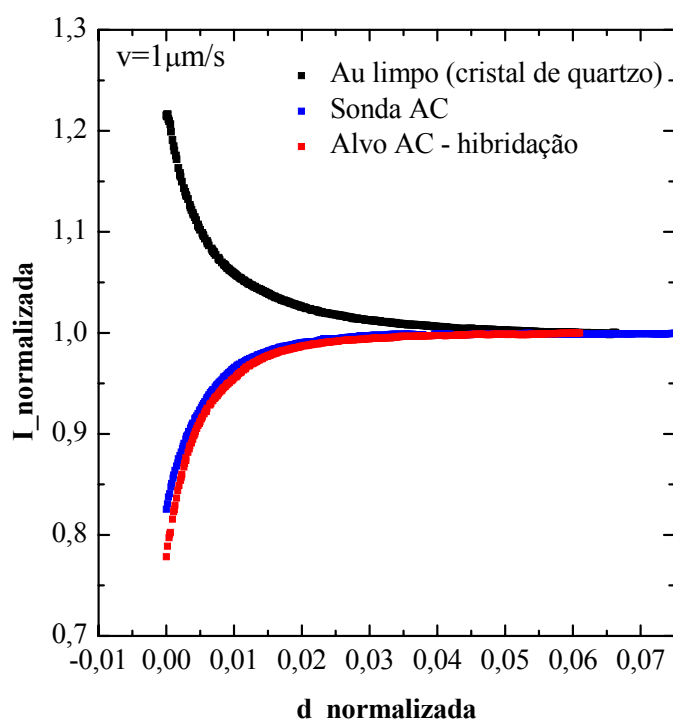


Figura 4.33. Curvas de aproximação normalizada do UME-substrato (cristal de quartzo) nas seguintes condições (■) cristal de quartzo limpo; (■) Após imobilização da sonda AC, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$; (■) Após hibridação com molécula alvo AC complementar, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo $1 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6/1 \text{ mmol L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. $v= 1 \mu\text{m s}^{-1}$.

Nas curvas de aproximação mostradas na Figura 4.33, observam-se dois comportamentos diferentes. O eletrodo limpo (curva na cor preta) apresenta um comportamento no modo “feedback positivo” e as curvas nas cores vermelha e azul, eletrodo modificado com a sonda de DNA e após a hibridação respectivamente, caracterizam o modo “feedback negativo”, observado em substratos isolantes ou eletroquimicamente inertes. As modificações do cristal de quartzo, pela imobilização e hibridação com o alvo complementar, bloqueiam fisicamente parte da difusão do par redox do seio da solução até a superfície do eletrodo resultando em uma diminuição da corrente. Quanto mais próximo o ultramicroeletrodo estiver do substrato, menor será o valor de corrente. No limite, quando a distância entre eles se aproximar de zero,

a corrente também se aproxima de zero. Quando o ultramicroeletrodo se aproxima deste substrato, a corrente diminui rapidamente com a distância pequena entre UME-substrato e os processos de transporte de carga tornam-se cada vez mais dificultados. A Figura 4.34, mostra um diagrama esquemático da aproximação da sonda (ultramicroeletrodo) à superfície do eletrodo modificado com a dupla fita de DNA (híbrido).

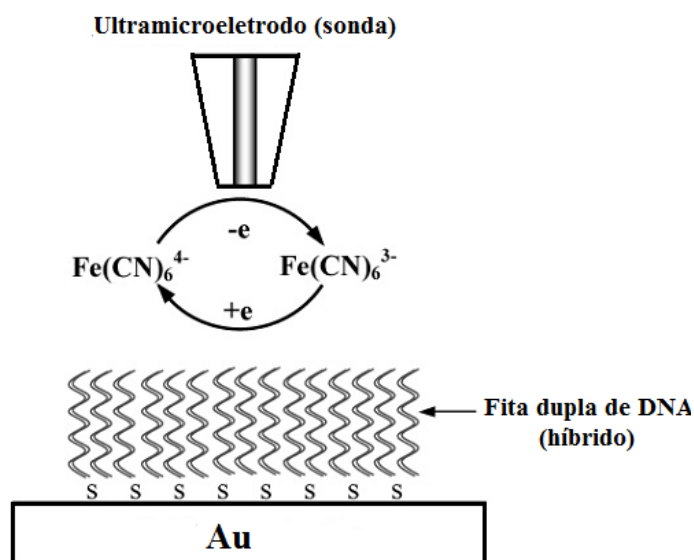


Figura 4.34. Diagrama esquemático das medidas de SECM para transferência de elétrons através da dupla fita de DNA. Figura adaptada do trabalho de BARD *et al.* ⁸².

As curvas de aproximação utilizando a técnica de SECM foram realizadas em diferentes velocidades de varredura ($\mu\text{m/s}$), após cada etapa da modificação do eletrodo, imobilização da sonda e hibridação com o alvo complementar. A Figura 4.35 A e B, mostram as curvas de aproximação para o eletrodo contendo a sonda AM e após a hibridação com o alvo AM complementar, respectivamente.

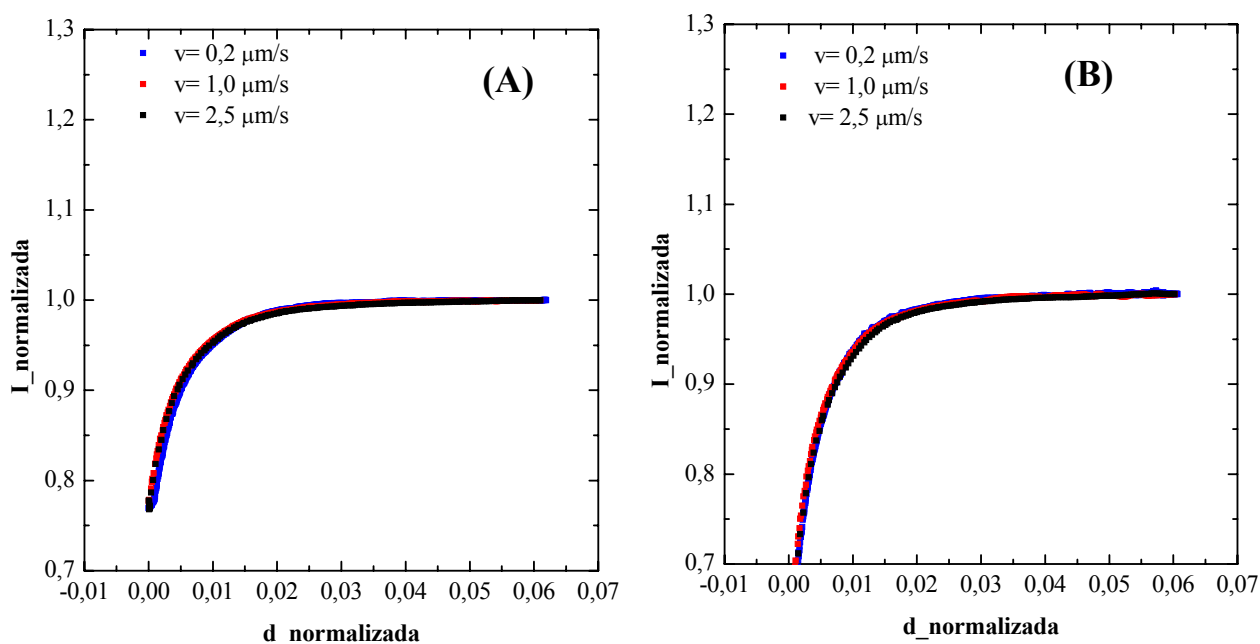


Figura 4.35. Curvas de aproximação normalizada do UME-substrato (cristal de quartzo) contendo: (A) Sonda AM imobilizada ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) e (B) Alvo AM ($10\mu\text{g mL}^{-1}$) em diferentes velocidades de varredura: (■) 0,2; (■) 1,0 e (■) $2,5\ \mu\text{m s}^{-1}$. Solução $0,5\ \text{mol L}^{-1}$ de KNO_3 contendo $1\ \text{mmol L}^{-1}$ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ / $1\ \text{mmol L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

As curvas de aproximação obtidas com diferentes velocidades de varredura tinham como objetivo estudar a cinética de transferência de carga entre as espécies redox e a superfície do substrato após as modificações do genossensor. O objetivo era a realização destas curvas em diferentes concentrações da sonda e do alvo complementar e aplicando-se diferentes potenciais de oxidação/redução. Entretanto, por ser uma técnica nova no desenvolvimento de biossensores de DNA, e pelo extenso trabalho realizado na confecção de células eletroquímicas e microeletrodos, as medidas com a técnica de SECM não puderam ser concluídas.

Com base nos resultados preliminares obtidos com a técnica de SECM, pode-se identificar a imobilização da sonda de DNA e sua hibridação com o alvo de sequência complementar. Estes resultados confirmam àqueles obtidos com as demais técnicas utilizadas neste trabalho, microbalança de

cristal de quartzo, voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. A técnica de SECM possui grande sensibilidade devido a sua resolução espacial e por isso um dos objetivos do seu uso durante o desenvolvimento deste trabalho era detecção da hibridação de DNA na forma de microarranjos (item 4.3.2.1, p. 98). Alguns trabalhos encontrados na literatura apresentam resultados mostrando que estes sistemas podem ser uma alternativa aos sistemas clássicos de análise de hibridação por fluorescência¹²³⁻¹²⁴.

Capítulo 5

Conclusões

Os estudos visando o desenvolvimento de genossensores para determinação de algas tóxicas utilizando as técnicas de microbalança de cristal de quartzo e técnicas eletroquímicas apresentaram resultados bastante interessantes e que podem levar ao desenvolvimento de dispositivos sensores para a determinação e monitoramento de algas em regiões costeiras.

Os resultados obtidos com a técnica de microbalança de cristal de quartzo operando no terceiro harmônico (27 MHz) apresentaram excelente resultados para a determinação das etapas de imobilização das sondas de DNA e hibridação, com ótima reprodutibilidade. Além disso, foi possível por meio da técnica um estudo da cinética de hibridação de moléculas de DNA com diferentes números de bases nitrogenadas, avaliando-se também a não interferência de bases não complementares no processo de hibridação. O uso de uma solução contendo NaOH e NaCl, permitiu a regeneração do genossensor sendo possível a sua reutilização e hibridações consecutiva com moléculas de diferentes complementaridades a sonda de DNA imobilizada sobre o eletrodo.

Os espectros de impedância e estudos de voltametria mostraram diferenças entre a modificação da superfície com a sonda imobilizada e o evento de hibridação, concordando com os resultados obtidos com a técnica de microbalança de cristal de quartzo. A partir desses experimentos, concluí-se que a orientação das moléculas de DNA na superfície do eletrodo é um fator importante para maximizar a eficiência de hibridação. Os resultados demonstraram também que um maior controle sobre a cobertura da superfície pela sonda de DNA pode ser alcançado por meio do uso de um tiol de cadeia curta, o 6-mercaptop 1-hexanol. O uso deste reagente mostrou-se responsável pelo aumento na eficiência da hibridação observada nos experimentos utilizando as técnicas de microbalança de cristal de quartzo e espectroscopia de impedância eletroquímica.

O emprego da técnica SECM para estudar eventos de hibridação mostrou-se extremamente atraente, pois por meio de informações sobre o fluxo

de íons relacionado a reações na superfície do eletrodo, pode-se identificar as etapas de imobilização e hibridação de sequências complementares de DNA.

O uso de arranjos de microeletrodos para o desenvolvimento de genossensores apresenta-se como uma perspectiva futura bastante interessante, devido ao baixo nível de detecção e o baixo consumo de reagentes. Os resultados preliminares obtidos com os microarranjos para detecção de DNA utilizando-se a técnica de EIS, possibilitaram a distinção entre diferentes sondas e seus respectivos alvos complementares.

Os diferentes métodos utilizados para o desenvolvimento de biossensores de DNA apresentaram vantagens em relação aos métodos clássicos, como a não necessidade do uso de marcadores fluorescentes ou radioativos. Isto permitiu monitorar diretamente os eventos de imobilização e hibridação que podem ser utilizados para os mais diversos diagnósticos incluindo os clínicos.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

1. BROOKES, A.J. "The essence of SNPs". *Gene*. **234**(2): p. 177, 1999.
2. DRUMMOND, T.G.;HILL, M.G. & BARTON, J.K. "Electrochemical DNA sensors". *Nat. Biotechnol.* **21**(10): p. 1192, 2003.
3. SOUTHERN, E.M. "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis". *Journal of Molecular Biology*. **98**(3): p. 503, 1975.
4. TOWERY, R.B.;FAWCETT, N.C.;ZHANG, P. & EVANS, J.A. "Genomic DNA hybridizes with the same rate constant on the QCM biosensor as in homogeneous solution". *Biosens. Bioelectron.* **16**(1-2): p. 1, 2001.
5. CAMPAS, M. & KATAKIS, I. "DNA biochip arraying, detection and amplification strategies". *Trac-Trends Anal. Chem.* **23**(1): p. 49, 2004.
6. PETERLINZ, K.A.;GEORGIADIS, R.M.;HERNE, T.M. & TARLOV, M.J. "Observation of hybridization and dehybridization of thiol-tethered DNA using two-color surface plasmon resonance spectroscopy". *J. Am. Chem. Soc.* **119**(14): p. 3401, 1997.
7. OKAHATA, Y.;NIIKURA, K.;FURUSAWA, H. & MATSUNO, H. "A highly sensitive 27 MHz quartz-crystal microbalance as a device for kinetic measurements of molecular recognition on DNA strands". *Analytical Sciences*. **16**(11): p. 1113, 2000.
8. GALLUZZI, L.;PENNA, A.;BERTOZZINI, E.;VILA, M.;GARCES, E. & MAGNANI, M. "Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a dinoflagellate)". *Applied and Environmental Microbiology*. **70**(2): p. 1199, 2004.
9. PENNA, A. & MAGNANI, M. "Identification of *Alexandrium* (Dinophyceae) species using PCR and rDNA-targeted probes". *Journal of Phycology*. **35**(3): p. 615, 1999.
10. GALLUZZI, L.;BERTOZZINI, E.;PENNA, A.;PERINI, F.;GARCES, E. & MAGNANI, M. "Analysis of rRNA gene content in the Mediterranean dinoflagellate *Alexandrium catenella* and *Alexandrium taylori*: implications for the quantitative real-time PCR-based monitoring methods". *Journal of Applied Phycology*. **22**(1): p. 1, 2010.
11. GIACOBBE, M.G. & YANG, X.M. "The life history of *Alexandrium taylori* (Dinophyceae)". *Journal of Phycology*. **35**(2): p. 331, 1999.

12. HOWELL, W.M.; JOBS, M.; GYLLENSTEN, U. & BROOKES, A.J. "Dynamic allele-specific hybridization - A new method for scoring single nucleotide polymorphisms". *Nat. Biotechnol.* **17**(1): p. 87, 1999.
13. LEVICKY, R. & HORGAN, A. "Physicochemical perspectives on DNA microarray and biosensor technologies". *Trends in Biotechnology.* **23**(3): p. 143, 2005.
14. ERICKSON, D.; LI, D.Q. & KRULL, U.J. "Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips". *Analytical Biochemistry.* **317**(2): p. 186, 2003.
15. SU, H.B. & THOMPSON, M. "Kinetics of interfacial nucleic-acid hybridization studied by acoustic network analysis". *Biosens. Bioelectron.* **10**(3-4): p. 329, 1995.
16. GAO, Y.; WOLF, L.K. & GEORGIADIS, R.M. "Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison". *Nucleic Acids Res.* **34**(11): p. 3370, 2006.
17. ZENG, J.; ALMADIDY, A.; WATTERSON, J. & KRULL, U.K. "Interfacial hybridization kinetics of oligonucleotides immobilized onto fused silica surfaces". *Sens. Actuator B-Chem.* **90**(1-3): p. 68, 2003.
18. JENG, E.S.; BARONE, P.W.; NELSON, J.D. & STRANO, M.S. "Hybridization kinetics and thermodynamics of DNA adsorbed to individually dispersed single-walled carbon nanotubes". *Small.* **3**(9): p. 1602, 2007.
19. VALCARCEL, M. & RIOS, A. "Reliability of analytical information in the XXIst century". *Anal. Chim. Acta.* **400**: p. 425, 1999.
20. ZHANG, S.; WRIGHT, G. & YANG, Y. "Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction". *Biosens. Bioelectron.* **15**(5-6): p. 273, 2000.
21. VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. "Recent advances in petroleum microbiology". *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **67**(4): p. 503, 2003.
22. GOODING, J.J. "Electrochemical DNA hybridization biosensors". *Electroanalysis.* **14**(17): p. 1149, 2002.
23. LEVICKY, R.; HERNE, T.M.; TARLOV, M.J. & SATIJA, S.K. "Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study". *J. Am. Chem. Soc.* **120**(38): p. 9787, 1998.

24. RODRIGUEZ-MOZAZ, S.;DE ALDA, M.J.L.;MARCO, M.P. & BARCELO, D. "Biosensors for environmental monitoring - A global perspective". *Talanta*. **65**(2): p. 291, 2005.
25. MANNELLI, I.;MINUNNI, M.;TOMBELLI, S. & MASCINI, M. "Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection". *Biosens. Bioelectron.* **18**(2-3): p. 129, 2003.
26. PIRO, B.;HACCOUN, J.;PHAM, M.C.;TRAN, L.D.;RUBIN, A.;PERROT, H. & GABRIELLI, C. "Study of the DNA hybridization transduction behavior of a quinone-containing electroactive polymer by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy". *J. Electroanal. Chem.* **577**(1): p. 155, 2005.
27. DAMOS, F.S.;LUZ, R.C.S. & KUBOTA, L.T. "Determination of thickness, dielectric constant of thiol films, and kinetics of adsorption using surface plasmon resonance". *Langmuir*. **21**(2): p. 602, 2005.
28. SANCHEZ-POMALES, G. & CABRERA, C.R. "Vertical attachment of DNA-CNT hybrids on gold". *J. Electroanal. Chem.* **606**(1): p. 47, 2007.
29. FERREIRA, A.A.P. & YAMANAKA, H. "Microscopia de força atômica aplicada a imunoensaios". *Química Nova*. **29**(1): p. 137, 2005.
30. PEDROSO, M.M.;WATANABE, A.M.;ROQUE-BARREIRA, M.C.;BUENO, P.R. & FARIA, R.C. "Quartz Crystal Microbalance monitoring the real-time binding of lectin with carbohydrate with high and low molecular mass". *Microchemical Journal*. **89**(2): p. 153, 2008.
31. BARDEA, A.;DAGAN, A. & WILLNER, I. "Amplified electronic transduction of oligonucleotide interactions: novel routes for Tay-Sachs biosensors". *Anal. Chim. Acta*. **385**(1-3): p. 33, 1999.
32. MO, X.T.;ZHOU, Y.P.;LEI, H. & DENG, L. "Microbalance-DNA probe method for the detection of specific bacteria in water". *Enzyme Microb. Technol.* **30**(5): p. 583, 2002.
33. POPE, L.H.;ALLEN, S.;DAVIES, M.C.;ROBERTS, C.J.;TENDLER, S.J.B. & WILLIAMS, P.M. "Probing DNA duplex formation and DNA-drug interactions by the quartz crystal microbalance technique". *Langmuir*. **17**(26): p. 8300, 2001.
34. OKAHATA, Y.;NIKURA, K.;SUGIURA, Y.;SAWADA, M. & MORII, T. "Kinetic studies of sequence-specific binding of GCN4-bZIP peptides

- to DNA strands immobilized on a 27-MHz quartz-crystal microbalance". *Biochemistry*. **37**(16): p. 5666, 1998.
35. SU, X.D.;ROBELEK, R.;WU, Y.J.;WANG, G.Y. & KNOLL, W. "Detection of point mutation and insertion mutations in DNA using a quartz crystal microbalance and MutS, a mismatch binding protein". *Anal. Chem.* **76**(2): p. 489, 2004.
 36. HIANIK, T.;OSTATNA, V. & ZAJACOVA, Z. "The study of the binding of globular proteins to DNA using mass detection and electrochemical indicator methods". *J. Electroanal. Chem.* **564**(1-2): p. 19, 2004.
 37. ZHANG, H.;TAN, H.W.;WANG, R.H.;WEI, W.Z. & YAO, S.Z. "Immobilization of DNA on silver surface of bulk acoustic wave sensor and its application to the study of UV-C damage". *Anal. Chim. Acta.* **374**(1): p. 31, 1998.
 38. LAZERGES, M.;PERROT, H.;RABEHAGASOA, N.;ANTOINE, E. & COMPERE, C. "45-and 70-base DNA supramolecular polymerizations on quartz crystal microbalance biosensor". *Chem. Commun.*, (48): p. 6020, 2005.
 39. BUNDE, R.L.;JARVI, E.J. & ROSENTERETER, J.J. "Piezoelectric quartz crystal biosensors". *Talanta*. **46**: p. 1223, 1998.
 40. LIN, Z. & WARD, M.D. "The Role of Longitudinal Waves in Quartz Crystal Microbalance Applications in Liquids". *Anal. Chem.* **67**(4): p. 685, 1995.
 41. MARX, K.A. "Quartz crystal microbalance: A useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface". *Biomacromolecules*. **4**(5): p. 1099, 2003.
 42. BUND, A. & SCHWITZGEBEL, G. "Signal Oscillations of a Piezoelectric Quartz Crystal in Liquids Caused by Compressional Waves". *Anal. Chim. Acta.* **364**: p. 189, 1998.
 43. RUYS, D.P.;ANDRADE, J.F. & GUIMARÃES, O.M. "Mercury detection in air a coated piezoeletric sensor". *Anal. Chim. Acta.* **404**: p. 95, 2000.
 44. MANGANIELLO, L.;RÍOS, A. & VALCÁRCEL, M. "Automatic determination of fat in milk by use of a flow injection system with a piezoeltric detector". *Anal. Chim. Acta.* **406**: p. 309, 2000.

45. GUILBAULT, G.G.;HOCK, B. & SCHMID, R. "A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water". *Biosens. Bioelectron.* **7**: p. 411, 1992.
46. KOBLINGER, C.;DROST, S.;ALBERT, F.;WOLF, S.;KOCK, S. & WOIAS, P. "A quartz crystal biosensor for measurement in liquids". *Biosens. Bioelectron.* **7**: p. 397, 1992.
47. PRODROMIDIS, M.I. "Impedimetric immunosensors-A review". *Electrochimica Acta.* **55**(14): p. 4227, 2010.
48. PEI, Z.;ANDERSON, H.;AASTRUP, T. & RAMSTROM, O. "Study of real-time lectin-carbohydrate interactions on the surface of a quartz crystal microbalance". *Biosens. Bioelectron.* **21**: p. 60, 2005.
49. TOMBELLI, S.;MINUNNI, M. & MASCINI, M. "Piezoelectric biosensors: Strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices". *Methods.* **37**(1): p. 48, 2005.
50. HOOK, F.;RAY, A.;NORDEN, B. & KASEMO, B. "Characterization of PNA and DNA immobilization and subsequent hybridization with DNA using acoustic-shear-wave attenuation measurements". *Langmuir.* **17**(26): p. 8305, 2001.
51. WILLNER, I.;PATOLSKY, F.;WEIZMANN, Y. & WILLNER, B. "Amplified detection of single-base mismatches in DNA using micro gravimetric quartz-crystal-microbalance transduction". *Talanta.* **56**(5): p. 847, 2002.
52. HUANG, G.S.;WANG, M.T. & HONG, M.Y. "A versatile QCM matrix system for online and high-throughput bio-sensing". *Analyst.* **131**(3): p. 382, 2006.
53. LAZERGES, M.;PERROT, H.;ZEGHIB, N.;ANTOINE, E. & COMPERE, C. "In situ QCM DNA-biosensor probe modification". *Sens. Actuator B-Chem.* **120**(1): p. 329, 2006.
54. BUTTRY, D.A. & WARD, M.D. "Measurement of Interfacial Processes at Electrode Surfaces with the Electrochemical Quartz Crystal Microbalance". *Chemical Reviews.* **92**(6): p. 1355, 1992.
55. CHO, Y.K.;KIM, S.;KIM, Y.A.;LIM, H.K.;LEE, K.;YOON, D.S.;LIM, G.;PAK, Y.E.;HA, T.H. & KIM, K. "Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization using in situ quartz crystal microbalance, fluorescence spectroscopy, and surface plasmon

- resonance". *Journal of Colloid and Interface Science*. **278**(1): p. 44, 2004.
56. KIM, G.H.; RAND, A.G. & LETCHER, S.V. "Impedance characterization of a piezoelectric immunosensor Part I: Antibody coating and buffer solution". *Biosens. Bioelectron*. **18**(1): p. 83, 2003.
57. LARICCHIA-ROBBIO, L. & REVOLTELLA, R.P. "Comparison between the surface plasmon resonance (SPR) and the quartz crystal microbalance (QCM) method in a structural analysis of human endothelin-1". *Biosens. Bioelectron*. **19**(12): p. 1753, 2004.
58. CARUSO, F.; RODDA, E. & FURLONG, D.N. "Orientational aspects of antibody immobilization and immunological activity on quartz crystal microbalance electrodes". *Journal of Colloid and Interface Science*. **178**(1): p. 104, 1996.
59. COFFEY, T.; ABDELMAKSoud, M. & KRIM, J. "A scanning probe and quartz crystal microbalance study of the impact of C-60 on friction at solid-liquid interfaces". *Journal of Physics-Condensed Matter*. **13**(21): p. 4991, 2001.
60. KRISTENSEN, E.M.E.; RENSMO, H.; LARSSON, R. & SIEGBAHN, H. "Characterization of heparin surfaces using photoelectron spectroscopy and quartz crystal microbalance". *Biomaterials*. **24**(23): p. 4153, 2003.
61. PIUNNO, P.A.E.; KRULL, U.J.; HUDSON, R.H.E.; DAMHA, M.J. & COHEN, H. "Fiberoptic DNA sensor for fluometric nucleic acid determination". *Anal. Chem*. **67**(15): p. 2635, 1995.
62. MARTINEZ-PAREDES, G.; GONZALEZ-GARCIA, M.B. & COSTA-GARCIA, A. "Genosensor for detection of four pneumoniae bacteria using gold nanostructured screen-printed carbon electrodes as transducers". *Sens. Actuator B-Chem*. **149**(2): p. 329, 2010.
63. AUFFAN, M.; ROSE, J.; BOTTERO, J.Y.; LOWRY, G.V.; JOLIVET, J.P. & WIESNER, M.R. "Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective". *Nat. Nanotechnol*. **4**(10): p. 634, 2009.
64. DELUMLEYWOODYEAR, T.; CAMPBELL, C.N. & HELLER, A. "Direct enzyme-amplified electrical recognition of a 30-base model oligonucleotide". *J. Am. Chem. Soc*. **118**(23): p. 5504, 1996.

65. IHARA, T.;NAKAYAMA, M.;MURATA, M.;NAKANO, K. & MAEDA, M. "Gene sensor using ferrocenyl oligonucleotide". *Chem. Commun.*, (17): p. 1609, 1997.
66. KERTESZ, V.;WHITTEMORE, N.A.;INAMATI, G.B.;MANOHARAN, M.;COOK, P.D.;BAKER, D.C. & CHAMBERS, J.Q. "Electrochemical Detection of Surface Hybridization of Oligodeoxynucleotides Bearing Anthraquinone Tags at Gold Electrodes". *Electroanalysis*. **12**(12): p. 889, 2000.
67. KERMAN, K.;KOBAYASHI, M. & TAMIYA, E. "Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology". *Meas. Sci. Technol.* **15**(2): p. R1, 2004.
68. ZHANG, Z.L.;PANG, D.W.;YUAN, H.;CAI, R.X. & ABRUNA, H. "Electrochemical DNA sensing based on gold nanoparticle amplification". *Anal. Bioanal. Chem.* **381**(4): p. 833, 2005.
69. PUMERA, M.;WANG, J.;GRUSHKA, E. & POLSKY, R. "Gold nanoparticle-enhanced microchip capillary electrophoresis". *Anal. Chem.* **73**(22): p. 5625, 2001.
70. YANG, T.L.;JUNG, S.Y.;MAO, H.B. & CREMER, P.S. "Fabrication of phospholipid bilayer-coated microchannels for on-chip immunoassays". *Anal. Chem.* **73**(2): p. 165, 2001.
71. DOMINGUEZ, E.;RINCON, O. & NARVAEZ, A. "Electrochemical DNA sensors based on enzyme dendritic architectures: An approach for enhanced sensitivity". *Anal. Chem.* **76**(11): p. 3132, 2004.
72. CARPINI, G.;LUCARELLI, F.;MARRAZZA, G. & MASCINI, M. "Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids". *Biosens. Bioelectron.* **20**(2): p. 167, 2004.
73. KATZ, E. & WILLNER, I. "Probing biomolecular interactions at conductive and semiconductive surfaces by impedance spectroscopy: Routes to impedimetric immunosensors, DNA-Sensors, and enzyme biosensors". *Electroanalysis*. **15**(11): p. 913, 2003.
74. RAPP, B.E.;GRUHL, F.J. & LANGE, K. "Biosensors with label-free detection designed for diagnostic applications". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **398**(6): p. 2403, 2010.

75. YU, D.H.;BLANKERT, B.;VIRE, J.C. & KAUFFMANN, J.M. "Biosensors in drug discovery and drug analysis". *Anal. Lett.* **38**(11): p. 1687, 2005.
76. GABRIELL. C & KEDDAM, M. "Recent advances in measurement of Electrochemical impedance in sinusoidal system". *Electrochimica Acta.* **19**(7): p. 355, 1974.
77. BARDEA, A.;PATOLSKY, F.;DAGAN, A. & WILLNER, I. "Sensing and amplification of oligonucleotide-DNA interactions by means of impedance spectroscopy: a route to a Tay-Sachs sensor". *Chem. Commun.*, (1): p. 21, 1999.
78. BOGOMOLOVA, A.;KOMAROVA, E.;REBER, K.;GERASIMOV, T.;YAVUZ, O.;BHATT, S. & ALDISSI, M. "Challenges of Electrochemical Impedance Spectroscopy in Protein Biosensing". *Anal. Chem.* **81**(10): p. 3944, 2009.
79. MANICKAM, A.;CHEVALIER, A.;MCDERMOTT, M.;ELLINGTON, A.D. & HASSIBI, A. "A CMOS Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) Biosensor Array". *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **4**(6): p. 379, 2010.
80. STULIK, K.;AMATORE, C.;HOLUB, K.;MARECEK, V. & KUTNER, W. "Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications (Technical Report)". *Pure and Applied Chemistry.* **72**(8): p. 1483, 2000.
81. BARD, A.J. "New Challenges in Electrochemistry and Electroanalysis". *Pure and Applied Chemistry.* **64**(2): p. 185, 1992.
82. BARD, A.J.;LI, X. & ZHAN, W. "Chemically imaging living cells by scanning electrochemical microscopy". *Biosens. Bioelectron.* **22**(4): p. 461, 2006.
83. GABRIELLI, C.;HUET, F.;KEDDAM, M.;ROUSSEAU, P. & VIVIER, V. "Scanning electrochemical microscopy imaging by means of high-frequency impedance measurements in feedback mode". *Journal of Physical Chemistry B.* **108**(31): p. 11620, 2004.
84. GABRIELLI, C.;JOIRET, S.;KEDDAM, M.;PERROT, H.;PORTAIL, N.;ROUSSEAU, P. & VIVIER, V. "Development of a coupled SECM-EQCM technique for the study of pitting corrosion on iron". *J. Electrochem. Soc.* **153**(3): p. B68, 2006.
85. BARD, A.J.;MIRKIN, M.V.;UNWIN, P.R. & WIPF, D.O. "Scanning Electrochemical Microscopy .12. Theory and Experiment of the

- Feedback Mode with Finite Heterogeneous Electron-Transfer Kinetics and Arbitrary Substrate Size". *Journal of Physical Chemistry*. **96**(4): p. 1861, 1992.
86. HUANG, V.M.W.;VIVIER, V.;ORAZEM, M.E.;PEBERE, N. & TRIBOLLET, B. "The apparent constant-phase-element behavior of a disk electrode with faradaic reactions - A global and local impedance analysis". *J. Electrochem. Soc.* **154**(2): p. C99, 2007.
87. LEE, T.Y. & SHIM, Y.B. "Direct DNA hybridization detection based on the oligonucleotide-functionalized conductive polymer". *Analytical Chemistry*. **73**(22): p. 5629, 2001.
88. BURKE, L.D. & O'MULLANE, A.P. "Generation of active surface states of gold and the role of such states in electrocatalysis". *Journal of Solid State Electrochemistry*. **4**(5): p. 285, 2000.
89. CARVALHAL, R.T.;FREIRE, R.S. & KUBOTA, L.T. "Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation". *Electroanalysis*. **17**(14): p. 1251, 2005.
90. GABRIELLI, C.;KEDDAM, M.;PORTAIL, N.;ROUSSEAU, P.;TAKENOUTI, H. & VIVIER, V. "Electrochemical impedance spectroscopy investigations of a microelectrode behavior in a thin-layer cell: Experimental and theoretical studies". *J. Phys. Chem. B*. **110**(41): p. 20478, 2006.
91. FERNANDEZ, J.L. & BARD, A.J. "Scanning electrochemical microscopy. 47. Imaging electrocatalytic activity for oxygen reduction in an acidic medium by the tip generation-substrate collection mode". *Anal. Chem.* **75**(13): p. 2967, 2003.
92. CAUDILL, W.L.;HOWELL, J.O. & WIGHTMAN, R.M. "Flow-rate independent amperometric cell". *Anal. Chem.* **54**(14): p. 2532, 1982.
93. KATEMANN, B.B. & SCHUHMANN, T. "Fabrication and characterization of needle-type Pt-disk nanoelectrodes". *Electroanalysis*. **14**(1): p. 22, 2002.
94. PAIXÃO, T.R.L.C. & BERTOTTI, M. "Métodos para fabricação de microeletrodos visando a detecção em microambientes". *Química Nova*. **32**(5): p. 1306, 2009.

95. FAWCETT, N.C.;EVANS, J.A.;CHIEN, L.C. & FLOWERS, N. "Nucleic-Acid Hybridization Detected by Piezoelectric Resonance". *Anal. Lett.* **21**(7): p. 1099, 1988.
96. OKAHATA, Y.;MATSUNOBU, Y.;IJIRO, K.;MUKAE, M.;MURAKAMI, A. & MAKINO, K. "Hybridization of Nucleic-Acids Immobilized on a Quartz Crystal Microbalance". *J. Am. Chem. Soc.* **114**(21): p. 8299, 1992.
97. YAMAGUCHI, S.;SHIMOMURA, T.;TATSUMA, T. & OYAMA, N. "Adsorption, Immobilization, and Hybridization of DNA Studied by the Use of Quartz-Crystal Oscillators". *Anal. Chem.* **65**(14): p. 1925, 1993.
98. MANNELLI, F.;MINUNNI, A.;TOMBELLI, S.;WANG, R.H.;SPIRITI, M.M. & MASCINI, M. "Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors". *Bioelectrochemistry.* **66**(1-2): p. 129, 2005.
99. ZHOU, X.C.;HUANG, L.Q. & LI, S.F.Y. "Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis". *Biosens. Bioelectron.* **16**(1-2): p. 85, 2001.
100. HA, T.H.;KIM, S.;LIM, G. & KIM, K. "Influence of liquid medium and surface morphology on the response of QCM during immobilization and hybridization of short oligonucleotides". *Biosens. Bioelectron.* **20**(2): p. 378, 2004.
101. HANG, T.C. & GUISEPPI-ELIE, A. "Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization". *Biosens. Bioelectron.* **19**(11): p. 1537, 2004.
102. GHEORGHE, M. & GUISEPPI-ELIE, A. "Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization". *Biosens. Bioelectron.* **19**(2): p. 95, 2003.
103. DUPONT-FILLIARD, A.;BILLON, M.;LIVACHE, T. & GUILLEREZ, S. "Biotin/avidin system for the generation of fully renewable DNA sensor based on biotinylated polypyrrole film". *Anal. Chim. Acta.* **515**(2): p. 271, 2004.
104. STORRI, S.;SANTONI, T. & MASCINI, M. "A piezoelectric biosensor for DNA hybridisation detection". *Anal. Lett.* **31**(11): p. 1795, 1998.
105. TOMBELLI, S.;MASCINI, R.;BRACCINI, L.;ANICHINI, M. & TURNER, A.P.F. "Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and

- polymerase chain reaction to detect apolipoprotein E polymorphisms". *Biosens. Bioelectron.* **15**(7-8): p. 363, 2000.
106. NIIKURA, K.;MATSUNO, H. & OKAHATA, Y. "Direct monitoring of DNA polymerase reactions on a quartz-crystal microbalance". *J. Am. Chem. Soc.* **120**(33): p. 8537, 1998.
107. STENGEL, G.;HOOK, F. & KNOLL, W. "Viscoelastic modeling of template-directed DNA synthesis". *Anal. Chem.* **77**(11): p. 3709, 2005.
108. HUANG, E.;SATJAPIPAT, M.;HAN, S.B. & ZHOU, F.M. "Surface structure and coverage of an oligonucleotide probe tethered onto a gold substrate and its hybridization efficiency for a polynucleotide target". *Langmuir.* **17**(4): p. 1215, 2001.
109. BIZET, K.;GABRIELLI, C. & PERROT, H. "Immunodetection by quartz crystal microbalance - A new approach for direct detection of rabbit IgG and peroxidase". *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **89**(2-3): p. 139, 2000.
110. LAZERGES, M.;PERROT, H.;ZEGHIB, N.;ANTOINE, E. & COMPERE, C. "In situ QCM DNA-biosensor probe modification". *Sensors and Actuators B: Chemical.* **120**(1): p. 329, 2006.
111. LAZERGES, M.;PERROT, H.;ANTOINE, E.;DEFONTAINE, A. & COMPERE, C. "Oligonucleotide quartz crystal microbalance sensor for the microalgae *Alexandrium minutum* (Dinophyceae)". *Biosens. Bioelectron.* **21**(7): p. 1355, 2006.
112. WONG, E.L.S.;CHOW, E. & GOODING, J.J. "DNA recognition interfaces: the influence of interfacial design on the efficiency and kinetics of hybridization ". *Langmuir.* **21**: p. 6957, 2005.
113. KAFKA, J.;PANKE, O.;ABENDROTH, B. & LISDAT, F. "A label-free DNA sensor based on impedance spectroscopy". *Electrochimica Acta.* **53**(25): p. 7467, 2008.
114. STEEL, A.B.;LEVICKY, R.L.;HERNE, T.M. & TARLOV, M.J. "Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly". *Biophysical Journal.* **79**(2): p. 975, 2000.
115. YANG, M.S.;YAU, H.C.M. & CHAN, H.L. "Adsorption kinetics and ligand-binding properties of thiol-modified double-stranded DNA on a gold surface". *Langmuir.* **14**(21): p. 6121, 1998.

116. PARK, J.Y. & PARK, S.M. "DNA Hybridization Sensors Based on Electrochemical Impedance Spectroscopy as a Detection Tool". *Sensors*. **9**(12): p. 9513, 2009.
117. WANG, J. "Electrochemical nucleic acid biosensors". *Anal. Chim. Acta*. **469**(1): p. 63, 2002.
118. MENDES, R.K.;FREIRE, R.S.;FONSECA, C.P.;NEVES, S. & KUBOTA, L.T. "Characterization of self-assembled thiols monolayers on gold surface by electrochemical impedance spectroscopy". *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **15**(6): p. 849, 2004.
119. MCEWEN, G.D.;CHEN, F. & ZHOU, A.H. "Immobilization, hybridization, and oxidation of synthetic DNA on gold surface: Electron transfer investigated by electrochemistry and scanning tunneling microscopy". *Anal. Chim. Acta*. **643**(1-2): p. 26, 2009.
120. WEIGELT, B.;GEYER, F.C.;NATRAJAN, R.;LOPEZ-GARCIA, M.A.;AHMAD, A.S.;SAVAGE, K.;KREIKE, B. & REIS, J.S. "The molecular underpinning of lobular histological growth pattern: a genome-wide transcriptomic analysis of invasive lobular carcinomas and grade- and molecular subtype-matched invasive ductal carcinomas of no special type". *J. Pathol*. **220**(1): p. 45, 2010.
121. WANG, J.L.;XU, D.K. & CHEN, H.Y. "A novel protein analytical method based on hybrid-aptamer and DNA-arrayed electrodes". *Electrochemistry Communications*. **11**(8): p. 1627, 2009.
122. BARD, A.J.;FAN, F.R.;HORROCKS, B.;MIRKIN, M.;PIERCE, D.;WIPF, D.O. & ZHOU, F.M. "Recent Applications of the Scanning Electrochemical Microscope". *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*. **204**: p. 156, 1992.
123. SAKO, Y.;HOSOI-TANABE, S. & UCHIDA, A. "Fluorescence in situ hybridization using rRNA-targeted probes for simple and rapid identification of the toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella*". *Journal of Phycology*. **40**(3): p. 598, 2004.
124. TAWA, K. & KNOLL, W. "Mismatching base-pair dependence of the kinetics of DNA-DNA hybridization studied by surface plasmon fluorescence spectroscopy". *Nucleic Acids Res*. **32**(8): p. 2372, 2004.