

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

**“Desenvolvimento de Sensores Eletroquímicos
Descartáveis para Detecção do Biomarcador miRNA-208b
Visando o Diagnóstico de Doenças Coronarianas”**

Vagner da Silva Santos*

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

***Bolsista CAPES**

**São Carlos – SP
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Vagner da Silva Santos, realizada em 30/10/2024.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria (UFSCar)

Prof. Dr. Geiser Gabriel de Oliveira (UFT-Gurupi)

Prof. Dr. Rafael Martos Buoro (IQSC/USP)

Profa. Dra. Thaisa Aparecida Baldo (CSU)

Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi (FFCLRP/USP)

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

DEDICATÓRIA

Em virtude do amor, da insistência e do apoio dedico este trabalho aos meus pais, Alcineide Maria da Silva e Lusmar Francisco dos Santos. Dedico também a minha família com e sem laço sanguíneo a qual sempre esteve comigo.

EPÍGRAFE

"Eu sou apenas uma criança que nunca cresceu. Eu ainda faço perguntas de 'como' e 'por que'".

"O universo não é indiferente a nossa existência --- ele depende dela".

"Nós somos apenas uma espécie avançada de macacos em um planeta pequeno de uma estrela bastante comum. Mas nós podemos entender o universo. Isso nos torna especial".

"Penso que a raça humana não tem futuro senão no espaço".

"Acredito que a vida na Terra está diante de um risco cada vez maior de ser destruída por um desastre".

"Enquanto há vida, há esperança".

"Tenho reparado que mesmo aqueles que afirmam que tudo está predestinado e que não podemos mudar nada a respeito disso continuam olhando para os dois lados antes de atravessar a rua".

"Inteligência é a capacidade de se adaptar à mudança".

"Agressão, por parte dos humanos, pode destruí-los".

"O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas a ilusão do conhecimento".

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me guiado em todos os momentos e nunca desistir de mim.

Aos meus pais, Lusmar e Alcineide, por não terem me privado da Educação, por me proporcionarem o melhor e por terem se doados até os dias de hoje.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria, pela contribuição ímpar no meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço também pelas orientações e conhecimentos compartilhados, bem como a amizade, paciência e compreensão tida em todo esse tempo.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas contribuições que solidificam este Trabalho.

Aos meus irmãos Magno, Inglisse e Graciele por me apoiarem em cada etapa deste trabalho, sendo os meus guias, minha inspiração.

Ao meu irmão e irmã que a vida me deu, Cleilton e Taiane, por serem as pessoas que sempre me ouvem.

A minha família São Carlense, minha amiga de longas datas, Lorena Borges. Obrigado por tudo.

Aos meus professores do ensino médio e graduação que sempre acreditaram no meu potencial, apesar de eu mesmo nem sempre acreditar.

As minhas amigas Gabriela Martins e Ana Paula Malinoski por terem sido pessoas especiais e companheiras. Por sinal, estou com saudades dos nossos rolês.

A minha amiga mineira, Taíse Leite por ter me ajudado de todas as formas durante esse ciclo.

A Tássia pelas contribuições e por ter me ensinado os conhecimentos necessários para o meu desenvolvimento profissional.

Ao departamento de química e aos professores que tiveram participação direta e indiretamente para a conclusão dessa etapa.

Aos órgãos de fomento, FAPESP, CNPq e em especial a CAPES pela bolsa concedida.

Aos meus pedacinhos de amor, meus sobrinhos Thaylon, Davi, Bernardo e Kloe.

A minha amiga Dada que faz parte dessa história também, sempre contribuindo com suas experiencias e cumplicidade.

Agradeço especialmente aos colegas Me. Antonio e ao Prof. Dr. Anderson da Biotecnologia (UFSCar) pelas contribuições nos testes de qPCR.

As Dras. Nayore e Sandra Mayurama pelos conhecimentos compartilhados sobre extração de DNA/RNA.

Ao grupo LABIE, que durante um bom tempo foram não só colegas de trabalhos, mas também pessoas que compartilhei sorrisos, alegrias, dores e inspirações. Muito grato por ter trabalhado esses anos com vocês. Muito obrigado Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria.

Agradeço ao Sean, Cecília, Danilo, Wallace e Benedito pelos momentos de descontração.

Por fim, sou imensamente grato a todos que de alguma forma contribuiu para a conclusão deste Trabalho. Meu muito obrigado e que Deus os ilumine.

LISTA DE ABREVIATURAS

a	Amplitude do pulso
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês, Atomic Force Microscopy)
AuNPs	Nanopartículas de ouro
AuNPs-GSH	Nanopartículas de ouro decoradas com glutathione
AP	Angina de Peito
BQ	Benzoquinona
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês, <i>bovine serum albumin</i>)
CV	Voltamograma Cíclica (do inglês, <i>cyclic voltammetry</i>)
CE	Contra eletrodo
CK-MB	Creatinaquinase
CNT	Nanotubos de carbonos
DACs	Doenças arteriais coronarianas
DC	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNA _{Cp}	DNA controle positivo
DNA _{Sc}	DNA sonda de captura
DNA _{Sd}	DNA sonda de detecção
DPV	Voltamograma de pulso diferencial (do inglês, <i>Differential pulse voltammetry</i>)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
ECG	Eletrocardiograma
E_{dep}	Potencial de eletrodeposição
f	Frequência
GCE	Eletrodo de carbono vítreo (do inglês, <i>Glassy Carbon Electrode</i>)

GSH	Glutationa
HEPES	Ácido ((N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2- etanosulfônico))
HQ	Hidroquinona
HRP	Peroxidase de raiz forte (do inglês, <i>horseradish peroxidase</i>)
IAM	Infarto Agudo do miocárdio
IAMCSST	Infarto Agudo do miocárdio com supranivelamento do segmento ST
IAMSSST	Infarto Agudo do miocárdio sem supranivelamento do segmento ST
<i>I</i>	Corrente
<i>i_p</i>	Corrente de pico
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MES	ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MET	Microscopia de eletrônica de transmissão
miRNA	microRNA
MS	Ministério da Saúde
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NF-κB	Fator nuclear-Kappa
NHS	N-hidroxisuccinimida
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, <i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PDDA	Poli(cloreto de dialildimetilamônio) (do inglês, <i>poly(diallyldimethylammonium) chloride</i>)
PET	Poliéster
PEEK	Poliéter-éter-cetona

PM	Partícula magnética
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>)
RMS	Rugosidade média quadrada
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, <i>ribonucleic acid</i>)
RSD	Desvio-padrão relativo (do inglês, <i>relative standard deviation</i>)
SWV	Voltamograma de onda quadrada (do inglês, <i>square wave voltammetry</i>)
t_{dep}	Tempo de eletrodeposição
TW20	Tween-20
v	Velocidade de varredura

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Sequências de oligonucleotídeos utilizados para o desenvolvimento do método genômico.	23
TABELA 2- Estimativa do diâmetro das AuNPs a partir da relação A_{SPR}/A_{450} estudada por Haiss et al.(2007) ¹¹²	40
TABELA 3- Comparação de outros biossensores relatados com base em modificações de eletrodos para detecção de miRNA.	50

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Biogênese do miRNA. No núcleo das células os miRNAs primários se convertem em miRNAs percursores que, por sua vez são transportados para o citoplasma e lá são clivados pela proteína Dicer dando origem aos miRNAs. Fonte: Romaine et al. (2015)²⁴. 5
- FIGURA 2- Esquema da sequência alvo (miRNA-208b) e do seu miRNA precursor. Fonte: autoria própria. 9
- FIGURA 3- A) Eletrodo unitário serigrafados em PVC, Fonte: Santos et al., 2024⁵⁹. Eletrodos com arranjo de oito células eletroquímicas serigrafados em: B) papel filtro, Fonte: de Oliveira et al., 2024⁶⁸ C) e D) folhas de poliéster, Fonte: de Oliveira et al., 2018⁷⁷; Baldo et al., 2021⁷². 14
- FIGURA 4- Representação esquemática do processo de montagem e hibridização do biossensor. (A) pré-tratamento do C-SPE com H_2SO_4 , (B) eletrodeposição dos AuNPs em forma de estrela ou floco de neve, (C) modificação do WE com 3-MPA, (D) ativação de superfície com EDAC/NHS, (E) imobilização da sonda oligonucleotídica anti-miR-34a, (F) bloqueio da ligação não específica com L-asparagina (Asn) e (G) hibridização da sequência alvo do miR-34a., Fonte: Pereira et al., 2023⁸¹. 16
- FIGURA 5- Eletrodo serigrafado baseado em papel cromatográfico modificado com AuNP decoradas com uma sonda anti-miRNA-miRNA-652. 17
- FIGURA 6- Representação esquemática da diversidade de biomoléculas que podem ser ancoradas na superfície de PMs. Fonte: autoria própria. 18
- FIGURA 7- Eletrodo serigrafado baseado em papel cromatográfico modificado com AuNP decoradas com uma sonda anti-miRNA-miRNA-652. 19
- FIGURA 8- Síntese das AuNPs decoradas com glutatona (AuNPs-GHS), Fonte: autoria própria. 25
- FIGURA 9- Representação esquemática da fabricação dos eletrodos descartáveis. A) Recorte do adesivo de baixa aderência com impressora de recorte. B) Sobreposição do vinil a folha de PET. C) Serigrafia dos eletrodos com tinta de carbono. D) Cura dos eletrodos. D.1) Remoção do adesivo. E) Aplicação da tinta Ag/AgCl. F) Cura da tinta de Ag/AgCl. G) Remoção do adesivo vinílico. H) Construção do dispositivo microfluídico. 26
- FIGURA 10- A) Representação esquemática da modificação do arranjo de eletrodo pela formação da bicamada de PDDA e AuNPs, ativação dos grupos

carboxílicos com EDC/NHS seguida da imobilização da sonda de detecção. B) Mecanismo de reação da imobilização da sonda de detecção na superfície do eletrodo de trabalho..... 28

FIGURA 11- Esquema representativo das etapas de bioconjugação da PM com A) hairpin e B) biotina, bem como D) hibridização com o alvo e E) incubação das PMs com o marcador eletroquímico. 31

FIGURA 12- A) Representação do dispositivo descartável com dimensões do canal microfluídico e B) Dispositivo descartável conectado ao sistema microfluídico. 34

FIGURA 13- Esquema ilustrativo do sistema de detecção do miRNA-208b utilizando eletrodo modificado com sonda de detecção e as PMs decoradas com o hairpin e biotina, bem como o ciclo catalítico da enzima HRP mediado pela HQ para obtenção dos amperogramas em função da concentração do miRNA-208b. 35

FIGURA 14- Imagens de MEV do eletrodo de trabalho: a) eletrodo sem modificação e modificados com b) PDDA, c) e d) AuNPs. 36

FIGURA 15- Imagens de AFM em modo tapping: A) eletrodo serigrafado não modificado e modificado com B) PDDA, C) PDDA/AuNPs-GHS e D) PDDA/AuNPs-GHS/ sdDNA..... 37

FIGURA 16- Imagens de MET realizada das PMs funcionalizadas com grupos carboxílicos. 38

FIGURA 17- Espectro de absorção UV-Vis das AuNPs-GHS diluídas em água usando uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico. 39

FIGURA 18- Voltamogramas ciclos referentes a resposta eletroquímica da enzima HRP (1:1000) quando injetado no canal microfluídico a) tampão salino, b) HQ, c) H_2O_2 e d) solução mista de HQ (2,00 mmol L⁻¹) e H_2O_2 (1,00 mmol L⁻¹). Parâmetros da voltametria: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ 41

FIGURA 19- Voltametria cíclica da solução de HRP (1:1000) preparada em tampão salino PBS (pH=6,5) frente ao eletrodo a) não modificado e modificado com b) PPDA, c) AuNPs e d) DNAsd. Parâmetros da voltametria: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$ 42

FIGURA 20- Gráfico das correntes resultantes da variação da A) temperatura de desnaturação do hairpin usando o sistema (HRP/ H_2O_2 /HQ) e B) do tempo. A concentração de hairpin de 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de Biotina de 1 mM. Todas as

medições foram realizadas com 10 fmol L^{-1} do alvo com injeção de $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 44

FIGURA 21- Gráfico de barras para concentração de biotina na bioconjugação da PM. Para esse estudo foi considerado a concentração de hairpin $2,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e a desnaturação foi feito em 93°C por 5 min..... 46

FIGURA 22- A) Respostas de corrente da concentração do hairpin nas PMs e B) tempo de incubação com parâmetros de hibridização fixos a $T=93^\circ\text{C}$ por 5 min. Todas as medições foram feitas com 10 fmol L^{-1} do alvo com injeção de $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 47

FIGURA 23- Gráfico de barras referente a resposta eletroquímica A) da concentração de sonda de detecção utilizada para a imobilização na superfície do eletrodo e B) o tipo de solução de bloqueio. Todas as medidas eletroquímicas foram feitas com 10 fmol L^{-1} do alvo, concentração de hairpin em $8,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ injetando $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,00 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2 48

FIGURA 24- A) Respostas de correntes de transiente obtidas aplicando o método proposto em diferentes concentrações de miRNA-208b. B) Dependência da corrente de pico no logaritmo da concentração de miRNA-208b pela injeção no canal microfluídico da solução mista (2 mmol L^{-1} de H_2O_2 + 1 mmol L^{-1} de HQ) preparada em tampão PBS salino ($\text{pH}=6,5$) previamente purgado. As medidas foram feitas pela aplicação de um potencial fixo em $-0,25 \text{ V}$ com t_{equil} em 3s em intervalos de 0,5 s. O desvio padrão foi definido com $n=4$ 49

FIGURA 25- Comparação das respostas amperométricas fornecidas pelo dispositivo na ausência e na presença do miRNA-208b alvo (branco); B) Estabilidade de armazenamento dos imunoconjugados na PM utilizados para a construção do dispositivo amperométrico para a determinação do miRNA-208b. As medidas foram feitas na ausência (branco) e na presença de 10 fmol L^{-1} do miRNA-208b, definindo o desvio padrão com $n=4$ 52

FIGURA 26- Avaliação do método genômico em amostras reais de soro de pacientes com problemas cardíacos. O gráfico de barras mostra as respostas de corrente de pico catódico das amostras de soro e o símbolo + linha se refere à média ct da análise de qPCR dessas amostras. $n=4$ 54

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE SENSORES ELETROQUÍMICOS DESCARTÁVEIS PARA DETECÇÃO DO BIOMARCADOR miRNA-208B VISANDO O DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS CORONARIANAS. As doenças coronárias (DCs) são o tipo mais comum de doença cardiovascular, afetando o coração e os vasos sanguíneos e são uma das principais causas de morte não só no Brasil, mas no mundo. O diagnóstico das DCs é feito por meio de eletrocardiograma ou monitoramento de marcadores sorológicos. Independentemente de serem os métodos mais utilizados para avaliação dessas doenças, eles exigem pessoal especializado e utilizam marcadores inespecíficos que levam horas para serem detectados na corrente sanguínea. Em decorrência dessas limitações, propomos um método eletroquímico que utiliza partículas magnéticas decoradas com biotina e sonda de DNA (hairpin) para detectar miRNA-208b, sendo este específico para infarto do miocárdio e liberado no início da necrose cardíaca. A viabilidade do método consiste na abertura e anelamento efetivo do hairpin com o miRNA-208b. Após isso, o bioconjugado é incubado com estreptavidina-HRP. Assim, foram avaliados a temperatura e o tempo de desnaturação, bem como a concentração de hairpin, sonda de detecção e biotina. Além disso, o método faz uso de um dispositivo descartável com oito células eletroquímicas independentes à base de pasta de carbono, o que permite a detecção simultânea de oito amostras ou alvos diferentes. Com as condições escolhidas, o método produziu uma faixa analítica de 0,01 a $5,00 \times 10^3$ fmol L⁻¹ apresentando limite de detecção em 0,22 fmol L⁻¹. Dessa forma, o método se mostrou sensível para detecção do miRNA-208b e específico quando avaliado com outras sequências alvo não específicas para o hairpin. Além disso, a estabilidade do sistema foi monitorada por 24 dias, com queda significativa do sinal de corrente apenas no último dia em torno de 69,8%. O método foi aplicado em amostras reais de soro sanguíneo de pessoas com doenças que desencadeiam problemas cardíacos sem quaisquer etapas de pré-tratamento das amostras e ainda assim corroborou com os resultados de RT-PCR. Dessa forma, em síntese, o método provou ser sensível, específico, de baixo custo e com enorme potencial em se tornar uma alternativa para diagnóstico de doenças arteriais coronarianas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF DISPOSABLE ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR DETECTION OF THE BIOMARKER miRNA-208B AIMING AT THE DIAGNOSIS OF CORONARY DISEASES. Coronary diseases (CDs) are the most common type of cardiovascular disease, affecting the heart and blood vessels, and are one of the leading causes of death not only in Brazil but worldwide. The diagnosis of CD is made through electrocardiogram or monitoring of serological markers. Regardless of being the most commonly used methods for evaluating these diseases, they require specialized personnel and use nonspecific markers that take hours to be detected in the bloodstream. Due to these limitations, we propose an electrochemical method that uses magnetic particles decorated with biotin and a DNA probe (hairpin) to detect miRNA-208b, which is specific for myocardial infarction and released at the onset of cardiac necrosis. The viability of the method consists of the effective opening and annealing of the hairpin with miRNA-208b. After that, the bioconjugate is incubated with streptavidin-HRP. Thus, the temperature and denaturation time, as well as the concentration of hairpin, detection probe, and biotin, were evaluated. Moreover, the method uses a disposable device with eight independent electrochemical cells based on carbon paste, which allows for the simultaneous detection of eight different samples or targets. With the chosen conditions, the method produced an analytical range of 0,01 to $5,00 \times 10^3$ fmol L⁻¹ with a detection limit of 0,22 fmol L⁻¹. In this way, the method proved to be sensitive for the detection of miRNA-208b and specific when evaluated with other non-specific target sequences for the hairpin. Furthermore, the system's stability was monitored for 24 days, with a significant drop in the current signal only on the last day, around 69.8%. The method was applied to real blood serum samples from people with diseases that trigger heart problems without any pre-treatment steps of the samples and still corroborated with the RT-PCR results. Thus, in summary, the method proved to be sensitive, specific, low-cost, and with enormous potential to become an alternative for diagnosing coronary artery diseases.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças cardiovasculares e arterial coronarianas.....	1
1.2 Diagnóstico e biomarcadores de doenças arteriais coronarianas.....	2
<i>1.2.1 Aterosclerose e biomarcadores genômicos de doenças coronarianas</i>	
.....	4
<i>1.2.1.1 miRNA-208b</i>	7
1.3 Detecção genômica	9
1.4 Biossensores	10
<i>1.4.1 Biossensores eletroquímicos e eletrodos descartáveis</i>	12
1.5 Efeito sinérgico de materiais funcionalizados na amplificação de métodos analíticos	15
<i>1.5.1 AuNPs em monocamadas auto-organizadas</i>	15
<i>1.5.2 Partículas Magnéticas (PMs) em ensaios genômicos</i>	17
2. OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	22
3.1 Instrumentação e materiais.....	22
3.2 Reagentes e soluções.....	22
3.3 Síntese das nanopartículas de ouro com glutathione (AuNPs-GHS) ...	24
3.4 Fabricação do dispositivo microfluídico contendo eletrodos de carbono	25
<i>3.4.1. Modificação do eletrodo de trabalho</i>	27
3.5. Estudo eletroquímico do marcador enzimático	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares e arterial coronarianas

A exigência por produtividade no mundo do trabalho em consonância com a facilidade de ingerir alimentos processados acarreta sérios danos à saúde, o coração é o principal órgão afetado por este estilo de vida. As doenças que afetam a estrutura e a função do músculo cardíaco, bem como o sistema vascular constituem o grupo de doenças cardiovasculares (DC)¹.

Neste grupo estão incluídas as doenças coronarianas, cerebrovascular, arterial periférica, cardíaca reumática, trombose venosa profunda e embolia pulmonar. A ocorrência dessas doenças depende de diversos fatores, sejam eles relacionados ao sedentarismo, tabagismo, obesidade ou a fatores genéticos, como é o caso da cardiopatia congênita^{1,2}.

Mundialmente, por ano cerca de 17,9 milhões de pessoas são vítimas de alguma DC. A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta a população mundial sobre o grande desafio em reduzir a mortalidade das doenças não transmissíveis, das quais as doenças cardiovasculares fazem parte e são a principal causa dessa mortandade¹. No Brasil, as pessoas do sexo masculino com faixa etária acima de 55 anos foram as principais vítimas fatais das DCs chegando à marca de 162 mil só no ano de 2020 ¹.

As doenças arteriais coronarianas (DACs) englobam casos de angina estável ou instável, infarto agudo do miocárdio (IAM) e insuficiência cardíaca. Esse subgrupo de doenças cardiovasculares saiu 1,4 milhões de novos casos em 1990 para 4 milhões em 2019, acometendo cerca de 1,7 mil vítimas fatais neste ano ². Embora haja ação medicamentosa e cirúrgica em casos de DACs, a cura ainda é um grande desafio. A falta de informações concreta sobre a patogênese do processo inflamatório, resultados adversos ao tratamento e complicações nos pós-operatórios dificulta o manejo adequado dessas doenças³.

A causa das DACs está relacionada com a aterosclerose, processo inflamatório que causa a ruptura das artérias coronárias devido a formação de placa de gordura que impede o fluxo normal de sangue ⁴. No entanto, Baudhuin (2009) demonstrou que a patogênese das DACs pode estar vinculada a alterações genéticas ⁵. A necroptose é a morte celular com características de necrose e apoptose que geram uma série de alterações genéticas, a expressão de miRNAs sendo uma delas ⁴.

1.2 Diagnóstico e biomarcadores de doenças arteriais coronarianas

O diagnóstico da DAC combina a avaliação médica, histórico do paciente e exames complementares, estes podendo ser invasivos ou não ⁶. O eletrocardiograma (ECG) é o um dos exames mais solicitados pelos médicos em um quadro de DAC, tendo em vista sua capacidade de monitorar a frequência cardíaca. O ECG registra a atividade elétrica do coração através dos ritmos cardíacos, ou seja, quaisquer alterações anormais ou irregulares da atividade elétrica do coração indica um problema cardíaco ⁷.

Embora o ECG seja um dos exames mais importantes para a conclusão do diagnóstico em caso de DAC, a interpretação dos dados não é trivial, exigindo um profissional especializado ⁸. Com intuito de solucionar esse impasse, atualmente, a comunidade científica tem dado ênfase ao diagnóstico automático de ECG, o qual utiliza modelos matemáticos para interpretar os dados e assim indicar o problema cardíaco ⁶. No entanto, esse diagnóstico depende de dados de ECG já registrados para montar os modelos, o que o torna limitado ⁶.

Além do ECG, outros exames de imagem são indicados em quadros de DAC, ao exemplo da cintilografia de perfusão miocárdica cuja avalia possíveis obstruções na artéria coronária ⁹. Apesar de ser uma técnica não invasiva, apresenta resultados conflitantes e demanda o uso de outros exames como é o caso da angiografia. Este sendo um procedimento mais invasivo e que utiliza equipamentos caros ⁹.

Outras modalidades não invasivas também são utilizadas para tais fins, ao exemplo da angiografia por tomografia computadorizada e angiografia por ressonância magnética, ambas fornecem imagem anatômica¹⁰. Ainda que estas técnicas apresentem informações estruturais importantes, pois demonstram com precisão uma possível obstrução nas artérias coronárias, elas são insuficientes em casos em que o monitoramento da frequência cardíaca e pressão arterial se faz necessário ^{11,12}.

Dessa forma, levando em consideração o tempo de análise das informações preliminares do paciente e o direcionamento dos exames, percebe-se o quão complexo e demorado é o manejo adequado para esses tipos de doenças. Isto é preocupante, tendo em mente os quadros graves de DAC, por exemplo o infarto agudo do miocárdio (IAM) ou ataques fulminantes que requerem ação imediata.

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) como uma forma de padronizar atenção básica nos casos de DAC, propõe uso de protocolos clínicos elaborados a partir das diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia e outras sociedades internacionais ^{13,14}. Nesses protocolos estão descritas as ações iniciais que podem ser realizadas em uma situação de síndrome coronária. Como o infarto agudo do miocárdio é responsável pela maioria dos casos de DACs, os protocolos inicialmente tendem a identificar e diferenciá-lo ^{13,14}.

A primeira ação é a anamnese, a qual reuni informações do paciente como dor típica; os sintomas atípicos e fatores de risco. Na sequência, recomenda-se o ECG juntamente com alguns exames físicos com intuito de diferenciar o IAM. O infarto agudo do miocárdio pode ser com supranivelamento do segmento ST (IAMCSST) ou sem o supranivelamento do segmento ST (IAMSSST)¹⁴⁻¹⁶.

A partir dessas informações, caso os exames indiquem um infarto agudo do miocárdio sem o supranivelamento do segmento ST, utiliza-se os biomarcadores sorológicos a fim de distinguir um IAMSSST de uma angina

instável já que em caso de IAMSSST há uma elevação da concentração dos biomarcadores sorológicos ^{13,14}.

A mioglobina e creatinaquinase (CK-MB) são os biomarcadores recomendados para identificação de crises cardíacas, a elevação dos níveis desses biomarcadores indica uma necrose dos músculos cardíacos ¹⁷. Embora sejam os mais usados, apresentam baixa especificidade tendo em vista que estão presentes também em células do músculo esquelético ^{17,18}.

Além desses, a troponina também é comumente utilizada como biomarcador, apesar de ser mais específica para danos no miocárdio, sua presença na circulação sanguínea demora em média cerca de 4 a 6 horas após os primeiros sintomas, assim como CK-MB ^{18,19}.

Portanto, o uso de biomarcadores inespecíficos e de difícil detecção na corrente sanguínea faz com que técnicas invasivas como angiografia ainda sejam as mais confiáveis para o diagnóstico de doença coronariana. Sendo assim, estudos voltados a biogênese das doenças coronarianas possibilitará ação de novos biomarcadores mais específicos, estáveis e de rápida detecção. E, conseqüentemente, o desenvolvimento de métodos de fácil manuseio e com melhor custo-benefício.

1.2.1 Aterosclerose e biomarcadores genômicos de doenças coronarianas

O uso de miRNAs nos últimos anos vem sendo objeto de pesquisa em diversos segmentos da ciência, no entanto, na aplicação médica tem se destacado devido ao seu potencial como biomarcador^{20,21}. Os miRNAs são uma classe de pequenos RNAs não codificantes que desempenham um papel crucial na regulação e controle dos níveis de proteína ²².

Os microRNAs (miRNAs) são sequências curtas de RNA não codificantes com um comprimento de 17 a 25 nucleotídeos, que atuam na supressão ou regulação da expressão gênica de muitos processos e atividades biológicas²³. Eles são oriundos dos miRNAs primários (pri-miRNAs) que são sintetizados pela RNA polimerase II e possui cerca de 1000 nucleotídeos de comprimento²⁴ (FIGURA 1). Ainda que a maioria dos miRNAs se concentrem no núcleo das células, uma parte significativa se encontra na corrente sanguínea, conhecidos como miRNAs circulantes.

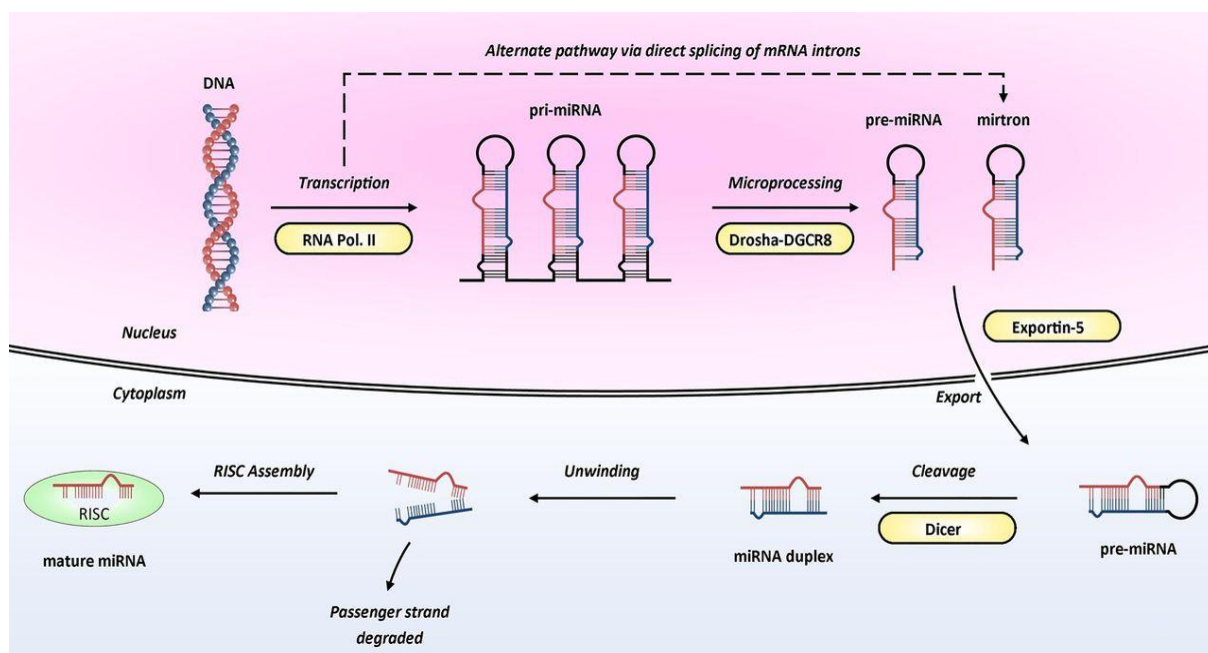


FIGURA 1- Biogênese do miRNA. No núcleo das células os miRNAs primários se convertem em miRNAs percursores que, por sua vez são transportados para o citoplasma e lá são clivados pela proteína Dicer dando origem aos miRNAs. Fonte: Romaine et al. (2015)²⁴.

No núcleo das células, os pri-miRNAs são microprocessados em miRNA percursores (pre-miRNAs) pela ribonuclease tipo III (Drosha) e pela proteína DGCR8 formando estruturas na forma de grampo de cabelo (hairpin) com 70 nucleotídeos de comprimento²⁵. O hairpin refere-se a uma sequência de nucleotídeos que possui a forma de grampo de cabelo devido suas extremidades serem complementares, o que gera uma região central não complementar, chamada de loop²⁶. Em seguida, com ajuda da exportina-5, os pre-miRNAs são transportados do interior do núcleo para o citoplasma em que posteriormente são

clivados pela ribonuclease III (Dicer), formando os miRNAs com 22 nucleotídeos de comprimento, como demonstrado na FIGURA 1^{24,25}.

Embora ainda não haja um protocolo padronizado quanto ao uso de miRNAs em diagnósticos clínicos, as vantagens como fácil detecção em fluídos corporais, especificidade e sensibilidade tem garantido seu lugar na busca de novos biomarcadores²⁰. Com isto, os miRNAs são vistos como uma tecnologia futura para o monitoramento de doenças, porém se faz necessário estudos voltados à sua identificação e função no organismo¹⁷⁻¹⁹.

Como já mencionado, a causa das DACs está relacionada ao processo de aterosclerose e junto a ele estão envolvidos uma cadeia de reações fisiopatológicas que será descrita a seguir. A obstrução das artérias ocasiona uma lesão nas células endoteliais, fazendo com que o sistema imune, através das citocinas e quimiocinas, acione os monócitos em direção a lesão. Com isso, lacunas entre as células endoteliais provocam a passagem de substâncias e lipoproteínas, em especial as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), para dentro da parede arterial²¹.

A LDL no interior das artérias provoca a formação das células espumosas, que são células dotadas de lipídios com capacidade de formar placas ateroscleróticas. Isto acontece devido a oxidação da LDL na presença de óxido nítrico e sua absorção pelas células do sistema imune (macrófagos)²¹.

Todas essas reações envolvidas no processo de aterosclerose possibilitam uma via de sinalização celular mediada por miRNAs²⁷. A sinalização celular é a resposta das células frente algum estresse extracelular que provocaria uma anormalidade em sua atividade, por isso são usadas no monitoramento de doenças²⁷.

Khan e Siraj (2023) reuniram alguns miRNAs cotados a serem biomarcadores de DAC envolvendo tais vias²¹. Neste estudo, os autores destacam a via de sinalização celular MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) e a NF- κ B (fator nuclear-Kappa). A primeira está envolvida com o processo inflamatório,

demonstrando uma diminuição do nível de monócitos e uma expressão significativa do miRNA-126 e miRNA-3614. Já a segunda, está associada a formação anormal de células do músculo liso, o que gera uma expressão considerável do miRNA-146a, miRNA-29b e miRNA-3614²¹.

Além desses, Nishiguchi et al. (2015) aponta outros miRNAs envolvidos com a lesão endotelial (miRNA-23, miRNA-27a, miRNA-130a, miRNA-133a), formação de lipoproteínas (miRNA-122, miRNA-133a/b) e atividade trombótica (miRNA-27a, miRNA-633)^{22,28}. Polyakova et al. (2021) destaca outros miRNAs associados ao funcionamento das células do músculo liso (miRNA-26, miRNA-195), adesão celular (miRNA-27a/b, miRNA-221), formação e ruptura da placa aterosclerótica (miRNA-130a, miRNA-221, miRNA-144, miRNA-208a/b)²⁹⁻³¹.

1.2.1.1 miRNA-208b

O miRNA-208b faz parte da família de miRNAs intrônicos que regulam os genes da cadeia de miosina, os quais são responsáveis por codificar as proteínas envolvidas no processo de contração dos músculos cardíacos ³². Em detrimento disto, o miRNA-208b é apontado como excelente biomarcador para infarto agudo do miocárdio, hipertrofia e arritmia cardíaca ³³⁻³⁵.

No estudo de Li et al. (2013), a qual envolveu amostras de soro de 117 pacientes com IAM, 182 pacientes com angina de peito (AP) e 100 controles negativos, mostrou que o miRNA-208b em pacientes com IAM é expresso positivamente apresentando 98% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparado aos controles negativos^{36,37}.

Paul et al. (2021) confirma o potencial do miRNA-208b como biomarcador para IAM e assegura seu uso também em casos de fibrilação atrial, um tipo de arritmia cardíaca que em muitos casos passa despercebida pelos métodos convencionais ³⁵. Sendo assim, percebe-se que o miRNA-208b é

frequentemente associado as doenças arteriais coronarianas, evidenciando ser uma alternativa viável para o diagnóstico de DACs.

De acordo Zhou e Yang (2006) o biomarcador ideal para doenças cardíacas deve incorporar simultaneamente alta sensibilidade e especificidade clínica, ser detectável precocemente e manter tempo razoável para que seja possível a sua quantificação rápida e com menor custo-benefício ¹⁸.

Dessa forma, trabalhos como o de Li et al. (2013), Zinovkin e Sakharov (2024) asseguram a especificidade e sensibilidade do miRNA-208b, enquanto o de Sharma et al. (2023) declara que células miocárdicas danificadas liberam o miRNA-208b em menos de 1 hora na corrente sanguínea. Assim, sua rápida detecção confere mais um critério pontuado por Zhou e Yang (2006) e realça o potencial do miRNA-208b como biomarcador para DAC, instigando o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, específicos e de fácil acesso ³⁸

A estabilidade dos DNA/RNA circulante está vinculada a ação da enzima RNase e, por conta disso, os miRNAs são mais estáveis haja vista que em meio celular os miRNAs se encontram encrustados em proteínas e glicoproteínas, evitando a ação da enzima²⁸. Com base nisso, o avanço no desenvolvimento de métodos analíticos, em especial os biossensores, para detecção de miRNAs em diversos fluidos corporais como o sangue ³⁹, urina ⁴⁰, saliva ⁴¹, secreções e tecidos dos corpos⁴², faz uso dessa vantagem e demonstra a relevância dos miRNAs na busca por biomarcadores cada vez mais sensíveis e métodos menos invasivos.

Portanto, devido as vantagens atreladas ao miRNA-208b e a facilidade de sua detecção em fluidos corporais, este trabalho propõe sua detecção utilizando um método genômico que emprega sonda de DNA específica. A FIGURA 2 esquematiza a sequência alvo utilizada neste estudo. Ela é composta por 22 nucleotídeos oriundo do miRNA precursor que contém 77 nucleotídeos.

miRNA-208b (22 nucleotídeos)



pre-miRNA-208b (77 nucleotídeos)

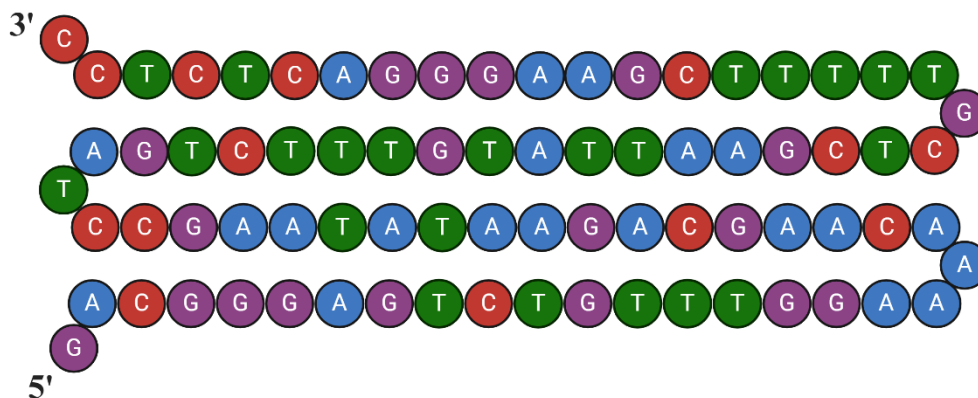


FIGURA 2- Esquema da sequência alvo (miRNA-208b) e do seu miRNA precursor. Fonte: autoria própria.

1.3 Detecção genômica

As técnicas habitualmente envolvidas na detecção de miRNAs incluem a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), *Northern blotting*, tecnologia de microarray e, recentemente, técnicas eletroquímicas têm se destacado ⁴³⁻⁴⁵. A RT-PCR é uma técnica imprescindível na detecção genômica em muitos estudos devido a sua alta sensibilidade. No entanto, é uma técnica que utiliza corantes fluorescentes e sondas radioativas como fluoróforos, que ocasionam o efeito fotobranqueamento devido as curtas emissões de luz ⁴⁴. Além disso, o manuseio e descarte destes marcadores radioativos não é simples e tampouco comum⁴⁴.

A técnica de RT-PCR ainda apresenta outras limitações, principalmente no que diz respeito a praticidade, uma vez que necessita de pessoal treinado, faz uso de etapas experimentais complexas e reagentes caros ⁴⁶. Fora que, para as etapas de transcrição e clivagens necessita de um termociclador que

geralmente exige um volume significativo de amostra ⁴⁵. Dessa forma, apesar da excepcional sensibilidade da técnica, suas limitações tornam inviável a sua aplicação em local de pronto atendimento (*point-of-care*).

Assim como a técnica de RT-PCR, o método de *Northern blotting* faz uso de marcações radioativas, procedimentos experimentais complexos e, sobretudo, apresenta reações cruzadas que compromete sua sensibilidade ⁴⁷. Embora este método seja reconhecido pela alta capacidade de detecção de RNA em solução, oferece algumas desvantagens como a quantidade expressiva de solução e longo tempo de análise ^{47,48}.

Já o sistema de microarray possui alto rendimento em razão de sua capacidade de análise multiplexada, entretanto, possui uma faixa de detecção linear limitada, alto custo e apresenta também problemas com reações cruzadas, gerando resultados falsos positivos/negativos⁴⁶. Cabe ressaltar que todas essas técnicas de detecção necessitam de etapas de extração de RNA/DNA, o que as caracteriza como demoradas e dispendiosas ⁴⁷.

Dessa forma, a baixa sensibilidade apresentada pelas técnicas de *Northern blotting* e o sistema de microarray atribui uma certa dificuldade na detecção de miRNA em fluidos corporais com baixo conteúdo genético, gerando resultados menos reprodutíveis ⁴⁹.

Portanto, para o desenvolvimento de um método com potencial diagnóstico é conveniente que seu sistema de detecção apresente alta sensibilidade, curto tempo de análise, simples operacionalização e seja de baixo custo. Essas vantagens são apresentadas por biossensores eletroquímicos, logo o seu uso na detecção de miRNAs promove a criação de um método eletroquímicos com reais condições de monitorar as DACs.

1.4 Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que combinam a ação de um biorreceptor com uma plataforma de transdução⁵⁰⁻⁵². O biorreceptor ao

interagir especificamente com o analito promove uma alteração detectável em massa, fluorescência, carga elétrica ou índice de refração, a qual é perceptível ao transdutor que converterá essa interação em um sinal mensurável ^{52,53}.

Dessa forma, é possível classificar os biossensores quanto ao tipo de transdutor e pela natureza do elemento de biorreconhecimento⁵³. Os receptores biológicos podem ser constituídos por enzimas, oligonucleotídeos, peptídeos e anticorpos. Essas biomoléculas são ancoradas ao transdutor através de ligação covalente, adsorção física ou aprisionamento de membrana⁵⁴.

Sendo assim, os imunossensores são biossensores utilizados na detecção de antígenos e usa anticorpos como biorreceptor. Da mesma forma, biossensores que emprega DNA/RNA como biorreceptor dá-se o nome de genossensores⁵⁵. Embora sejam biorreceptores com natureza distinta, ambos apresentam uma alta afinidade com seus respectivos analitos, concedendo aos biossensores uma boa especificidade⁵¹.

A classificação dos biossensores com base nos transdutores se dá ao fato do sinal biológico, proveniente da interação analito-biorreceptor, ser convertido em sinal eletrônico por várias técnicas analíticas⁵⁶. Devido a isso, diversos transdutores são projetados para melhor atender as particularidades de cada técnica⁵⁴. Sendo assim, biossensores que apresentam variação de energia na forma luminosa são classificados como biossensores ópticos e faz uso de técnicas como a ressonância plasmônica de superfície (SPR, *do inglês surface plasmon resonance*), espectroscopia Raman de superfície aprimorada (SERS, *do inglês surface enhanced Raman spectroscopy*), quimioluminescência, fluorescência, colorimetria e entre outros ⁵⁷.

Os biossensores térmicos baseiam-se na mudança de temperatura, em processos de absorção ou produção de calor, na qual é obtida por um dispositivo calorimétrico ou termômetro ⁵¹. Em contrapartida, transdutores que detectam variação de massa passam a ser chamados de biossensor piezoelétrico⁵⁰. A microbalança de cristal de quartzo é técnica mais empregada em biossensores

piezoelétricos por conta da sua qualidade em medir pequenas variações de massa através da frequência de ressonância dos cristais de quartzo⁵⁸.

Dentre as opções de transdutores mencionadas, os eletroquímicos se destacam e são largamente utilizados em biossensores devido agregar características como: alta sensibilidade, estabilidade, portabilidade e uso de equipamentos de baixo custo⁵⁹⁻⁶³. Além disso, os biossensores eletroquímicos possibilita o desenvolvimento diversos métodos analíticos com uso de técnicas específicas para cada sistema⁶⁴.

Os métodos mais comuns que envolvem transdutores eletroquímicos são: métodos amperométricos/ voltamétricos^{59,60,65}, potenciométricos⁶⁶, impedimétricos⁶³ e métodos eletroquimioluminescentes⁶⁷. Contudo, percebe-se que o estudo com biossensores abrange diversas combinações de elementos de transdução com respectivos elementos de reconhecimento, evidenciando assim a grande amplitude de possibilidades para construção de biossensores, cada uma com suas vantagens e desafios.

1.4.1 Biossensores eletroquímicos e eletrodos descartáveis

Os biossensores eletroquímicos são conhecidos por oferecer vantagens como alta sensibilidade, rápido tempo de resposta, versatilidade operacional e alto poder de miniaturização⁶⁸. E, quando associados a eletrodos serigrafados, tornam-se mais atrativos graças ao aumento do desempenho dos biossensores uma vez que, eletrodos serigrafados apresentam baixa corrente de fundo e faz uso de materiais de baixo custo⁶⁹.

Além do mais, proporciona uma superfície com capacidade de ancorar uma gama de biomoléculas e nanomateriais⁷⁰. Em virtude disso, nas últimas décadas, esses tipos de sensores têm sido intensamente utilizados em dispositivos descartáveis e portáteis, o que oportuniza sua aplicação em locais de ponto atendimento (*pont-of-care*)^{55,65,69,71}.

Em detrimento aos atributos apresentados pelos sensores descartáveis, o método genomagnético proposto nesse trabalho faz uso de um biossensor eletroquímico utilizando eletrodos serigrafados modificados com AuNPs com detecção amperométrica do miRNA-208b.

Normalmente, a serigrafia^{59,68,72}, impressão a jato de tinta⁷³ e técnicas de sputtering⁷⁴ são usadas na construção de eletrodos serigrafados. Os sensores geralmente são produzidos em superfícies planas de plástico ou cerâmica, com a cura de tintas condutoras à base de metais e carbono⁷⁵. Devido a facilidade em sua construção, esses sensores possibilita a criação de diversos layouts, os quais incluem o design padrão de três eletrodos: eletrodo de trabalho (WE, *do inglês Working Electrode*), eletrodo de referência (RE, *do inglês Reference Electrode*) e contra-eletrodo (CE)^{73,76}.

Ademais, os sensores serigrafados são adaptáveis e podem ser impressos em outros substratos, como é o caso de eletrodos impressos em papel^{67,76}. Nosso grupo de pesquisa tem trabalhado arduamente na construção de eletrodos descartáveis, buscando novas alternativas de substratos e personalização de layouts adequado para cada método analítico.

Alguns dos eletrodos descartáveis criados pelo nosso grupo de pesquisa é demonstrado na FIGURA 3. Sendo assim, nosso grupo de pesquisa elabora desde dispositivos descartáveis unitários e portáteis a arranjos de células eletroquímicas empregando folhas de PVC⁵⁹, papel⁶⁸ e folhas de poliéster^{77,78} como substrato.

Além das opções de substratos utilizados na serigrafia, o design padrão dos eletrodos descartáveis também pode ser aprimorado mediante a necessidade de cada sistema. Isto é demonstrado por De Oliveira et al. (2018), a qual o dispositivo descartável empregado na detecção da *Salmonella typhimurium* (*S. typhi*) em amostras de leite possuía oito células eletroquímicas independentes, possibilitando a análise de oito amostras diferentes simultaneamente ou oito medidas iguais da mesma amostra⁷⁷.

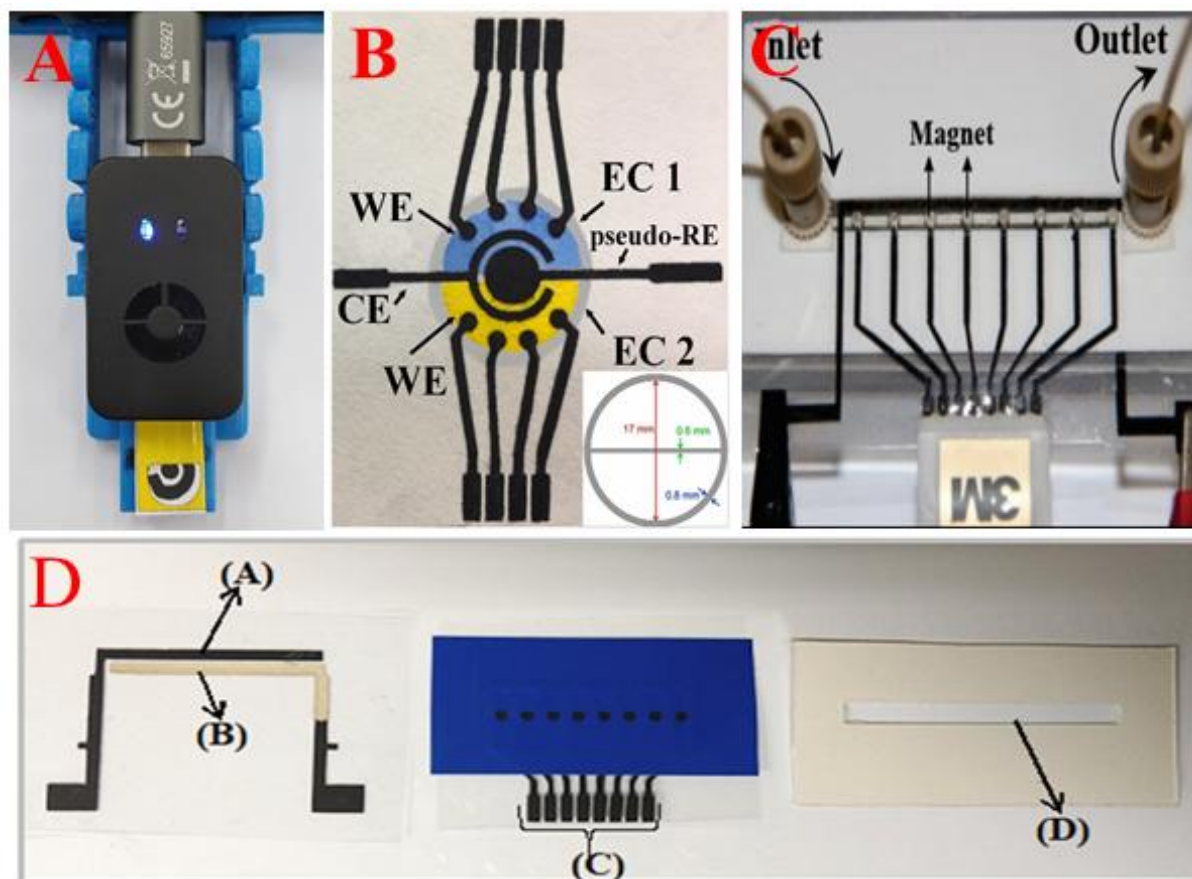


FIGURA 3- A) Eletrodo unitário serigrafados em PVC, Fonte: Santos et al., 2024⁵⁹. Eletrodos com arranjo de oito células eletroquímicas serigrafados em: B) papel filtro, Fonte: de Oliveira et al., 2024⁶⁸ C) e D) folhas de poliéster, Fonte: de Oliveira et al., 2018⁷⁷; Baldo et al., 2021⁷².

Enquanto isso, Baldo et al. (2019) também empregando um dispositivo descartável com um arranjo de oito eletrodos de trabalho optou por fazer uma análise multiplexada para detecção dos biomarcadores COX-2 e Tp53 relacionados ao câncer de colo uterino e endometrial. Além da boa sensibilidade, o método não apresentou reações cruzadas e garantiu baixos limites de detecção⁷⁸. Os autores ainda ressaltam que, o custo do dispositivo descartável desenvolvido pairava em torno de R\$ 0,50 enquanto teste padrão-ouro (ELISA) custava em média R\$ 50,0⁷⁸.

Sendo assim, compreende-se que o uso de eletrodos descartáveis não só oferecer um leque de possibilidade de aprimoramento aos métodos eletroanalíticos, como também utiliza materiais de fácil acesso e baixo custo. Além disso, pressupõe que sensores eletroquímicos baratos permite a produção

em larga escala e evitaria a reutilização dos dispositivos em testes diagnósticos, haja vista que o reaproveitamento acarretaria problemas de contaminação gerando resultados falsos positivos/negativos.

1.5 Efeito sinérgico de materiais funcionalizados na amplificação de métodos analíticos

Os eletrodos serigrafados embora apresentem vantagens bioeletroquímicas e econômicas, requerem modificação para imobilização de biomoléculas em sua superfície⁶¹. Dessa forma, diversos materiais funcionalizados são utilizados com intuito de aumentar a sensibilidade e reduzir o limite de detecção dos biossensores, ocasionando em si o efeito sinérgico^{79,80}.

As nanopartículas de ouro (AuNPs)^{81,82}, nanotubos de carbono (CNTs)⁸³, nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT)⁸⁴, grafeno⁸⁵ e óxido de grafeno⁸⁶ são os nanomateriais comumente utilizados para tais fins. Estes nanomateriais são estáveis, biocompatíveis e apresentam uma elevada área superficial, o que aumenta a transferência de massa e carga na superfície do transdutor⁸¹⁻⁸⁶. Por conta das propriedades única e da facilidade de bioconjugação, as partículas magnéticas (PMs) também são utilizadas em métodos analíticos a fim de aumentar a sensibilidade e garantir a robutez^{87,88}.

1.5.1 AuNPs em monocamadas auto-organizadas

As AuNPs se destacam nesse universo de nanomateriais não só pela sua biocompatibilidade e fácil síntese, mas sim, pela sua afinidade em se ligar com biomoléculas viabilizando seu uso como marcadores eletroquímicos⁸⁸⁻⁹⁰. Além disto, elas apresentam boa condutividade, comportamento redox e atividade catalítica, permitindo a construção de plataformas auto-organizadas, sensíveis, com rápida resposta e com possibilidade de imobilizar inúmeros receptores biológicos^{80,88,91}.

Trabalhos na literatura corroboram com as vantagens apresentadas pelas AuNPs em métodos eletroquímicos. Pereira e colaboradores, por exemplo, relataram um biossensor impedimétrico na detecção do miRNA-34a para diagnóstico da doença de Alzheimer⁸¹. Neste estudo os autores utilizaram eletrodos serigrafados modificados como nanoestruturas de ouro decoradas com anti-miRNA-34a⁸¹, como mostra a FIGURA 4.

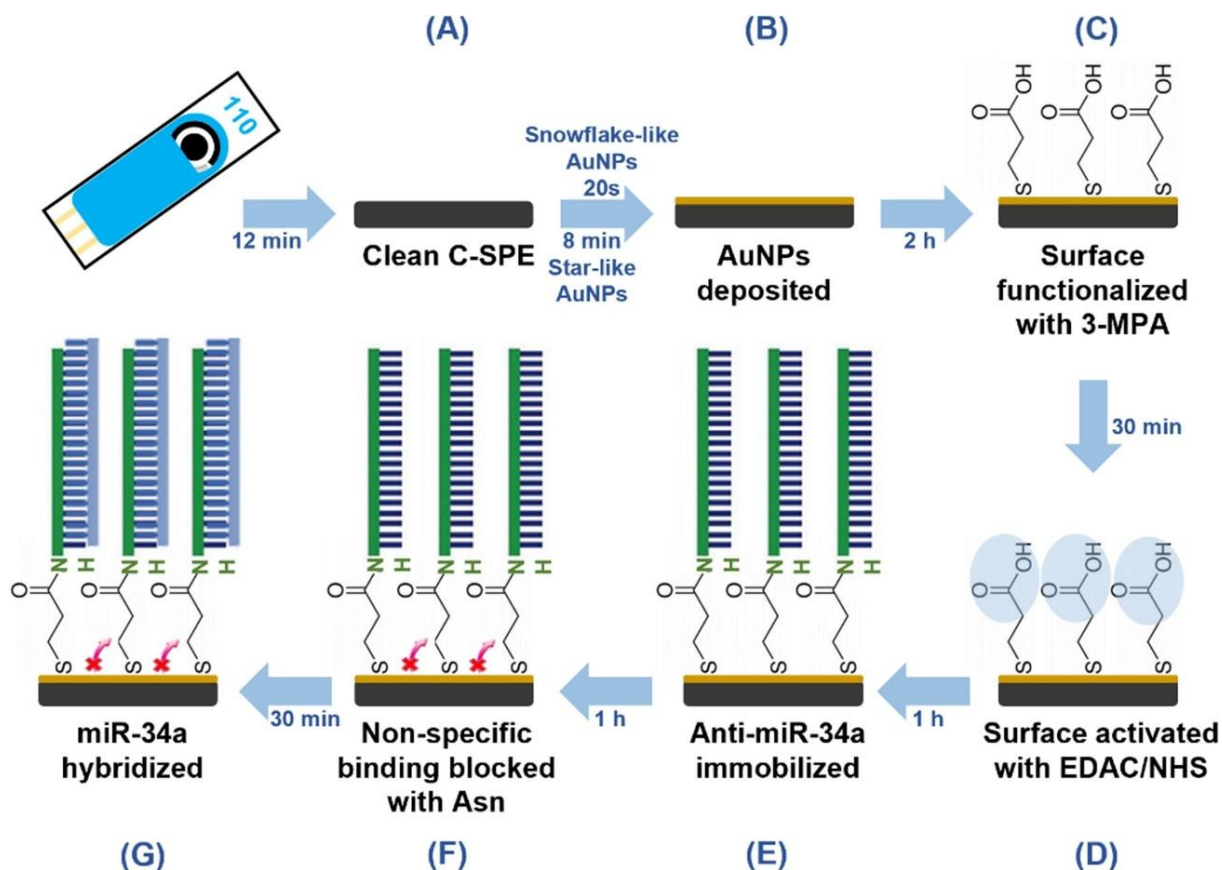


FIGURA 4- Representação esquemática do processo de montagem e hibridização do biossensor. (A) pré-tratamento do C-SPE com H_2SO_4 , (B) eletrodeposição dos AuNPs em forma de estrela ou floco de neve, (C) modificação do WE com 3-MPA, (D) ativação de superfície com EDAC/NHS, (E) imobilização da sonda oligonucleotídica anti-miR-34a, (F) bloqueio da ligação não específica com L-asparagina (Asn) e (G) hibridização da sequência alvo do miR-34a., Fonte: Pereira et al., 2023⁸¹.

Com esse sistema, os autores obtiveram uma faixa linear de 100 pM a 1,00 μ M com limite de detecção em 39,0 pM em tampão e 94,0 aM em soro. Contudo, o biossensor proposto por Pereira e colaboradores aparentou ser uma alternativa viável, rápida e minimamente invasiva para detecção de biomarcadores genômicos para o diagnóstico de Alzheimer⁸¹.

Da mesma forma, Raucci et al. (2024) propõe um dispositivo eletroquímico capaz de capturar e quantificar o miRNA-652 associado a câncer de mama triplo-negativo⁸². O trabalho utiliza eletrodos serigrafados em papel cromatográfico modificados com AuNPs decoradas com anti-miRNA-652 (FIGURA 5).

Para as medidas eletroquímicas foi empregada a voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*), resultando em limites de detecção em torno de 0,40 nM tanto em soro sintético quanto em soro humano⁸². Além disso, o dispositivo demonstrou ser seletivo, reproduzível e capaz de tornar-se uma ferramenta diagnóstica com melhor custo-benefício⁸².

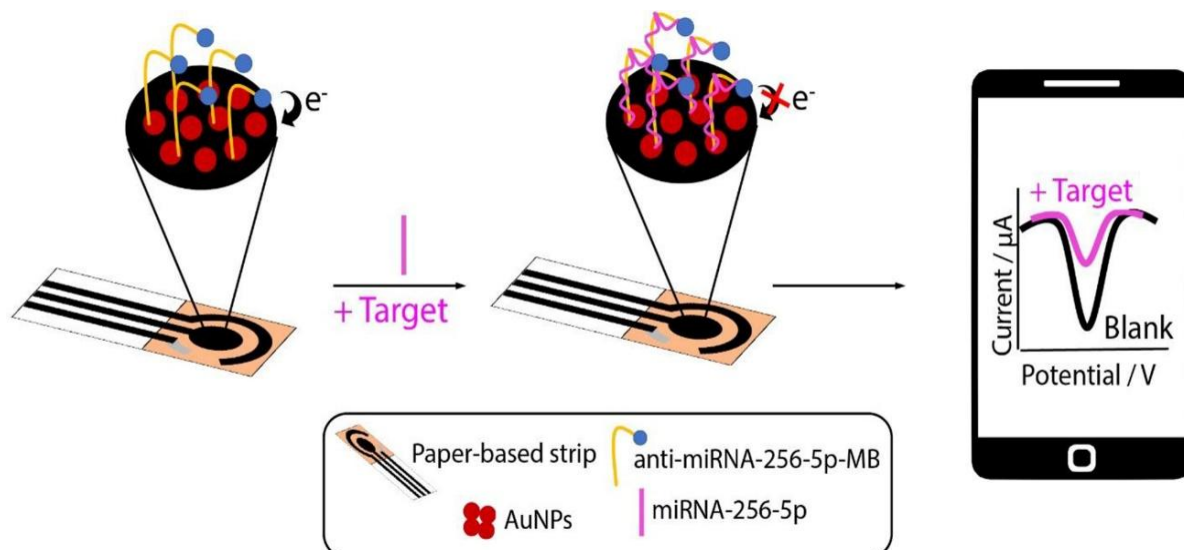


FIGURA 5- Eletrodo serigrafado baseado em papel cromatográfico modificado com AuNP decoradas com uma sonda anti-miRNA-miRNA-652.

1.5.2 Partículas Magnéticas (PMs) em ensaios genômicos

As PMs têm sido exploradas em inúmeros métodos analíticos com aplicação biomédica em razão de suas vantagens intrínsecas como sua propriedade superparamagnética, biocompatibilidade e estabilidade físico-química⁹². Elas são estruturas organizadas de tamanhos variados que possuem um revestimento central e externo, a qual estão associados física ou covalentemente⁹³. O revestimento central é composto por ferro e óxido de ferro, especialmente na

forma magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Já o revestimento externo é constituído de grupos funcionais, como tosila, grupos carboxílicos, amino, epóxi e tiol⁹²⁻⁹⁴.

Dessa forma, como ilustrada na FIGURA 6, a parte central das PMs pode ainda ser revestidas com proteínas, oligonucleotídeos, anticorpos e outras macromoléculas⁹⁵. As PMs decoradas com esses elementos biorreconhedores permite a captura de analitos e, com o controle da força magnética, separá-los de matrizes complexas, pré-concentrando em soluções mais simples de menor volume^{87,89,94,96,97}.

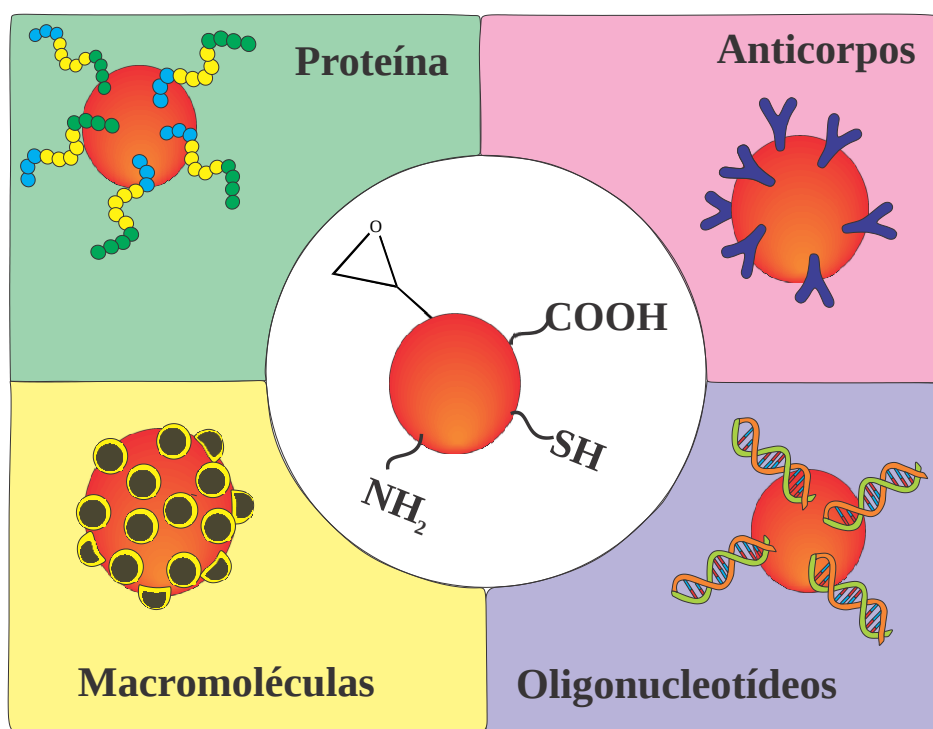


FIGURA 6- Representação esquemática da diversidade de biomoléculas que podem ser ancoradas na superfície de PMs. Fonte: autoria própria.

Isto as torna excelente estratégia para a amplificação dos métodos eletroquímicos, principalmente os que envolvam a detecção e quantificação de miRNA, como evidencia o trabalho de Ozcelikay et al. (2023)⁹⁸. Os autores desenvolveram uma bioplataforma amperométrica capaz de capturar uma sequência específica do papilomavírus humano tipo 16 (HPV16). Neste estudo, as PMs foram decoradas com RNA complementar a sequência alvo, incubadas com o marcador eletroquímico (HRP) e, por fim, atraídas por ímãs para superfície

do eletrodo descartável⁹⁸ (FIGURA 7). Com isso, a bioplataforma antegiu baixos limites de detecção (0,50 pM) e provou seu potencial como método direto, simples, rápido e confiável para triagem preventiva do HPV16⁹⁸.

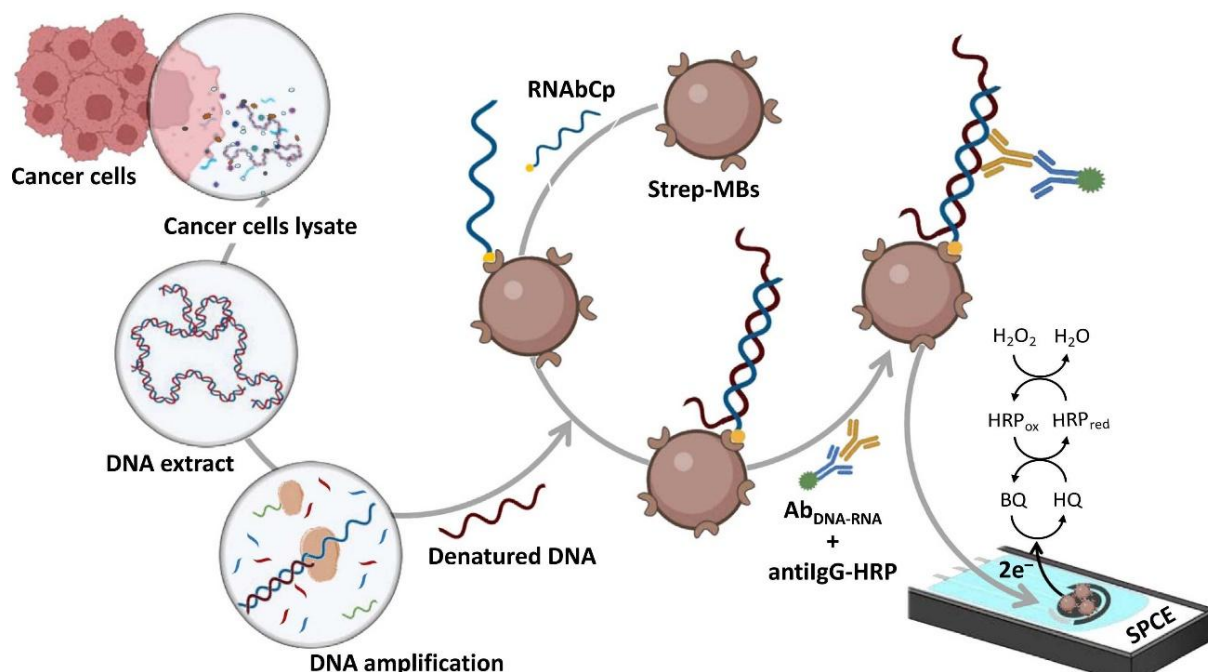


FIGURA 7- Eletrodo serigrafado baseado em papel cromatográfico modificado com AuNP decoradas com uma sonda anti-miRNA-miRNA-652.

Sendo assim, o método desenvolvido nesse trabalho não só garante uma boa sensibilidade através da modificação do eletrodo serigrafado com as AuNPs, como também disponibiliza uma área com elevada condutividade capaz de imobilizar as sondas de DNA. Além disso, o método assegura com as PMs um sistema de detecção eficiente, rápido e com minimização do efeito de matriz. Fora que, os eletrodos são facilmente confeccionados e utiliza materiais comerciais de baixo custo.

Além disso, ao contrário das técnicas padrão-ouro, o método proposto apresenta protocolos experimentais mais simples de fácil execução, não necessitando de pessoal especializado. Os equipamentos utilizados na obtenção da resposta analítica são mais baratos quando comparado aos utilizados na técnica de RT-PCR e nos exames de imagem. Contudo, o método genomagnético

associa as vantagens dos eletrodos descartáveis modificados com AuNPs com as PMs a fim de obter um sistema ultrasensível capaz de detectar o miRNA-208b em amostras de soro humano sem a necessidade de quaisquer etapas de preparação de amostras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- ✓ Desenvolver um método eletroanalítico utilizando eletrodos descartáveis serigrafados e partículas magnéticas modificadas com sondas de DNA para detecção e quantificação do miRNA-208b em amostras de soro de pessoas com problemas cardíacos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Modificar as partículas magnéticas com as sondas de DNA (*hairpin*);
- ✓ Realizar estudos de otimização quanto a melhor condição de temperatura e tempo de desnaturação da sonda;
- ✓ Modificar a superfície dos eletrodos com nanopartículas de ouro e a sonda de detecção;
- ✓ Avaliar o método em função da resposta de corrente de pico catódico em função da concentração do alvo e obtenção das figuras de méritos;
- ✓ Avaliar a aplicabilidade do método em amostras de soro de pacientes com doenças que desencadeiam problemas cardíacos;
- ✓ Realizar estudos de estabilidade e especificidade do sistema desenvolvido.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação e materiais

Para fabricação dos eletrodos descartáveis foram usadas as tintas de carbono da Electrodag (Düsseldorf, Alemanha) e a de prata/cloreto de prata da Gwent Electronic Materials (Pontypool, Reino Unido), quanto aos substratos de poliéster e cartões adeviso dupla faces foram adquiridos em comércio local da cidade de São Carlos-SP. Os layouts foram projetados e recortados pela impressora de recorte Silhouette™ modelo Cameo (Silhouette, Brasil) gerenciada pelo software Silhouette Studio v. 4.

Todos os protocolos eletroquímicos foram realizados com um multipotenciostato portátil da Dropsens (modelo μ Stat 8000), usando a voltametria cíclica e amperometria para aquisição de dados que, por sua vez, foram processados pelo software DropView 8400. As imagens do eletrodo foram feitas pelo microscópio eletrônico de varredura (MEV) Hitachi modelo S-4800 e das partículas magnéticas pelo microscópio eletrônico de transmissão (MET) da FEI Tecnai G2 F20 X-twin 200KV. As soluções aquosas preparadas em todas as etapas do método foram feitas com água ultrapura do sistema Millipore Milli-Q (18,2 M Ω cm a 25 °C) (Before, EUA). O controle de pH foi feito com o pHmetro da Digimed DM20. A absorbância das nanopartículas de ouro foi analisada pelo espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-Vis) da marca Shimadzu modelo UV-2550 utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

3.2 Reagentes e soluções

As sondas de captura (*hairpin*), detecção, sequências interferentes e primers (Tabela 1) foram adquiridas pela Integrated DNA Technologies, enquanto as partículas magnéticas funcionalizadas com carboxil (ácido carboxílico Dynabeads MyOne com diâmetro de 1 μ m e concentração em 10 mg L⁻¹ foram adquiridas pela Thermo Fisher Scientific. O N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil) cloridrato de carbodiimida (EDC), N -hidroxisuccinimida

(NHS), peroxidase de raiz-forte (HRP, do inglês *Horseradish Peroxidase*) solução de poli(cloreto de dialildimetilamônio) (PDDA), ácido cloroáurico (HAuCl_4 , 99,9%), L-glutathiona reduzida, NaBH_4 , albumina de soro bovino (BSA), cloridrato de tris[hidroximetil]-aminometano (TRIS), H_2O_2 30% (p/v), hidroquinona (HQ), ditioneitol (DTT) foram adquiridos pela Sigma Aldrich.

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS), (fosfato 100 mM, NaCl 137 mM e KCl 2,7 mM), pH= 6,5. Todos os ensaios de hibridização foram realizados em tampão NE 1X (NaCl 0,2 M, Tris-HCl 0,1 M, MgCl_2 0,2 M, DTT 10 mM) e lavados com tampão TE-Tween20 (Tris-HCl 10 mM e 1 mM EDTA) em pH=8,0. A incubação da HRP na partícula magnética foi feita em tampão fosfato em pH=7,4 por 30 minutos em agitação lenta.

TABELA 1- Sequências de oligonucleotídeos utilizados para o desenvolvimento do método genômico.

Oligonucleotídeos	Sequências (5'para 3')
Hairpin/ Sonda de captura	*5AmMC6/GACCGACAAACCTTTTG TTCGTCT TATAACATGATACGGTC
Sonda de detecção	*5AmMC6/GACCGTATCATGTT
Alvo (miRNA-208b)	ATAAGACGAACAAAAGGTTTGT
Interferente (miRNA-222)	AGCTACATCTGGCTACTGGGT
Interferente (miRNA-29b)	TAGCACCATTGAAATCAGTGTT
Interferente (miRNA-205)	TCCTTCATTCCACCGGAGTCTG
Interferente (miRNA-221)	AGCTACATTGTCTGCTGGGTTTC
U6 SnRNA Forward	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6 SnRNA Reverse	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miRNA-208b Forward	TTGCTCGAATTATGTTTCTGATCC
miRNA-208b Reverse	CTGCCCTCAGACAAACCTT

* A sonda de detecção e o hairpin têm um grupo amino (NH_2) na extremidade 5'

3.3 Síntese das nanopartículas de ouro com glutathione (AuNPs-GHS)

A síntese das AuNPs, como esquematizada na FIGURA 8, foi baseada no experimento realizado por Zheng e Huang⁹⁹. Nesse procedimento as AuNPs são obtidas com glutathione a qual em sua estrutura possui grupos carboxílicos livres capaz de ancorar outras biomoléculas. Dessa forma, com esse procedimento o eletrodo de trabalho foi modificado com AuNPs possibilitando a bioconjugação da sonda de detecção com a superfície do eletrodo.

As AuNPs-GHS foram sintetizados a partir da redução do ouro, obtido de uma solução de HAuCl_4 , na presença de borohidreto de sódio e glutathione, o que resulta em nanopartículas com diâmetro médio de 16,0 a 18,0 nm. Para isso, 79,0 mg de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 308 mg de glutathione foram pesados e dissolvidos em uma mistura de 12,0 mL de metanol e 2,00 mL de ácido acético, originando uma solução com coloração amarela.

Então, a esta solução foi adicionado lentamente 20,0 mL de borohidreto de sódio ($20,0 \text{ mg mL}^{-1}$) com agitação por 2h. Finalmente, a solução resultante de coloração roxa foi filtrada através de uma membrana de nitrocelulose de 50,0 kDa e centrifugada a 3500 rpm. O precipitado resultante da centrifugação foi lavado quatro vezes com água e ressuspenso em 15,0 mL de tampão HEPES ($20,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH}=8,0$). As AuNPs-GHS foram dispersas em água ultrapura e caracterizadas por espectroscopia UV-Vis varrendo de 200 a 700 nm.

Cabe ressaltar que a síntese das AuNPs resultou em 15 mL de solução coloidal, que logo foi alíquotada em microtubos de 500 μL para evitar contaminação da solução estoque. O volume resultante dessa síntese foi suficiente para o desenvolvimento desse trabalho.

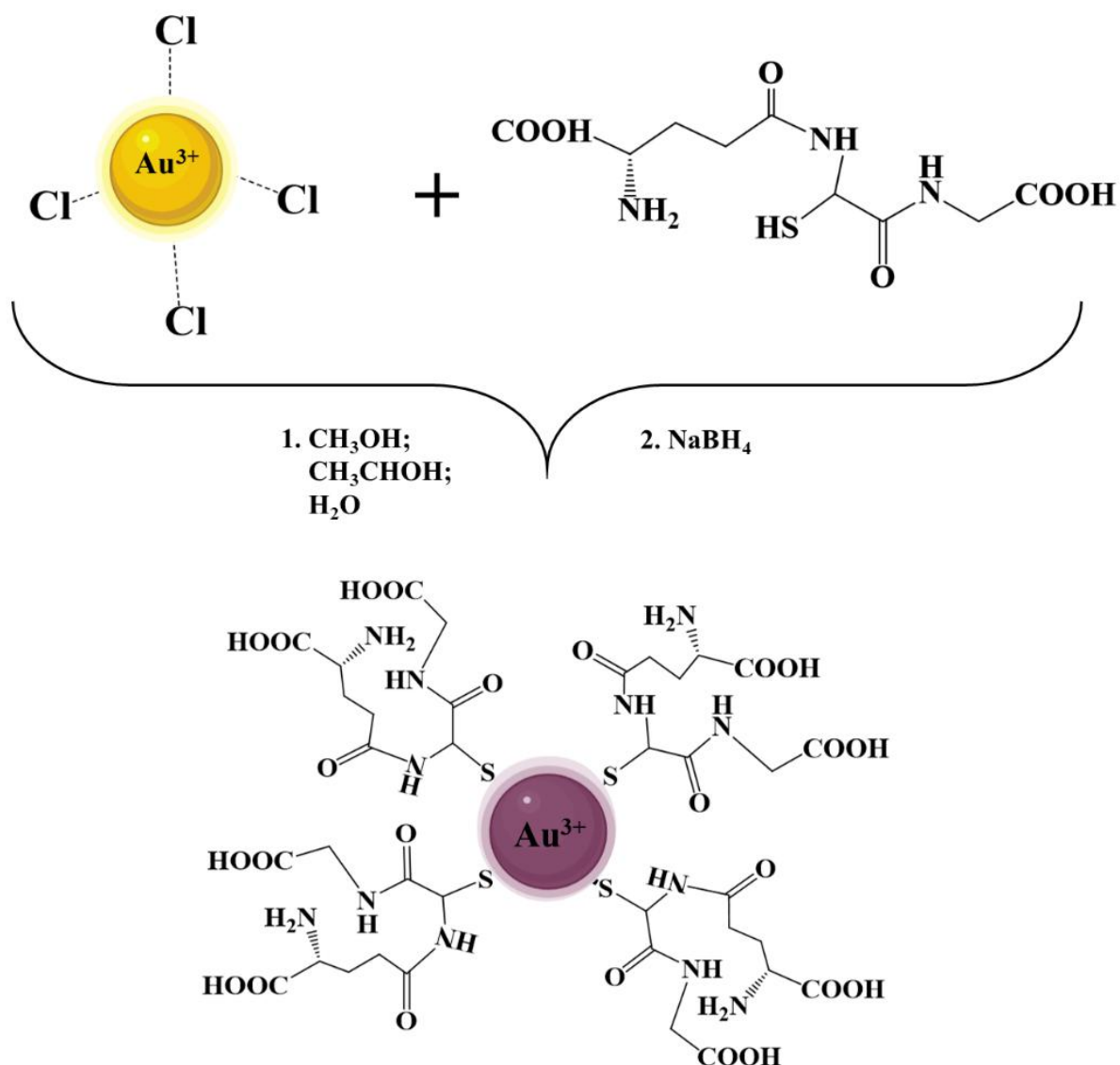


FIGURA 8- Síntese das AuNPs decoradas com glutationa (AuNPs-GHS), Fonte: autoria própria.

3.4 Fabricação do dispositivo microfluídico contendo eletrodos de carbono

A plataforma de transdução é constituída de um arranjo de oito células eletroquímicas independentes que foram impressas em um substrato de poliéster (PET). Inicialmente o arranjo de eletrodo foi desenhado no software Silhouette Studio e recortado pela Silhouette Cameo em uma base de vinil adesivo. O recorte do vinil quando sobreposto em uma folha de poliéster produz uma cavidade, que posteriormente é preenchida com a tinta condutora de carbono.

Após a cura da tinta, o vinil é retirado da folha de poliéster e assim o eletrodo é impresso sobre a folha de PET.

A cura da tinta de carbono foi feita em uma estufa (Solab) com temperatura em 90 °C por 30 min. Como ilustrado na FIGURA 9, a produção dos eletrodos de referência seguiu o mesmo procedimento anterior, desta vez, antes da retirada do vinil da folha de PET, com o auxílio de um pincel é aplicado a tinta de Ag/AgCl na região onde configura o eletrodo de referência.

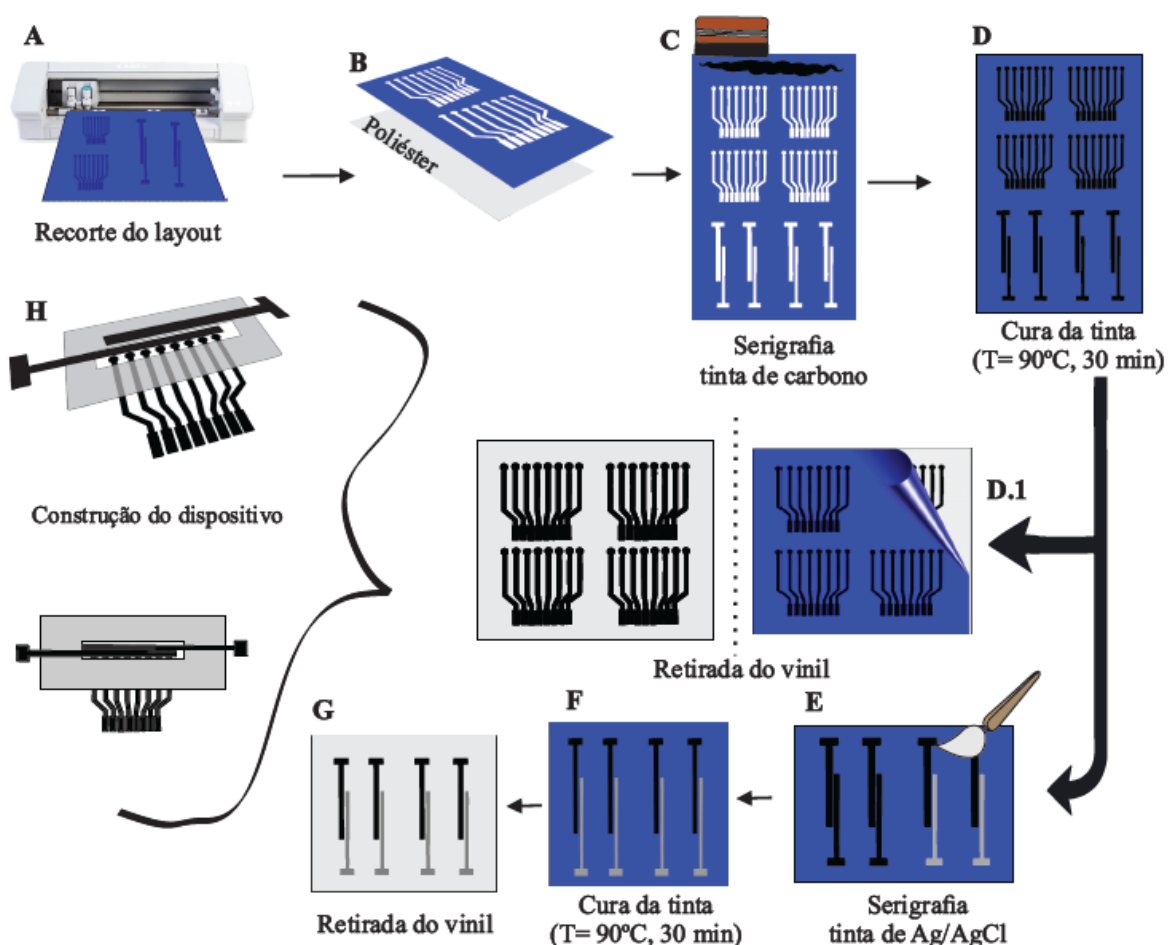


FIGURA 9- Representação esquemática da fabricação dos eletrodos descartáveis. A) Recorte do adesivo de baixa aderência com impressora de recorte. B) Sobreposição do vinil a folha de PET. C) Serigrafia dos eletrodos com tinta de carbono. D) Cura dos eletrodos. D.1) Remoção do adesivo. E) Aplicação da tinta Ag/AgCl. F) Cura da tinta de Ag/AgCl. G) Remoção do adesivo vinílico. H) Construção do dispositivo microfluídico.

Por fim, após as modificações e reações de bioreconhecimento realizadas no eletrodo de trabalho, uma máscara retangular de adesivo dupla face também desenhada e recortada pela Silhouette Cameo é justaposta sobre o arranjo

de eletrodo. A máscara adesiva delimita a área geométrica dos eletrodos de trabalho, bem como o volume do canal microfluídico.

3.4.1. Modificação do eletrodo de trabalho

Para a modificação do eletrodo de trabalho, inicialmente, uma alíquota de 3,00 μL da solução de PDDA em NaCl ($2,00 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adicionada sobre a superfície do eletrodo de trabalho e mantida por 20,0 min. Na sequência, o eletrodo foi lavado com tampão TE (Tris-HCl, $\text{pH}=8,00$) e seco a temperatura ambiente ($25\text{-}28^\circ\text{C}$). Posteriormente, foi adicionando 3,00 μL da solução coloidal de AuNPs-GHS e mantida por 20,0 min em câmara úmida, para a adsorção eletrostática dessas nanopartículas na superfície do eletrodo. Após isso, o excesso de nanopartículas foi removido com tampão de lavagem e seco a temperatura ambiente entre 25 a 28°C .

A modificação do eletrodo com a sonda de detecção foi mediada pela solução mista recém preparada de EDC/NHS (4:1) em tampão MES ($25,0 \text{ mmol L}^{-1}$, $\text{pH}=4,80$) por 10,0 min, a qual proporcionou a formação de ligação covalente entre os grupos carboxílicos presentes nas AuNPs com o grupamento amino da sonda de detecção, como mostra a FIGURA 10A.

As AuNPs-GHS sintetizadas possuem a superfície dotada de grupos carboxílicos, os quais se ligam com o EDC por meio da ligação carboiimida e produz o intermediário *o*-acilisourea¹⁰⁰. Este intermediário é instável, portanto, subsequentemente pode converter-se em outros subprodutos¹⁰¹. Por isso, utiliza-se o NHS a fim de produzir um intermediário estável e reativo à amina presente nas sondas de DNAs. O NHS é capaz de substituir o EDC e produzir um éster succinimidil, que facilmente é deslocado em um ataque nucleofílico da amina primária^{100,101}. Isto resulta na formação de uma ligação amida covalente que, por sua vez é responsável pela imobilização da sonda de detecção na superfície do eletrodo.

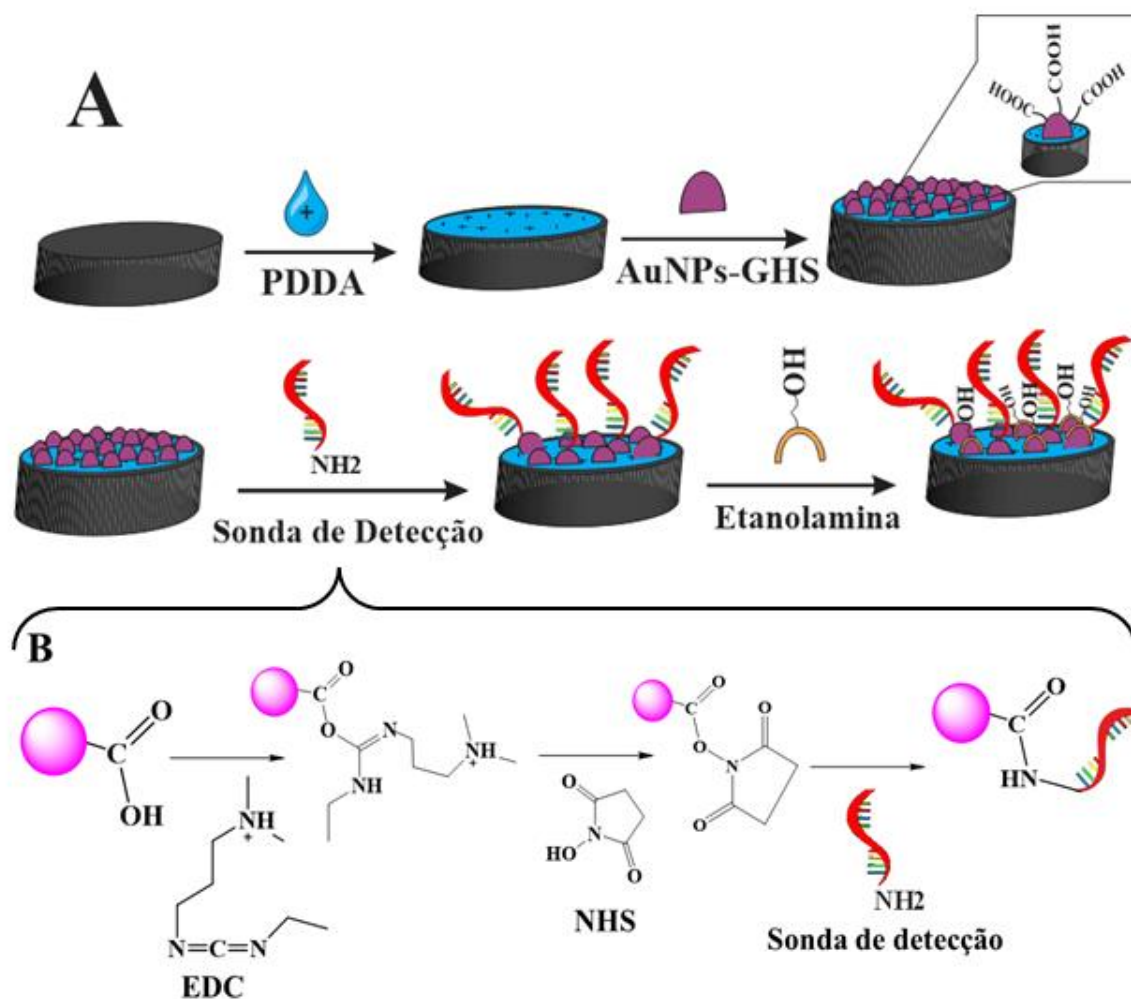


FIGURA 10- A) Representação esquemática da modificação do arranjo de eletrodo pela formação da bicamada de PDDA e AuNPs, ativação dos grupos carboxílicos com EDC/NHS seguida da imobilização da sonda de detecção. B) Mecanismo de reação da imobilização da sonda de detecção na superfície do eletrodo de trabalho.

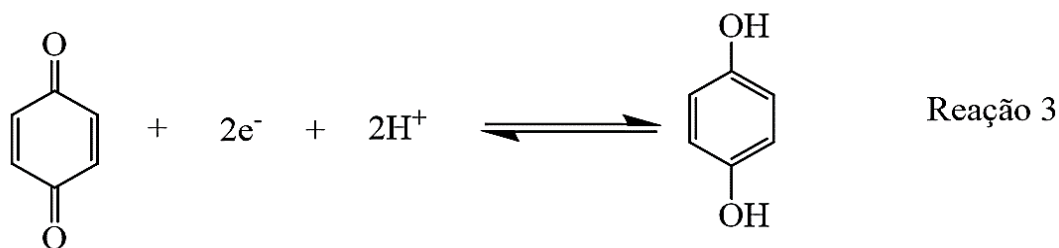
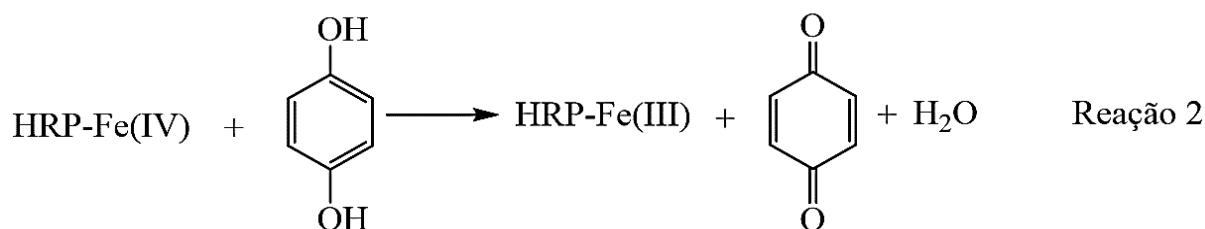
Após a ativação dos grupos carboxílicos, a superfície é lavada com tampão TE e em seguida pipeta-se 3,00 μL da sonda de detecção ($2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$) na superfície do eletrodo, o qual posteriormente é armazenado em câmara úmida e deixado em overnight por 12h a -4°C . Para evitar a imobilização de biomoléculas inespecíficas na superfície do eletrodo, retira-se com tampão de lavagem o remanescente da sonda de detecção e pipeta-se 3,00 μL da solução bloqueadora de etanolamina ($0,80 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}=8,00$) por 1,00 hora.

3.5. Estudo eletroquímico do marcador enzimático

O método eletroquímico desenvolvido neste estudo utiliza a reação catalítica da HRP para sinalizar a detecção do miRNA-208b. Neste caso, a enzima foi ancorada na PM devido sua conjugação com estreptavidina, a qual possui como característica a formação de uma ligação rápida e forte com a biotina imobilizada na PM^{102,103}.

Dessa forma, conforme esquematiza a FIGURA 13, o recobrimento da PM com o marcador enzimático contribui para a amplificação do sinal analítico, pois mesmo com o mínimo evento de ligação entre o hairpin ancorado na PM e a sonda de detecção imobilizada no eletrodo, uma área superficial extensa e dotada de HRP resultará em resposta analítica significativa.

O ciclo catalítico da enzima ocorre na presença do H_2O_2 , a qual oxida o sítio ativo da enzima e produz um composto intermediário (HRP-Fe(IV))¹⁰⁴ como demonstra a reação 1. Esse intermediário é consumido na presença da HQ que restitui a HRP-Fe(III) na sua forma nativa e produz a BQ (Reação 2)¹⁰⁴. A aplicação de -0,25 V utilizando a técnica de amperometria irá promover a redução da BQ em HQ^{103,105,106}, fornecendo assim uma resposta eletroquímica que será proporcional à concentração do miRNA-208b.



3.5.1. Estudo da composição da solução carregadora do canal microfluídico

A enzima HRP com estreptavidina, preparada em tampão PBS (1:1000 (v/v), pH=7,4), foi avaliada frente a quatro soluções, a saber: tampão PBS (10,0 mmol L⁻¹, pH=6,5); hidroquinona (2,00 mmol L⁻¹); peróxido de hidrogênio (1,00 mmol L⁻¹) e a mistura de hidroquinona com peróxido de hidrogênio preparada em tampão PBS (10,0 mmol L⁻¹, pH=6,5).

As soluções foram injetadas separadamente e misturadas com a enzima preparada em PBS (pH=6,5) antes de cada medida eletroquímica, portanto, quatro dispositivos foram reservados para o este estudo. Com o canal preenchido com a enzima e a solução em estudo, observa-se a corrente catódica da solução final a medida em que o potencial varia de 0 V a -0,65 V com velocidade de varredura em 50 mV e amplitude em 5 mV.

3.5.2. Estudo da superfície modificada e área eletroativa

Os experimentos eletroquímicos foram realizados mimetizando o sistema proposto neste trabalho, utilizando o ciclo catalítico da enzima HRP na presença do substrato e mediado pela HQ. O ensaio foi executado no dispositivo com arranjo de oito células eletroquímica com o eletrodo auxiliar e o de pseudo Ag/AgCl como eletrodo de referência. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas em tampão PBS (pH=6,5), a qual foi previamente purgado com gás nitrogênio e misturado a HRP (1:1000, v/v), 1,00 mmol L⁻¹ de H₂O₂, 2,00 mmol L⁻¹ de HQ e 0,10 mmol L⁻¹ de KCl como eletrólito de suporte. As varreduras voltamétricas foram obtidas em uma faixa de potencial de 0 V a -0,65 V, com uma taxa de varredura em 50 mV/s.

3.6. Bioconjugação das partículas magnéticas e do eletrodo modificado

As partículas magnéticas com grupos carboxílicos foram modificadas por intermédio da solução de EDC/NHS formando uma ligação covalente com o *hairpin* e a biotina, ambos modificados com grupamento amino. Para isto, uma alíquota de 100 μ L da solução estoque das partículas magnéticas foi adicionada em um microtubo colocada em estante magnética. O sobrenadante resultante foi retirado e em seguida as partículas magnéticas foram lavadas três vezes, ressuspensando-as com tampão MES (pH=4,8). Na sequência, 1 mL da solução contendo a sonda de captura (*hairpin*) e a biotina-PEG preparada em EDC/NHS (4:1) foi adicionada a dispersão das partículas magnéticas. Após isso, o microtubo contendo as partículas magnéticas foi deixado durante a noite sob agitação suave a temperatura ambiente. Após esta etapa de incubação, o remanescente de reagente não imobilizado nas PMs foi removido, separando novamente as partículas do seio da solução utilizando a estante magnética. Na sequência, ressuspendeu-se as PMs em tampão TE-Tween20 para a etapa de hibridização com o marcador enzimático, como mostra a FIGURA 11.

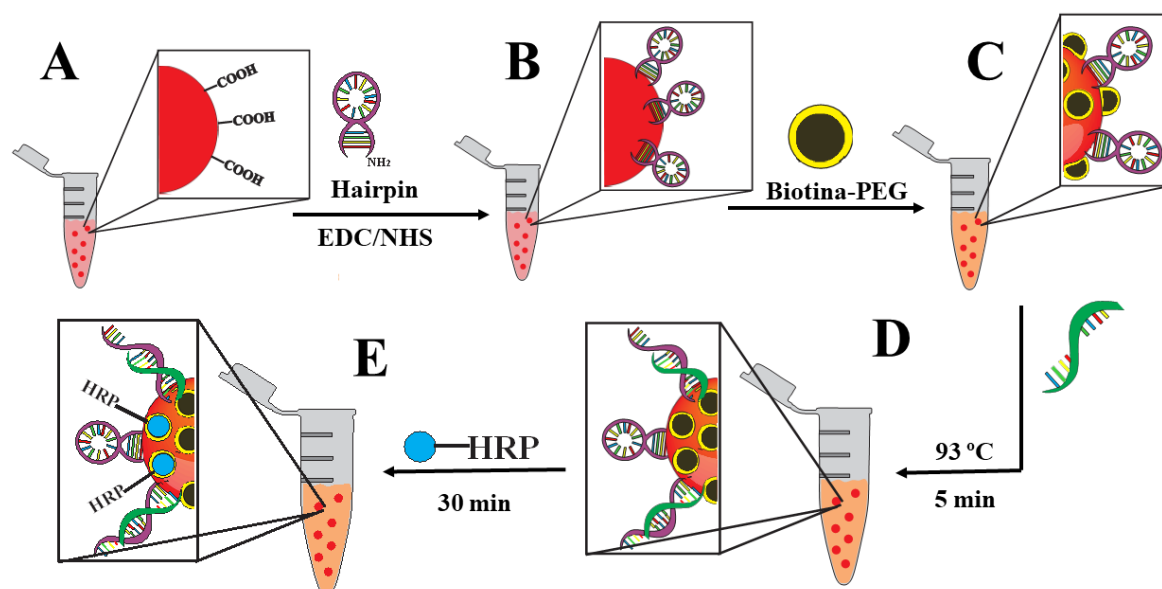


FIGURA 11- Esquema representativo das etapas de bioconjugação da PM com A) *hairpin* e B) biotina, bem como D) hibridização com o alvo e E) incubação das PMs com o marcador eletroquímico.

Para a hibridização, em um microtubo foi adicionado uma alíquota de 20 μL da solução contendo a PM decorada com o *hairpin* e biotina diluída em 180 μL de NE 1X contendo o alvo na concentração desejada. Em seguida, o microtubo foi aquecido em temperatura a ser determinada sob agitação. Após o resfriamento do microtubo, este foi colocado em uma estante magnética para separar as PMs e remoção do material genético não hibridizado. Feito isso, as PMs foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e ressuspensas em tampão salino PBS (pH= 7,40) contendo HRP na proporção de 1:2000 e 1% de BSA, incubando por 30 min em rotação lenta. Por fim, as PMs foram novamente separadas magneticamente, lavadas para a retirada do excedente da enzima e ressuspensas em 60 μL de tampão salino.

3.6.1. A influência da Biotina-PEG

A modificação da PM com o hairpin e a biotina-PEG descrita neste item indica que ambos os reagentes foram imobilizados diretamente nas PMs, logo, a proporção entre eles também foi avaliada. Para isso, varia-se a concentração de biotina em 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,00 mmol L^{-1} e fixa-se a concentração de hairpin em 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Neste caso, o procedimento experimental e parâmetros iniciais, como a quantidade de sonda de detecção na superfície do eletrodo (2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$), temperatura e tempo de desnaturação do hairpin em 83°C por 10 min foram pré-estabelecidos e fixados.

3.6.2 Temperatura e tempo de desnaturação do hairpin

A desnaturação térmica foi usada para a abertura do hairpin, a qual na presença da sequência alvo ocorrerá a hibridização na região complementar, quando do resfriamento da solução. Para a otimização da temperatura, o protocolo experimental da seção 3.6.1 foi repetido, fixando a concentração de biotina-PEG em 1 mmol L^{-1} e variando a temperatura em intervalos de 10 °C por 10 min.

Novamente o protocolo da seção 3.5.1 foi repetido para avaliar o tempo de desnaturação, desta vez, a temperatura permanece fixa em 93 °C, variando apenas o tempo em 5, 10, 20 e 30 min.

3.6.3 Estudo da concentração e do tempo de incubação do hairpin na PM.

Para este estudo, alíquotas iguais da dispersão das PMs foram adicionadas em microtubos de 1 mL e lavadas com tampão MES. Na sequência foram ressuspensas e adicionado biotina-PEG e harpin na concentração de interesse. A concentração de hairpin estudada foi de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A desnaturação da sonda de captura em solução ocorreu por aquecimento a 93 °C durante 5 min. A concentração da sonda de detecção na superfície do eletrodo se manteve constante ao protocolo das seções anteriores.

3.6.4 Análise da concentração da sonda de detecção e o tipo de solução bloqueadora na modificação eletrodo

A modificação do eletrodo foi feita conforme a seção 3.5.1 variando apenas a concentração de sonda de detecção de 0,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 8 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Após a imobilização do material genético, o eletrodo foi lavado e incubado com a solução bloqueadora por 1 h. As soluções de etanolamina (0,8 mol L⁻¹, pH=8,0) e BSA 1%, preparadas em tampão salino PBS foram avaliadas com relação seu potencial em bloquear os grupos carboxílicos livres capazes de ancorar biomoléculas inespecíficas.

3.7 Etapas envolvidas no método genômico

Após as bioconjugações na PM e a hibridização com o alvo, as partículas magnéticas são lavadas com tampão TE-Tween20 e separadas em uma estante magnética. Em seguida, mistura-se as PMs com a enzima HRP, diluída em tampão PBS (pH= 7,4) na proporção de 1:2000 (v/v) contendo 0,1% de Tween20

e 1% de BSA, por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, com os eletrodos previamente modificados é depositado as PM em sua superfície por 40 min em câmara úmida a 27 °C. Na sequência, o eletrodo foi lavado com 30 μ L do tampão PBS-Tween20 (pH=7,4) e seco para retirada do excedente de PM que não se ligou na superfície do eletrodo. Finalmente, com uma face da máscara adesiva dupla face delimitando a área eletroativa do eletrodo e a sobreposição do pseudo referência e auxiliar na outra face, é então confeccionado o dispositivo eletroquímico descartável como mostra a FIGURA 9G.

O sistema microfluídico consiste em um dispositivo descartável que apresenta um orifício em cada extremidade do canal microfluídico a qual permite a entrada e saída da solução. Em cada orifício é plugado um tubo de poliéter-éter-cetona (PEEK), sendo uma extremidade conectada a injeção manual, por onde entra a solução no canal, e a outra é conectada a um reservatório, por onde é coletado o resíduo do interior do canal, como exemplifica a FIGURA 12B. A Figura 12A mostra as dimensões do canal microfluídico e com a espessura do cartão adesivo em torno de 1 mm presume-se que o volume para o preenchimento do canal seja em média 227 μ L.

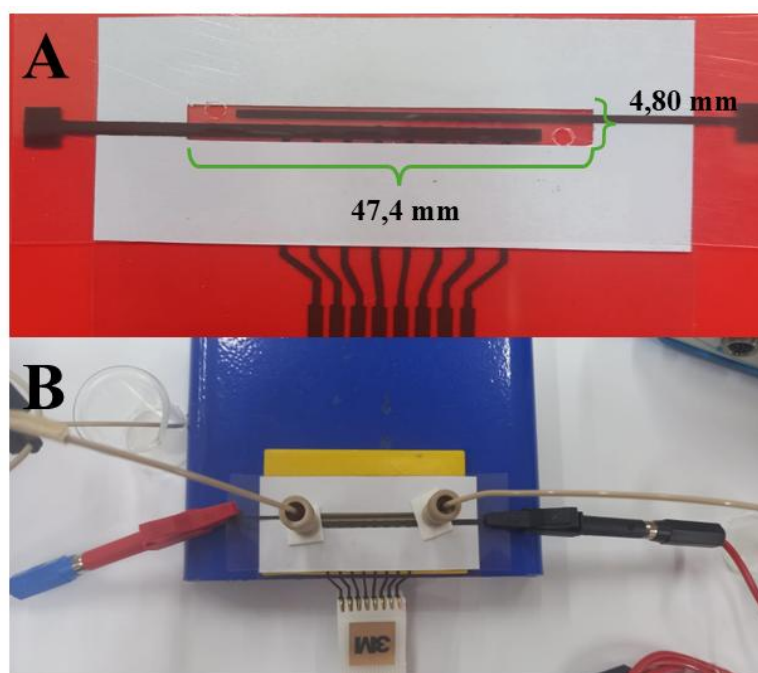


FIGURA 12- A) Representação do dispositivo descartável com dimensões do canal microfluídico e B) Dispositivo descartável conectado ao sistema microfluídico.

A injeção é ligada a um loop de 100 μL e conectada a uma bomba de seringa com vazão ajustada em 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, a qual bombeia a solução carregadora para dentro do canal microfluídico. A detecção eletroquímica do miRNA-208b foi realizada por amperometria aplicando-se um potencial fixo de $-0,25\text{ V}$ versus pseudo eletrodo de referência Ag/AgCl. Com uma agulha de ponta cega foi injetado 100 μL da solução mista de $1,00\text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 e $2,00\text{ mmol L}^{-1}$ de HQ na injeção e ao girar a válvula no modo inserção é registrado a corrente transiente cuja intensidade de pico é proporcional à concentração do miRNA-208b. A solução mista de HQ e H_2O_2 foi previamente purgada com gás nitrogênio antes de cada injeção. O sinal de corrente apresentado nos resultados deste trabalho foi subtraído do sinal de corrente correspondente ao branco, como esquematizado na FIGURA 13.

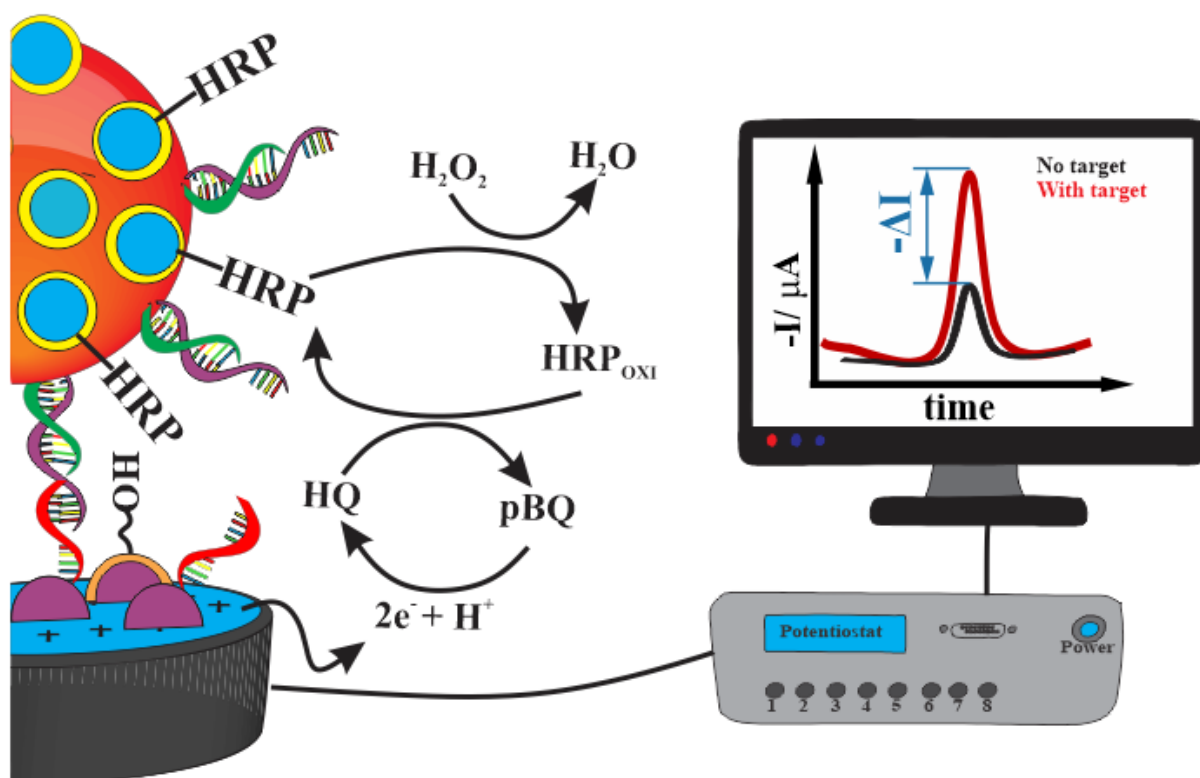


FIGURA 13- Esquema ilustrativo do sistema de detecção do miRNA-208b utilizando eletrodo modificado com sonda de detecção e as PMs decoradas com o hairpin e biotina, bem como o ciclo catalítico da enzima HRP mediado pela HQ para obtenção dos amperogramas em função da concentração do miRNA-208b.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos nanomateriais e bioconjugados obtidos

A microscopia eletrônica de varredura foi usada para avaliar a morfologia da superfície do eletrodo modificado e não modificado. Como demonstrado na FIGURA 14A, a superfície do eletrodo apresenta uma quantidade significativa de poros, os quais são facilmente identificados pela existência de regiões escuras na imagem. Após a modificação com AuNPs observa-se a superfície recoberta de pontos brancos, isto se deve a modificação com o PDDA que quando seco, junto ao seu contra-íon, forma cristais de carga positiva que fortemente atrai as AuNPs para a superfície do eletrodo¹⁰⁷ (FIGURA 14C). O PDDA funciona como um agente dispersante que, por se tratar de um íon catiônico, dispersa cargas positivas sobre o eletrodo inibindo a repulsão entre camadas negativas a qual favorece a formação de camadas auto-organizadas^{108,109}.

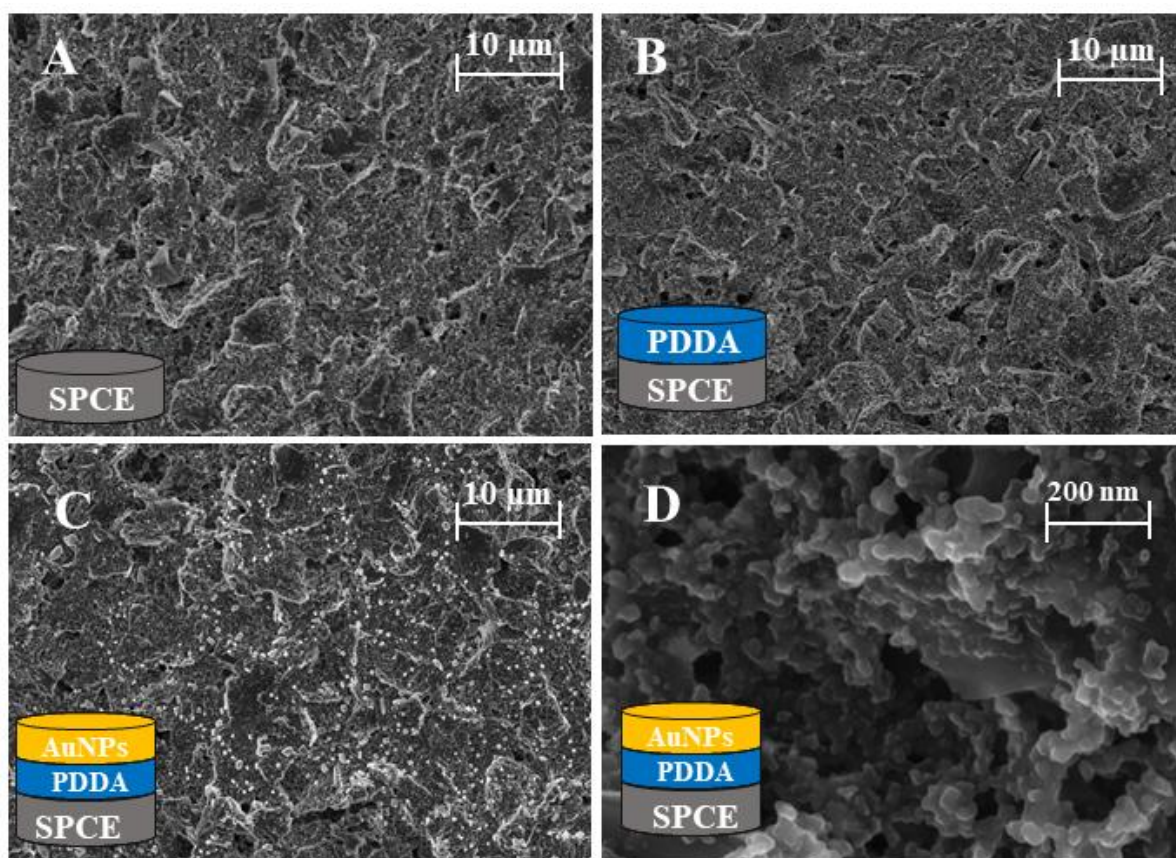


FIGURA 14- Imagens de MEV do eletrodo de trabalho: a) eletrodo sem modificação e b) PDDA, c) e d) AuNPs.

A efetiva modificação do eletrodo carregado negativamente utilizando as AuNPs-GHS repleta de grupos funcionais com ligação do tipo π , demonstrado na FIGURA 14C e 14D confirma o efeito dispersante do PDDA. Apesar da modificação com AuNPs-GHS ter apresentado uma melhora na área eletroativa demonstrado pelos estudos eletroquímicos, com a análise morfológica não é possível observar nitidamente uma diferença significativa da superfície. Isso pode estar vinculado a porosidade da superfície ocasionada pelas tintas comerciais. Assim como este trabalho, Barich et al., (2024)¹¹⁰ também utilizou tintas comerciais para serigrafia do eletrodo e em sua caracterização morfológica evidencia o percentual significativo de cloretos (Cl^-) na composição da tinta, deduzindo a existência de uma superfície carregada negativamente.

A rugosidade da superfície do eletrodo serigrafado utilizando a microscopia de força atômica (AFM) atesta a efetividade da modificação. Considerando uma superfície bastante rugosa e irregular, a rugosidade é expressa em termo de rugosidade média quadrática (RMS), pois assim é possível obter um desvio padrão de todas as alturas da região analisada.

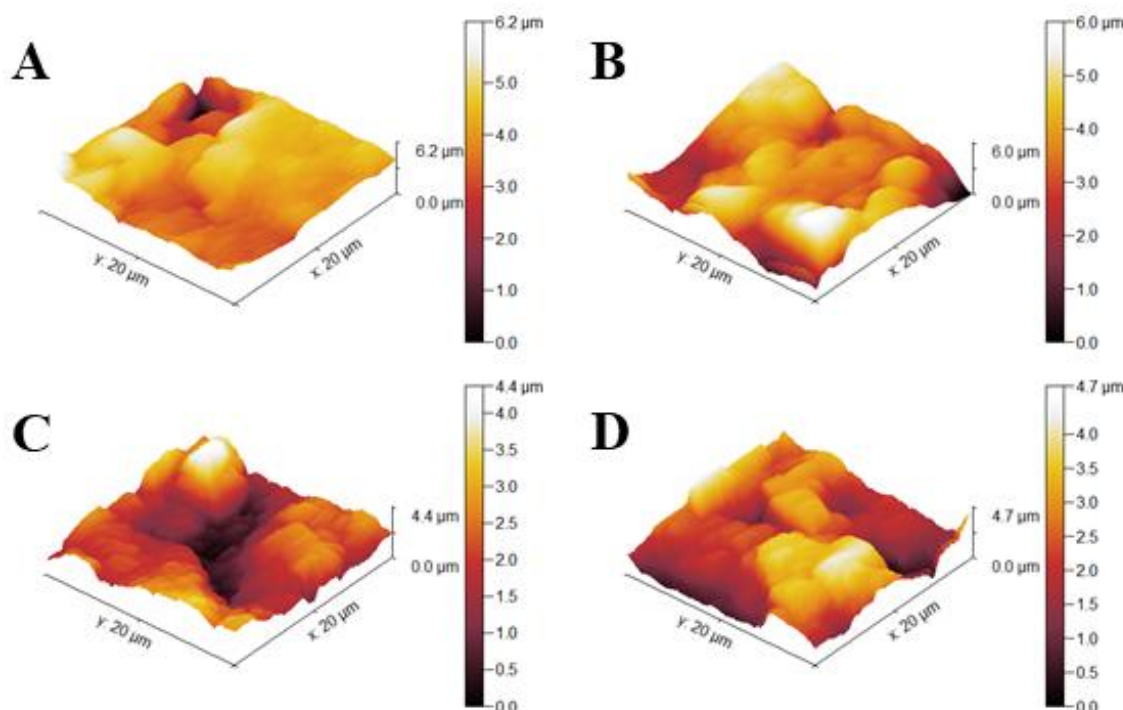


FIGURA 15- Imagens de AFM em modo tapping: A) eletrodo serigrafado não modificado e modificado com B) PDDA, C) PDDA/AuNPs-GHS e D) PDDA/AuNPs-GHS/ sdDNA.

Como observado nas imagens de MEV da FIGURA 14A e 14B, a superfície não apresenta uma mudança morfológica significativa, o que corrobora com a mínima variação da RMS do eletrodo não modificado e modificado com PDDA que apresentaram RMS em torno de $0,97 \pm 0,39 \mu\text{m}$ e $0,93 \pm 0,30 \mu\text{m}$, respectivamente (FIGURA 15). No entanto, somente com a modificação com as AuNPs-GHS obtêm-se uma superfície menos rugosa, apresentando uma RMS em $0,82 \pm 0,25 \mu\text{m}$, corroborando mais uma vez com as imagens de MEV. Dessa forma, é construído um dispositivo serigrafado com superfície nanoestruturada a qual possibilita infinitas estratégias de imobilização de biomoléculas.

A microscopia eletrônica de transmissão (TEM), bem como a espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) foram técnicas empregadas na caracterização das partículas magnéticas e nanopartículas de ouro com glutatona, respectivamente. A FIGURA 16 mostra o formato esférico e tamanho similar entre as partículas magnéticas.

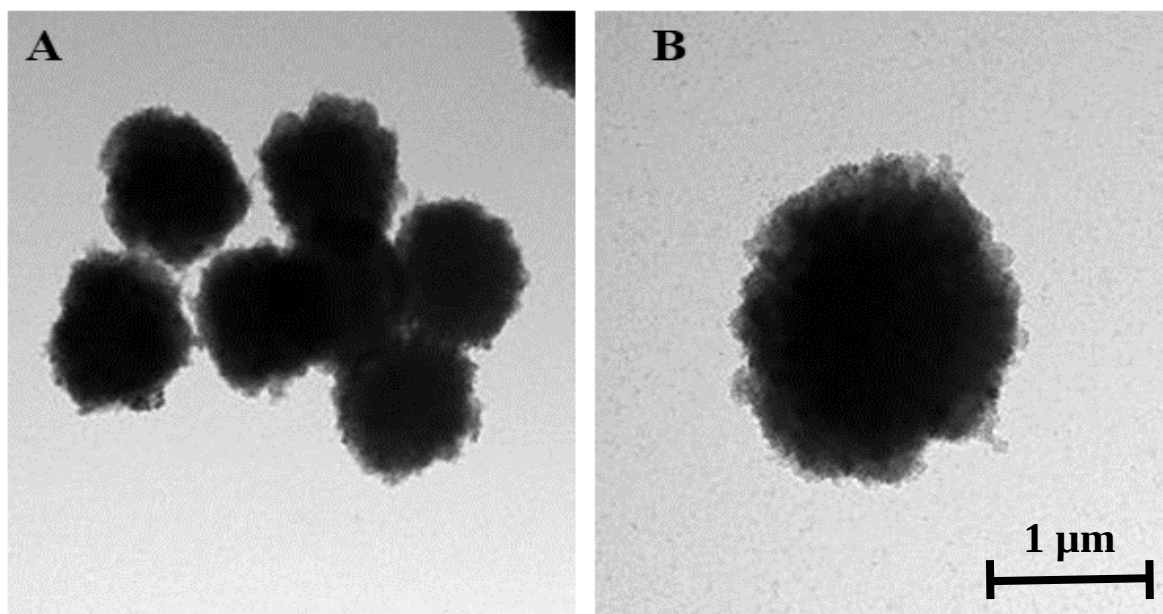


FIGURA 16- Imagens de MET realizada das PMs funcionalizadas com grupos carboxílicos.

A dispersão de AuNPs-GHS em água ultrapura foi caracterizada por espectroscopia UV-Vis, varrendo de 200 a 700 nm. A FIGURA 17 apresenta uma banda de absorção em 520 nm, característica peculiar das AuNPs em análises de ressonância plasmônica de superfície (A_{SPR})¹¹¹.

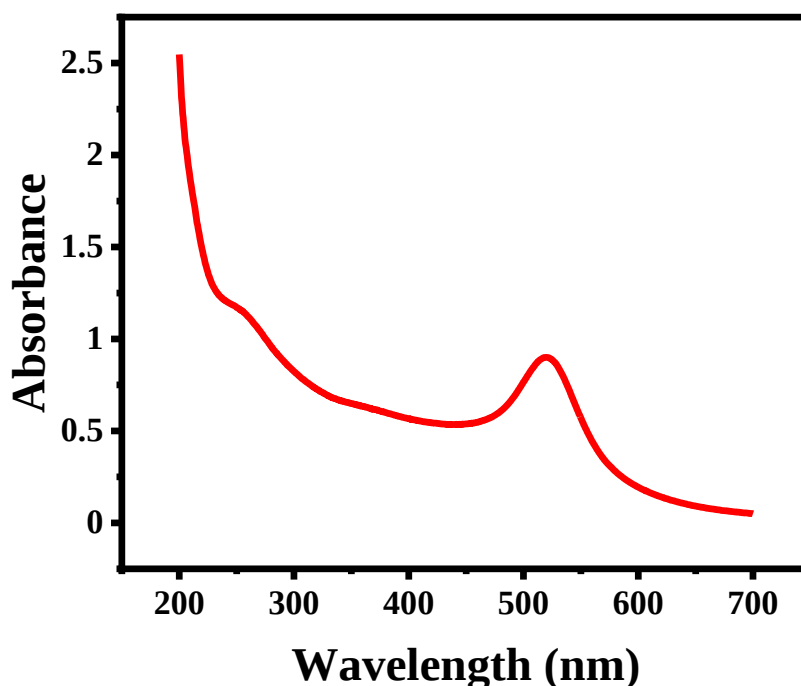


FIGURA 17- Espectro de absorção UV-Vis das AuNPs-GHS diluídas em água usando uma cubeta de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

Baseado no estudo de Haiss et al.(2007)¹¹², dividindo A_{SPR} do pico de absorção por A_{450} é possível estimar o diâmetro das AuNPs-GHS. Haiss e colaboradores montaram uma tabela na qual relaciona o quociente da divisão A_{SPR}/A_{450} com o diâmetro das AuNPs-GHS. Neste caso, como mostra a FIGURA 16, A_{SPR} correspondente a análise é de 0,9 e o A_{450} é de 0,538, logo, resulta em um quociente em torno de 1.67 que, com base na TABELA 2, o diâmetro das AuNPs paira em torno de 16 a 18 nm.

TABELA 2- Estimativa do diâmetro das AuNPs a partir da relação A_{SPR}/A_{450} estudada por Haiss et al.(2007)¹¹²

A_{SPR}/A_{450}	d/ nm	A_{SPR}/A_{450}	d/ nm	A_{SPR}/A_{450}	d/ nm
1.10	3	1.56	12	1.96	40
1.19	4	1.61	14	2.00	45
1.27	5	1.65	16	2.03	50
1.33	6	1.69	18	2.07	55
1.38	7	1.73	20	2.10	60
1.42	8	1.80	25	2.12	65
1.46	9	1.86	30	2.15	70
1.50	10	1.92	35	2.17	75

4.2 Caracterização Eletroquímica

A voltametria cíclica foi usada para descrever o comportamento eletroquímico do marcador enzimático em solução injetando separadamente HQ ($2,00 \text{ mmol L}^{-1}$) e H_2O_2 ($1,00 \text{ mmol L}^{-1}$) preparadas recentemente em tampão PBS ($\text{pH}=6,5$), bem como a mistura dessas soluções também foi adicionada, como mostra a FIGURA 18. Os voltamogramas (a) e (b) destacam a resposta de corrente obtida, evidenciando que sem o substrato o sistema não apresenta corrente proveniente ao ciclo catalítico da enzima. Já quando o substrato da enzima foi injetado no sistema (FIGURA 18(c)) observa-se um leve aumento na corrente de pico catódico correspondente a transferência de elétrons dos sítios ativos da enzima para o eletrodo. Essa transferência de elétrons é desvantajosa para sistemas eletroquímicos, pois o tamanho da enzima dificulta a chegada dos elétrons na superfície do eletrodo ocasionando uma redução significativa em sinal de corrente^{113,114}.

Quando da presença do mediador redox (HQ) e do substrato (H_2O_2) observa-se uma amplificação do sinal de corrente catódica, uma vez que a HQ atua como mediador redox¹¹³, voltamograma (d) da FIGURA 18. Por isso, este sistema envolvendo o marcador enzimático na presença do substrato e do mediador redox foi escolhido para o desenvolvimento do método eletroquímico. Este estudo corrobora e se assemelha com o estudo feito por Feyzizarnagh *et al.*, (2016)¹¹⁵, no qual os autores propõem a possibilidade de nanotubos para encapsular a HRP com o intuito de evitar o uso da HQ como mediador redox.

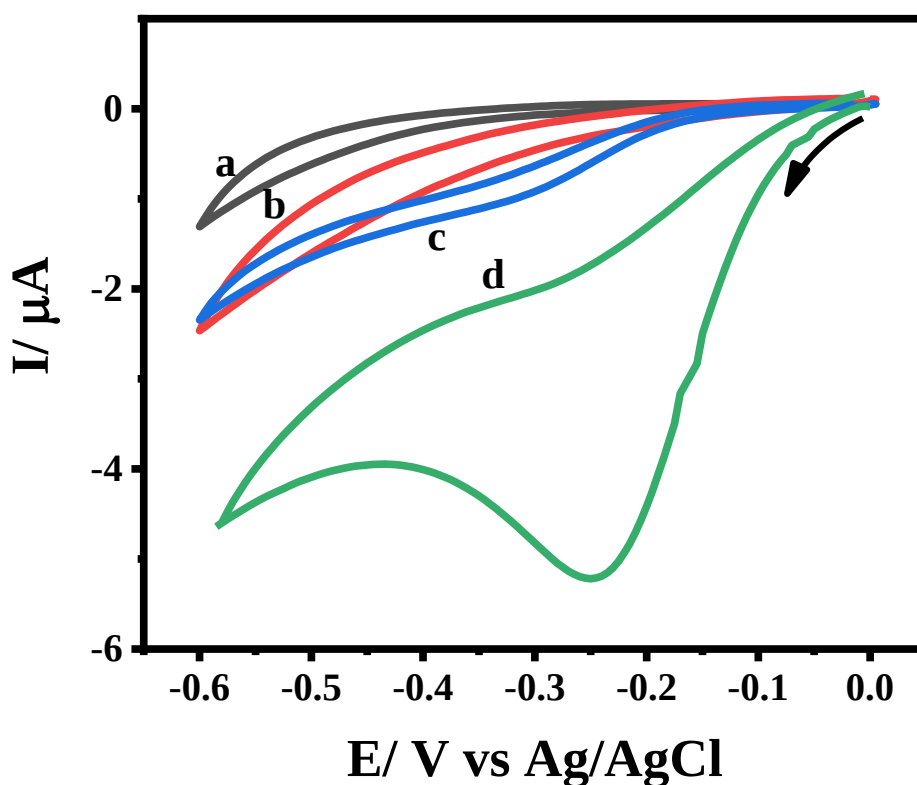


FIGURA 18- Voltamogramas ciclos referentes a resposta eletroquímica da enzima HRP (1:1000) quando injetado no canal microfluídico a) tampão salino, b) HQ, c) H_2O_2 e d) solução mista de HQ (2,00 mmol L⁻¹) e H_2O_2 (1,00 mmol L⁻¹). Parâmetros da voltametria: $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

Apesar da proposta não superar a eficácia da HQ no processo de transferência de elétrons da enzima para a superfície do eletrodo, tal estudo vislumbra a importância da HQ para sistemas que utilizam a HRP como marcador eletroquímico¹¹⁶.

Além disso, a voltametria cíclica também foi empregada na caracterização da modificação do eletrodo de trabalho em que cada etapa da modificação foi obtida um voltamograma, como demonstra a FIGURA 19. Neste caso, em cada etapa foi utilizada a solução mista contendo $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2O_2 em tampão salino PBS (pH=6,5), varrendo em uma faixa de potencial de 0 V a -0,65 V com velocidade de varredura em 50 mV e $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$. Sendo assim, como esperado, a FIGURA 19a e 19b mostra que o PDDA não provoca um aumento significativo da corrente de pico catódico (I_{pc}) a partir da adsorção do PDDA. O PDDA é um polycation aniônico que, uma vez dissolvido em água atua como um colóide carregado positivamente, o que garante uma melhor deposição em superfícies negativas a base de carbono¹¹⁷.

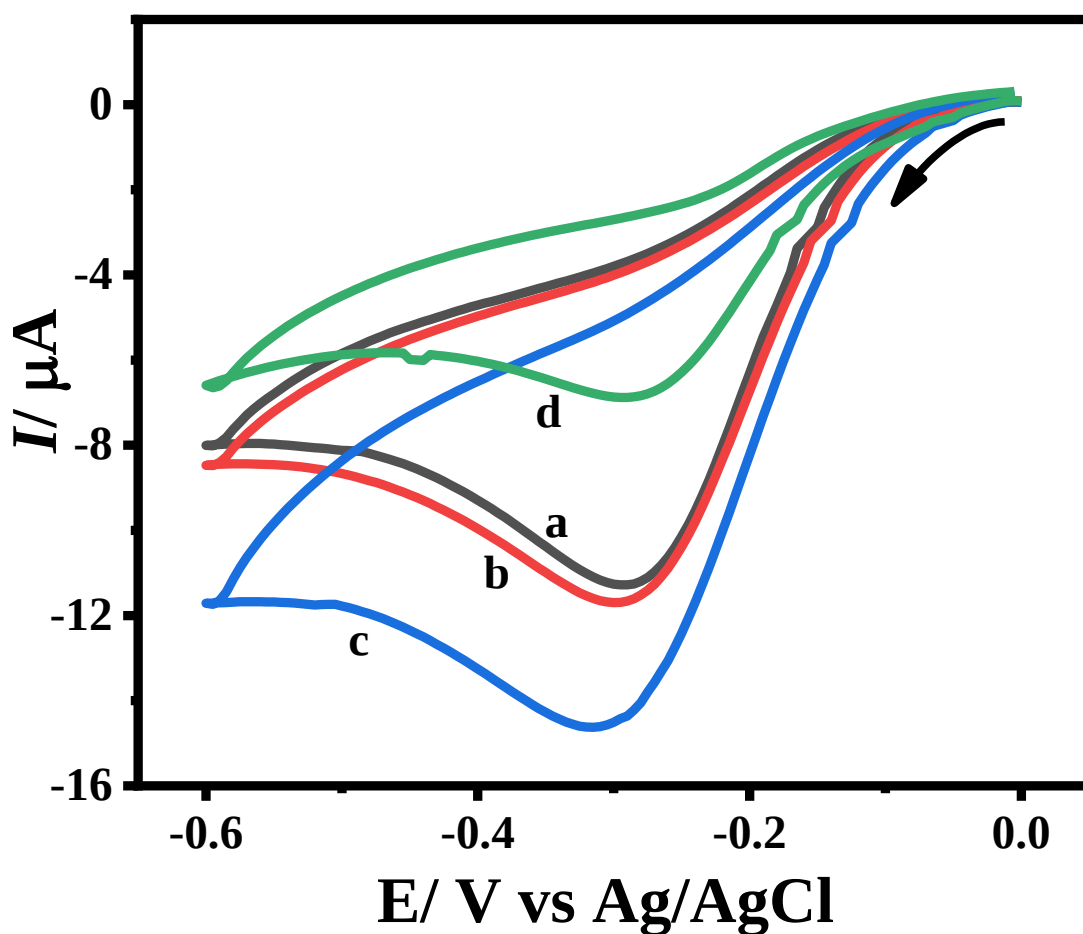


FIGURA 19- Voltametria cíclica da solução de HRP (1:1000) preparada em tampão salino PBS (pH=6,5) frente ao eletrodo a) não modificado e modificado com b) PPDA, c) AuNPs e d) DNAsd. Parâmetros da voltametria: $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$.

A modificação com AuNPs resultou em um ganho de 2,3 μA na corrente de pico catódico ($I_{pa} = 8,4 \mu\text{A}$) quando comparado com o eletrodo não modificado ($I_{pa} = 6,1 \mu\text{A}$). Este aumento de corrente sugere uma melhora na transferência de elétrons devido ao aumento da área eletroativa da superfície do eletrodo modificado com as AuNPs-GHS¹¹⁸. A modificação do eletrodo com a sonda de DNA resultou em uma queda de corrente (I_{pc}), pois os grupos fosfatos da sonda de DNA carregados negativamente ocasiona uma repulsão eletrostática que dificulta a transferência de elétrons para a superfície do eletrodo^{119,120}.

Neste caso, a corrente de pico obtida com o eletrodo modificado com sonda de DNA foi de 3,82 μA , apresentando uma queda equivalente a 54,5% em relação a corrente no pico catódico do eletrodo modificado com as AuNPs. Essa perda de sinal pode ser atribuída a condutividade dos eletrodos, bem como a contribuição acumulativa de cargas negativas geradas pela formação de monocamadas proteicas e de ácido nucleicos na superfície do eletrodo^{114,121}.

4.3 Modificação das Partículas Magnéticas

O uso de partículas magnéticas em métodos eletroanalíticos tem se tornado bastante atrativo, haja vista sua versatilidade e seu potencial em capturar e separar biomoléculas em solução quando modificadas com biocompostos seletivos^{122,123}. Neste caso, utilizando partículas magnéticas contendo grupos carboxílicos e com auxílio da solução de EDC/NHS (4:1) é possível levar a formação de uma ligação amida com a sonda de captura (scDNA) e a biotina, ambas contendo grupamento amino.

Dessa maneira, a distribuição dessas biomoléculas na partícula magnética foi analisada a fim de compreender a relação proporcional entre elas. As partículas magnéticas foram conjugadas com a sonda de captura, também nomeada de hairpin. Logo, avaliou-se parâmetros como a concentração, tempos de incubação, temperatura e tempo de desnaturação do hairpin na resposta do dispositivo. Lenzini et al., (2020)¹²⁴ salienta-se que em sistemas no qual envolve

desnaturação de material biológico, os parâmetros que favoreçam a hibridização devem ser cuidadosamente avaliados, pois a viabilidade do método é decorrente basicamente da hibridização efetiva das fitas de DNA do hairpin com as do alvo. Desta forma, variou-se a temperatura em intervalos de 10°C, fixando a concentração do hairpin em 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o tempo de desnaturação em 10 min. Com isto, observou-se que em 93 °C (FIGURA 20) o sistema apresenta uma melhor resposta em relação ao sinal de corrente. Isto também foi observado no estudo do tempo de desnaturação em que houve um aumento significativo na corrente quando o hairpin foi aquecimento a 93°C por 5 min.

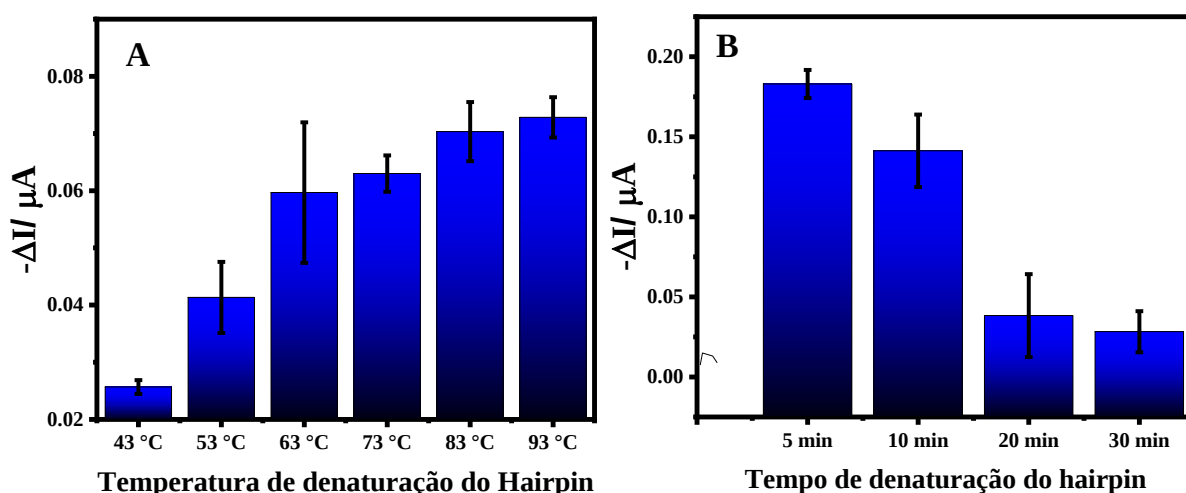


FIGURA 20- Gráfico das correntes resultantes da variação da A) temperatura de desnaturação do hairpin usando o sistema (HRP/H₂O₂/HQ) e B) do tempo. A concentração de hairpin de 2,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e de Biotina de 1 mM. Todas as medições foram realizadas com 10 fmol L⁻¹ do alvo com injeção de 2,00 mmol L⁻¹ de HQ e 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de H₂O₂

Além disso, destaca-se a considerável margem de erro apresentada pela temperatura em 63 °C (FIGURA 20A), a qual está atrelada a instabilidade da resposta em corrente de pico na temperatura de fusão do hairpin. Cada hairpin possui uma temperatura de fusão que depende do tamanho, composição da sequência de nucleotídeo e da flexibilidade da estrutura^{26,125}. A temperatura de fusão indica um estado de equilíbrio da estrutura do hairpin em que metade das sequências se encontram no formato de grampo enquanto a outra em forma de fita simples^{125,126}.

É possível que a amplificação do sinal ocasionada por esse aquecimento rápido esteja atribuída a fatores que facilitam tanto a desnaturação quanto o anelamento das fitas de DNA, tornando dispensável o aquecimento prolongado durante a desnaturação. A interação do solvente com o material genético é um fator determinante para este processo, pois além de favorecer a dissociação das fitas de ácidos nucleicos, os íons presentes no solvente estabilizam as ligações de hidrogênio que, por sua vez são responsáveis pelo anelamento das bases nitrogenadas do DNA^{127,128}.

Outro fator importante é o tamanho e a composição da cadeia de nucleotídeos, isto é observado no estudo de Jonstrup e colaboradores²⁶, os autores comparam o tamanho do loop e a composição das bases nitrogenadas na região complementar. Eles obtiveram uma queda na taxa de hibridização do hairpin com aumento do tamanho do loop e a diminuição da porcentagem representativa do par Citosina (C) e Guanina (G), os autores atribuem esse fenômeno a menor probabilidade de contato entre as extremidades complementares e a fragilidade da interação entre a Timina (T) e Adenina (A), já que ela se ligam por duas pontes de hidrogênio, enquanto a CG se unem por três pontes de hidrogênio^{124,129}.

Neste trabalho, o hairpin apresenta um loop pequeno quando comparado ao estudo de Jonstrup e colaboradores, garantindo uma maior probabilidade de interação entre as extremidades. Além disso, o hairpin apresenta 80% da região complementar composta pelo par CG, necessitando de uma energia elevada para romper as ligações de hidrogênio, por esse motivo a temperatura em 93 °C por 5 minutos forneceu a energia necessária para abertura do hairpin e foi escolhida como a melhor condição de desnaturação para o desenvolvimento deste trabalho. A diminuição da corrente de pico à medida que se estende o tempo de aquecimento pode ser resultado de alterações físico-químicas que inviabiliza a recomposição do hairpin²⁶.

Na sequência, a influência da concentração da biotina na bioconjugação com as PMs também foi analisada fixando a concentração da sonda de captura em $2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto variou-se a biotina em $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$. Sendo assim, como ilustra a FIGURA 21, embora o aumento na concentração da biotina foi considerável, está não apresentou um aumento significativo na corrente de pico, constatando que a quantidade de biotina não interfere consideravelmente no sinal analítico, uma vez que a amplificação deste sinal depende basicamente da hibridização entre a sonda de detecção e de captura. Sendo assim, para garantir o recobrimento máximo das PMs com biotina e hairpin, além de evitar etapas de bloqueio, foi escolhido a concentração de 1 mmol L^{-1} de biotina para a bioconjugação das PMs.

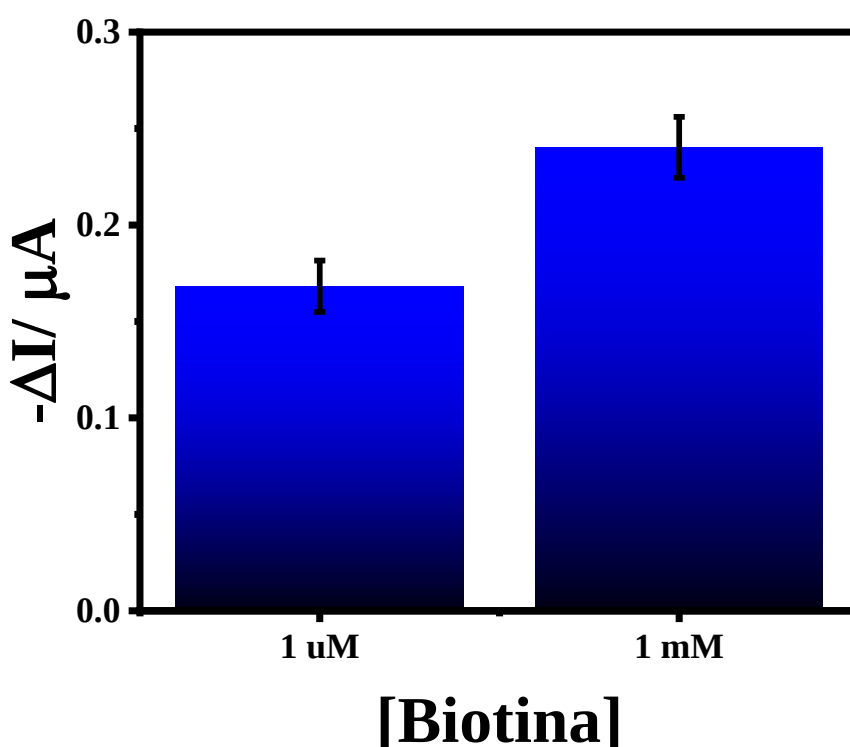


FIGURA 21- Gráfico de barras para concentração de biotina na bioconjugação da PM. Para esse estudo foi considerado a concentração de hairpin $2,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a desnaturação foi feito em 93°C por 5 min.

Em seguida, foi avaliada a concentração de hairpin utilizada na etapa de ancoramento desta nas PMs. Para o estudo da concentração de hairpin, utilizou-se as condições de hibridização previamente estudadas, variando apenas a concentração do hairpin. Dessa forma, como denota a FIGURA 22, há uma

melhora na resposta de corrente quando as partículas magnéticas são incubadas com $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ do hairpin por 12 h.

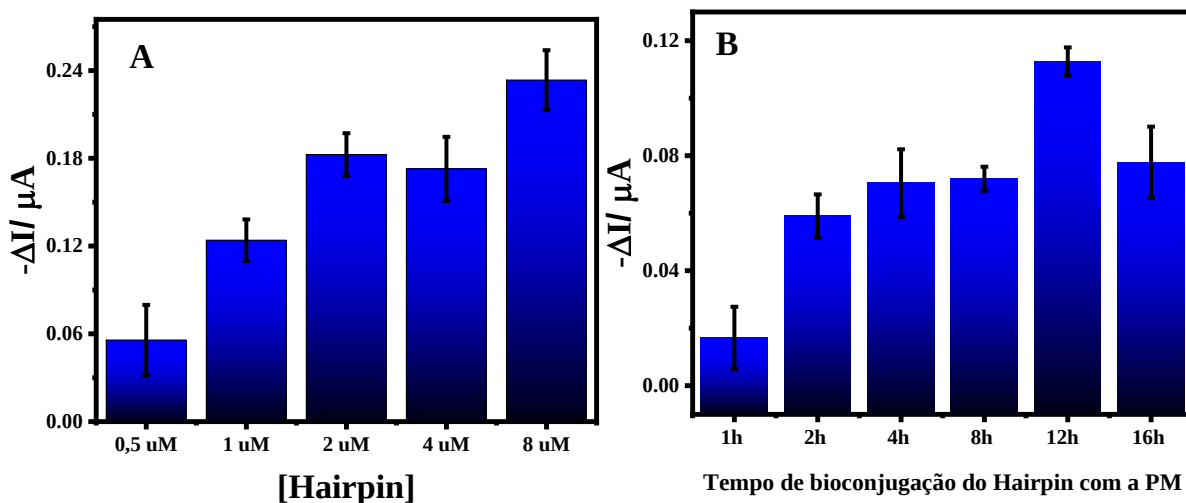


FIGURA 22- A) Respostas de corrente da concentração do hairpin nas PMs e B) tempo de incubação com parâmetros de hibridização fixos a $T=93^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Todas as medições foram feitas com 10 fmol L^{-1} do alvo com injeção de $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H_2O_2

Dessa forma, considerando que as partículas magnéticas como esferas uniformes e de grupos funcionais, deduz-se que a incubação de $1,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de biotina e $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de hairpin não levou a um recobrimento eficiente. No entanto, $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de hairpin garantiu um melhor recobrimento das PMs sendo a concentração escolhida. Com isso, mantendo fixo a concentração de hairpin ($8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$) e a melhor condição de desnaturação ($T=93^{\circ}\text{C}$, 5 min) variou-se o tempo de incubação para a imobilização do hairpin na PM e, como ilustra a FIGURA 22B, o melhor tempo de incubação foi em 12 h, portanto, este foi o tempo escolhido para as modificações da PM.

4.4 Parâmetros envolvido na modificação da superfície do eletrodo

A modificação do eletrodo com as AuNP-GSH garantiu uma superfície dotada de grupos carboxílicos que foram ativados via reação EDC/NHS para em seguida ligar-se covalentemente com a sonda de detecção, a qual foi modificada com grupo amino na extremidade 5' de cada sequência de DNA.

Portanto, a imobilização do material genético sobre a superfície do eletrodo foi avaliada, bem como soluções de bloqueio a fim de evitar ligações inespecíficas.

O resultado obtido é apresentado na FIGURA 23A, o eletrodo modificado com $4,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de sonda de detecção apresentou a maior resposta de corrente, indicando uma melhor distribuição do material genético na superfície do eletrodo. Outro parâmetro que foi investigado e o tipo de bloqueio utilizado após que embora alguns estudos apontem o BSA como um excelente agente bloqueador^{130,131}, neste caso, a etanolamina mostrou-se mais promissora (FIGURA 23B). A monocamada proteica formada pelo BSA ocasiona um aumento de cargas negativamente, a qual repele os elétrons proveniente do sistema redox da HRP/H₂O₂/HQ^{132,133}.

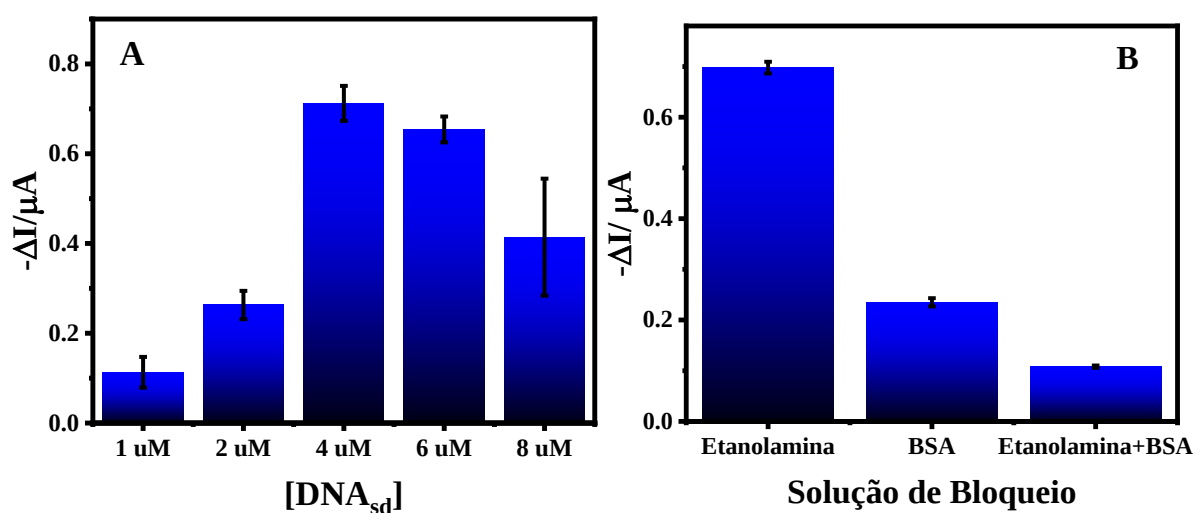


FIGURA 23- Gráfico de barras referente a resposta eletroquímica A) da concentração de sonda de detecção utilizada para a imobilização na superfície do eletrodo e B) o tipo de solução de bloqueio. Todas as medidas eletroquímicas foram feitas com 10 fmol L^{-1} do alvo, concentração de hairpin em $8,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ injetando $2,00 \text{ mmol L}^{-1}$ de HQ e $1,00 \mu\text{mol L}^{-1}$ de H₂O₂.

O BSA é uma proteína grande quando comparado com a sonda de detecção, logo, o este tende levar a um bloqueio estérico. Na FIGURA 23B é possível avaliar este efeito pois quando utilizado BSA acompanhado ou não do bloqueio com a molécula pequena de etanolamina a resposta de corrente cai drasticamente. Ao contrário disso, assim como descrito por Zouari et al., (2017), a etanolamina por ser uma molécula pequena, tende a orientar a sonda de

detecção, pois o grupo amino conjuga-se com os grupos carboxílicos no eletrodo enquanto a outra extremidade polar estabiliza a carga negativa dos grupos fosfatos da sequência de DNA¹³⁴.

4.5 Avaliação dos parâmetros analíticos do ensaio genomagnético proposto

A curva de analítica obtida a partir da detecção amperométrica do miRNA-208b ancorado na partícula magnética juntamente com o marcador enzimático, é exibida na FIGURA 24A. As respostas das correntes transientes resulta em uma dependência linear entre a corrente de pico catódico (com o sinal do branco subtraído) em função do logaritmo da concentração do miRNA-208b entre $0,01$ e $5,00 \times 10^3$ fmol L^{-1} com equação ajustada em $I_{pc} = (0,47 \pm 0,03) \log[\text{miRNA-208b}] (\text{fmol L}^{-1}) + (0,45 \pm 0,03)$ e $r = 0,99$ (FIGURA 23B).

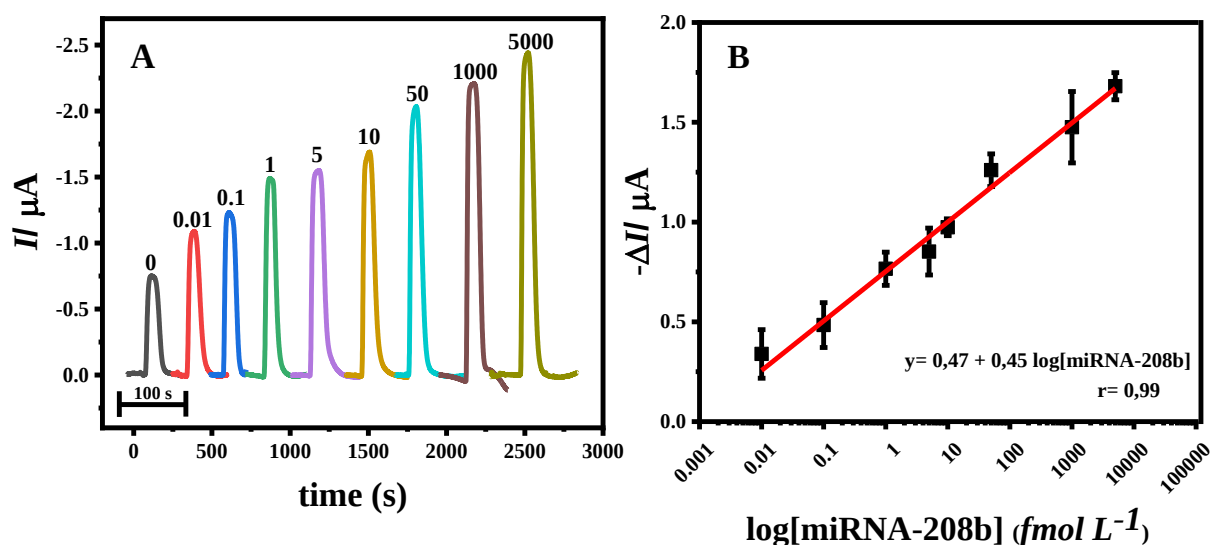


FIGURA 24- A) Respostas de correntes de transiente obtidas aplicando o método proposto em diferentes concentrações de miRNA-208b. B) Dependência da corrente de pico no logaritmo da concentração de miRNA-208b pela injeção no canal microfluídico da solução mista (2 mmol L^{-1} de H_2O_2 + 1 mmol L^{-1} de HQ) preparada em tampão PBS salino ($\text{pH}=6,5$) previamente purgado. As medidas foram feitas pela aplicação de um potencial fixo em $-0,25 \text{ V}$ com t_{equil} em 3 s em intervalos de $0,5 \text{ s}$. O desvio padrão foi definido com $n=4$.

De acordo com o critério $3xS_b/m$, onde S_b foi estimado como o desvio padrão do intercepto da reta e m foi o valor da inclinação da curva analítica^{135,136}, o limite de detecção calculado foi de $0,22 \text{ fmol L}^{-1}$. Já o limite de quantificação foi calculado multiplicando por 10 o desvio padrão do intercepto e dividindo pela inclinação da curva ($10xS_b/m$)¹³⁷ apresentando um valor igual a $0,66 \text{ fmol L}^{-1}$.

A boa sensibilidade alcançada é provavelmente atribuída ao aprimoramento da superfície eletroativa com os nanomateriais, bem como a especificidade entre a sonda de detecção e o hairpin. Dessa forma, ainda que considerasse uma menor taxa de hibridização, o sistema apresentaria uma boa resposta analítica, pois para cada evento de hibridização, uma partícula magnética recoberta da enzima HRP se faz presente. A TABELA 3 mostra uma comparação de outros trabalhos da literatura sobre biossensores baseados em modificações de eletrodos para detecção de miRNA.

TABELA 3- Comparação de outros biossensores relatados com base em modificações de eletrodos para detecção de miRNA.

Eletrodo modificado	Técnica empregada	Alvo	Faixa Linear	LoD	Ref.
Eletrodo de Au modificado com AuNPs	DPV	miR-100	100 aM a 10 pM	100 aM	138
Eletrodo de papel modificado com AuNPs/óxido de grafeno reduzido-RGO	DPV	miRNA-21	12.0 a 25.7 nM	60.0 fM	139
Eletrodo de papel modificado com AuNPs/MoS2 nanofolhas de dissulfeto de molibdênio- MoS2	DPV	miRNA-155	51.6 a 59.6 nM	128.0 fM	139

Continua →

Continuação →

Eletrodo modificado	Técnica empregada	Alvo	Faixa Linear	LoD	Ref.
SPE/AuNPs	CV	miRNA-204	15.5 aM a 15.5 nM		140
SPE/AuNPs	EIS	miRNA 21-5p	0.010 fM to 10 pM	4.31 aM	141
Eletrodo de Au	ACV (voltametria de corrente alternada)	miRNA-21	10 fM-100 nM	3.2 fM	142
GCE/óxido de grafeno reduzido modificado com níquel-ferro (Fe–Ni@rGO)	DPV	miRNA-155	0.05 fM-50.0 pM	20.2 aM	144
Eletrodo serigrafado de ouro	SWV	miRNA-21	8-34 nM	2 nM	145
Eletrodo de Au modificado com perovskita/óxido de grafeno/AuNPs	DPV	miRNA-21	10^{-14} e 10^{-7}	2.94 fM	146
FTO/GO Nano-wall@Au Nanoflower	EIS	miRNA-233	zM to nM	0.012 aM	147
SPCE/PDDA/Au	Amperometria	miRNA-208b	0.01 e 5000 fmol L ⁻¹	0.22 fM	Este trabalho

4.6 Estudo de seletividade do método genômico.

A seletividade do sistema foi avaliada comparando a resposta amperométrica obtida para a detecção de 10 fmol L⁻¹ do alvo com as respostas obtidas quando da adição sequências de DNA de cadeias curtas não específicas ao hairpin. Os resultados apresentados na Figura 25A confirmam as respostas significativamente menores obtidas com as sequências não específicas ao hairpin, demonstrando a boa seletividade entre o hairpin e a sequência alvo e assegurando a contribuição mínima de interferentes.

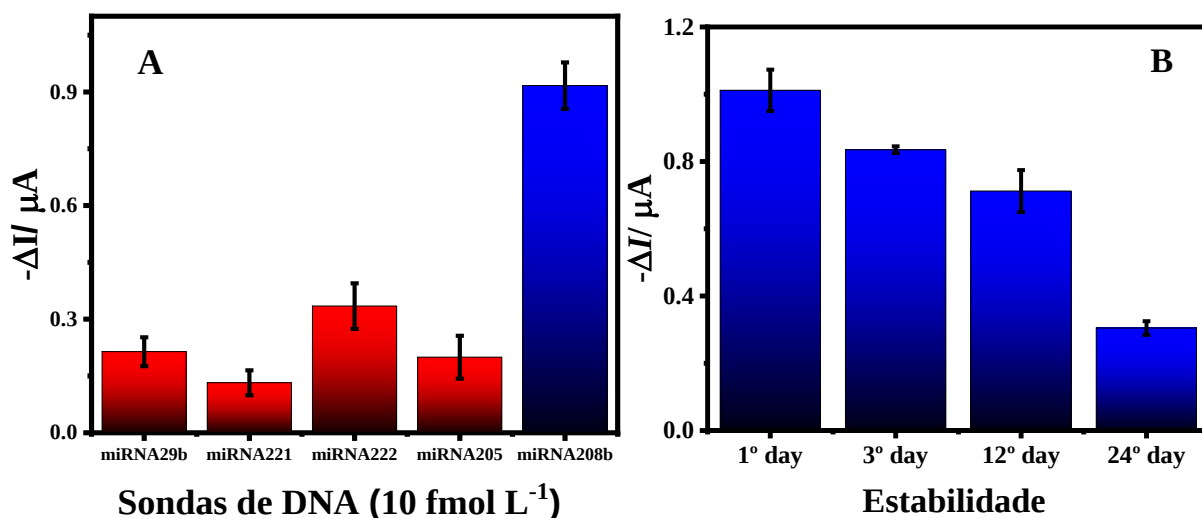


FIGURA 25- Comparação das respostas amperométricas fornecidas pelo dispositivo na ausência e na presença do miRNA-208b alvo (branco); B) Estabilidade de armazenamento dos imunoconjugados na PM utilizados para a construção do dispositivo amperométrico para a determinação do miRNA-208b. As medidas foram feitas na ausência (branco) e na presença de 10 fmol L⁻¹ do miRNA-208b, definindo o desvio padrão com n=4.

A estabilidade de longo prazo do método genomamagnético foi avaliada preparando no mesmo dia vários lotes de PMs bioconjugadas contendo 20 μL da solução padrão de PMs ressuspensas em 60 μL de solução tampão PBS salino (10 mmol L⁻¹, pH=7,4) em microtubos de 1,5 mL e armazenados a -4°C. Em cada medida eletroquímica, a resposta do dispositivo contendo 10 fmol L⁻¹ do alvo foi subtraída da resposta apresentada pelo dispositivo em solução do branco. Os resultados obtidos (Figura 25B) mostram que o método tende a apresentar uma diminuição na resposta sendo mais significativa no 24° dia uma vez que as sequências de DNA tendem a ter uma maior estabilidade quando comparado as proteínas é possível que esta queda na resposta esteja relacionada a enzima HRP.

4.7 Aplicação do método usando amostras de soro de pessoas com doenças que desencadeiam problemas cardíacos

Dado o potencial do método genomagnético para detecção do alvo em tampão, sua viabilidade em amostras reais de soro também foi avaliada. As amostras utilizadas são de pacientes, acompanhados pelo Departamento de Medicina - UFSCar, que apresentam doenças que desencadeiam problemas cardíacos. Um total de 16 amostras foram testadas usando o método proposto neste trabalho e comparadas com o resultado obtidos por qPCR. Assim como o trabalho de Diniz et al., (2013)¹⁴⁸, o U6 snRNA foi testado como normalizadores na análise de qPCR, garantindo a confiabilidade do procedimento.

Conforme apresentado na FIGURA 26, enquanto obteve-se uma boa resposta de pico de corrente, o resultado de qPCR demonstrou um valor de ct menor, indicando que o método genomagnético corrobora com o teste padrão-ouro. Um menor valor de média de ct na análise de qPCR indica que uma dada amostra contém expressivamente o alvo, favorecendo a amplificação em ciclos menores. No caso do método proposto, uma maior quantidade de alvo resulta em um maior valor de pico de corrente catódica.

Apesar da dificuldade em obter controles negativos, o método se mostrou eficiente na detecção de miRNA-208b em amostras reais sem etapas de extração, transcrição e amplificação, tornando-se uma excelente alternativa para o diagnóstico e prognóstico de problemas cardíacos. Além disso, mediante a excelente seletividade (FIGURA 25A) apresentada com o uso das sondas de DNA, o método aparenta ser promissor no diagnóstico clínico quando comparado aos métodos de detecção de biomarcadores tardios que são usualmente utilizados nestes casos.

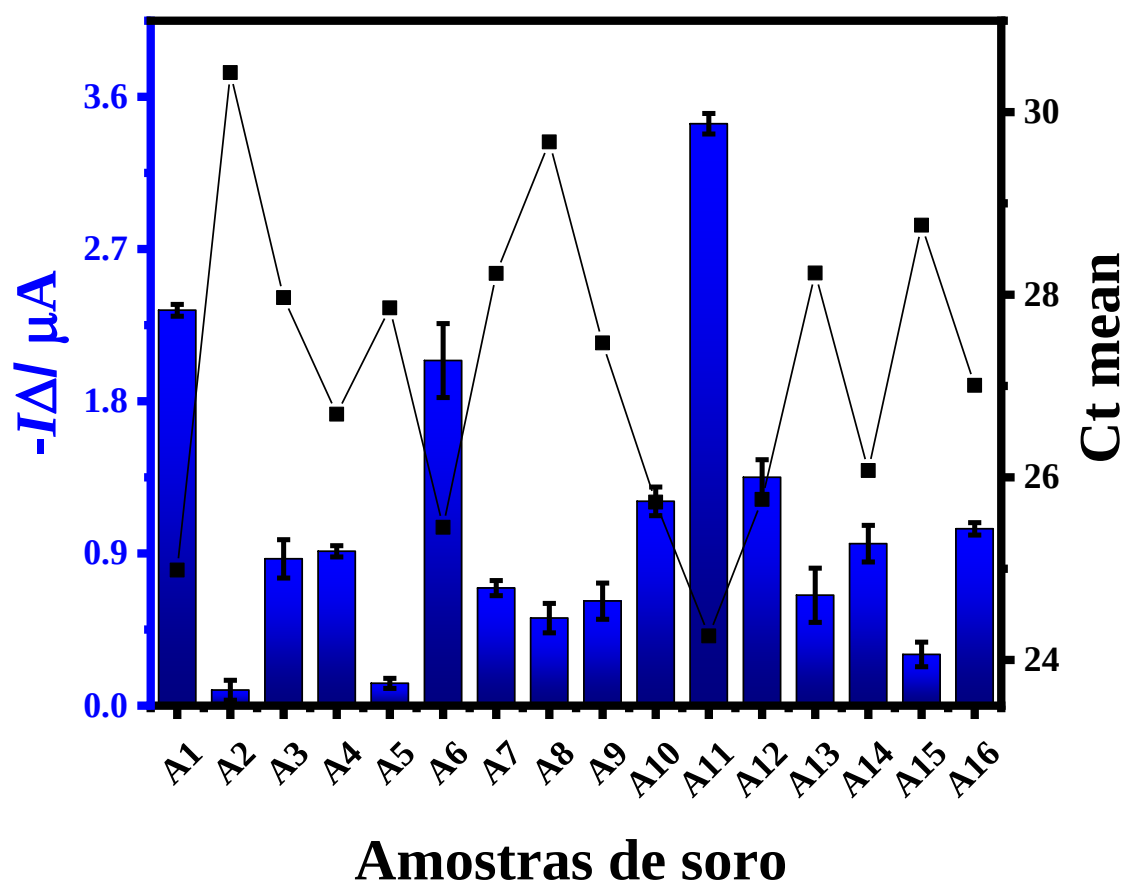


FIGURA 26- Avaliação do método genômico em amostras reais de soro de pacientes com problemas cardíacos. O gráfico de barras mostra as respostas de corrente de pico catódico das amostras de soro e o símbolo + linha se refere à média ct da análise de qPCR dessas amostras. n=4.

5. CONCLUSÕES

Em síntese, neste trabalho propusemos um novo método eletroquímico utilizando dispositivos descartáveis e ensaios magnéticos para amplificação e detecção ultrasensível do miRNA-208b. A estratégia de captura do alvo se mostrou eficiente, o que possibilita o monitoramento de uma importante variante de RNA mensageiro relacionado à processos inflamatórios no organismo humano. Neste método fez-se uso de eletrodos serigrafados que foram fabricados utilizando materiais de baixo custo, oportunizando um dispositivo diagnóstico eficiente, sensível e acessível com possibilidade de aplicações em regiões onde o acesso aos testes disponíveis atualmente são precários. O dispositivo utilizando sondas de DNA que apresenta uma melhor estabilidade frente a variação de pH e temperatura quando comparado com sondas de RNA. Destaca-se a seletividade do sistema, pois mesmo com sequências parecidas com o alvo, o método proposto conseguiu diferenciá-las. A sensibilidade do método está atrelada a excelente estratégia de amplificação devido a utilização de partículas magnéticas, pois para cada evento de anelamento entre o hairpin e o alvo haverá uma PM dotada de marcador enzimático. As PMs permitiram a separação as biomoléculas de interesse de amostra e a pré-concentração minimizando significativamente a possível interferência de componentes presentes na matriz da amostra. Além do mais, este trabalho proporcionou a integração de outros miRNAs para a mesma finalidade, bem como a inspiração no desenvolvimento de novas estratégias para a detecção de outras biomoléculas visando o diagnóstico de doença a partir da relação de biorreconhecimento entre os biomarcadores e eletrodos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OPAS/OMS, O. P.-A. da S. Doenças cardiovasculares - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. OMS <https://www.paho.org/pt/topicos/doencas-cardiovasculares> (2024).
2. de Oliveira, G. M. M. *et al.* Cardiovascular Statistics - Brazil 2021. *Arq Bras Cardiol* **118**, 115 (2022).
3. You, H. & Han, W. Identification of necroptosis-related diagnostic biomarkers in coronary heart disease. *Heliyon* **10**, e30269 (2024).
4. Linkermann, A. & Green, D. R. Necroptosis. *New England Journal of Medicine* **370**, 455–465 (2014).
5. Baudhuin, L. M. *Genetics of Coronary Artery Disease: Focus on Genome-Wide Association Studies*. *Am J Transl Res* vol. 1 www.ajtr.org/AJTR902004 (2009).
6. Zhou, S. *et al.* Open-world electrocardiogram classification via domain knowledge-driven contrastive learning. *Neural Networks* **179**, 106551 (2024).
7. Jambukia, S. H., Dabhi, V. K. & Prajapati, H. B. Classification of ECG signals using machine learning techniques: A survey. *Conference Proceeding - 2015 International Conference on Advances in Computer Engineering and Applications, ICACEA 2015* 714–721 (2015) doi:10.1109/ICACEA.2015.7164783.
8. Moghaddam, M. J. & Ghavipour, M. Towards smart diagnostic methods for COVID-19: Review of deep learning for medical imaging. *IPEM-Translation* **3–4**, 100008 (2022).
9. Lan, W. C., Chen, Y. H. & Liu, S. H. Non-invasive imaging modalities for the diagnosis of coronary artery disease: The present and the future. *Tzu Chi Med J* **25**, 206–212 (2013).
10. Xiaolin, H., Wu, T., Li, D. & Xu, R. Application of Synthetic Time-Of-Flight Magnetic Resonance Angiography-Computed Tomography Fusion

- Imaging in Preoperative Planning for Aneurysm Clipping Surgery: A Comparative Study with Three-Dimensional Computed Tomography Angiography. *World Neurosurg* (2024) doi:10.1016/J.WNEU.2024.07.119.
11. Kirkbride, R. R. *et al.* Quality and diagnostic performance of coronary computed tomography angiogram (CCTA): A comparison between pre-liver and pre-kidney transplant patients. *Eur J Radiol* **143**, 109886 (2021).
 12. Bragg, S., Brown, B. & DeCastro, A. O. Arrhythmias and Sudden Cardiac Death. *Primary Care: Clinics in Office Practice* **51**, 143–154 (2024).
 13. REIS, S. M. T. ; R. , G. T. ; J. , A. V. G. ; B. , I. S. ; F. , D. T. ; L. I. ; K. , E. N. Proposta de implantação de um protocolo clínico para o atendimento de pacientes com dor torácica em uma unidade de pronto atendimento. *Seven Editora* (2023) doi:<https://doi.org/10.56238/ciemedsaudetrans-005>.
 14. Ministério da Saúde. *PROTOCOLO CLÍNICO SÍNDROMES CORONARIANAS AGUDAS*. https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/protocolo_uso/pcdt_sindromescoronarianasagudas.pdf/view (2023).
 15. Ai, J. *et al.* Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 73–77 (2010).
 16. Guerrero, M. S. *et al.* Acute myocardial infarction on Nongated chest computed tomography. *Radiol Case Rep* **15**, 1837–1840 (2020).
 17. Li, H. & Nie, W. Electrochemical sensors for creatine kinase detection in blood serum based on glucose oxidase modified multiwalled carbon nanotubes. *Int J Electrochem Sci* **19**, 100447 (2024).
 18. Yang, Z. & Min Zhou, D. Cardiac markers and their point-of-care testing for diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Biochem* **39**, 771–780 (2006).
 19. Mahmoud, N., Mohamed, W. R. & Mohamed, T. Femtosecond laser-induced fluorescence for rapid monitoring of cardiac troponin 1 as a

- cardiovascular disease biomarker. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **305**, 123491 (2024).
20. Zinovkin, R. A. & Sakharov, I. Y. Challenges of using microRNAs as potential disease biomarkers. A review. *Microchemical Journal* **206**, 111379 (2024).
 21. Khan, I. & Siraj, M. An updated review on cell signaling pathways regulated by candidate miRNAs in coronary artery disease. *Noncoding RNA Res* **8**, 326–334 (2023).
 22. Al-Attar, M. M., Al-Awadi, S. J. & Abdulfattah, S. Y. Role of miRNA-27a and miRNA-224 in posttranscriptional regulation of PCSK9 gene in Iraqi patient with coronary artery disease. *Human Gene* **34**, 201121 (2022).
 23. Wang, Z. *et al.* Dexmedetomidine protects H9C2 against hypoxia/reoxygenation injury through miR-208b-3p/Med13/Wnt signaling pathway axis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **125**, 110001 (2020).
 24. Romaine, S. P. R., Tomaszewski, M., Condorelli, G. & Samani, N. J. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* **101**, 921–928 (2015).
 25. Weng, Y. T., Chang, Y. M. & Chern, Y. The Impact of Dysregulated microRNA Biogenesis Machinery and microRNA Sorting on Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **2023**, Vol. 24, Page 3443 **24**, 3443 (2023).
 26. Jonstrup, A. T., Fredsøe, J. & Andersen, A. H. DNA hairpins as temperature switches, thermometers and ionic detectors. *Sensors (Switzerland)* **13**, 5937–5944 (2013).
 27. Khidr, E. G. *et al.* The potential role of miRNAs in the pathogenesis of cardiovascular diseases – A focus on signaling pathways interplay. *Pathol Res Pract* **248**, 154624 (2023).
 28. Nishiguchi, T., Imanishi, T. & Akasaka, T. MicroRNAs and Cardiovascular Diseases. *Biomed Res Int* **2015**, 682857 (2015).

29. Polyakova, E. A. *et al.* Association of myocardial and serum miRNA expression patterns with the presence and extent of coronary artery disease: A cross-sectional study. *Int J Cardiol* **322**, 9–15 (2021).
30. Chen, C. *et al.* MicroRNA as a Therapeutic Target in Cardiac Remodeling. *Biomed Res Int* **2017**, 1278436 (2017).
31. Xu, J., Cao, D., Zhang, D., Zhang, Y. & Yue, Y. MicroRNA-1 facilitates hypoxia-induced injury by targeting NOTCH3. *J Cell Biochem* **121**, 4458–4469 (2020).
32. Khan, A. W. Nuclear functions of microRNAs relevant to the cardiovascular system. *Translational Research* **230**, 151–163 (2021).
33. Diniz, G. P., Takano, A. P. & Barreto-Chaves, M. L. M. miRNA-208a and miRNA-208b are triggered in thyroid hormone-induced cardiac hypertrophy – Role of type 1 Angiotensin II receptor (AT1R) on miRNA-208a/ α -MHC modulation. *Mol Cell Endocrinol* **374**, 117–124 (2013).
34. Widera, C. *et al.* Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 872–875 (2011).
35. Paul, A., Pai, P. G., Ariyannur, P. S. & Joy, R. A. Diagnostic accuracy of MicroRNA 208b level with respect to different types of atrial fibrillation. *Indian Heart J* **73**, 506–510 (2021).
36. Li, C. *et al.* Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med Genomics* **6**, 1–9 (2013).
37. Sharma, A. K. *et al.* Investigating miRNA subfamilies: Can they assist in the early diagnosis of acute myocardial infarction? *Drug Discov Today* **28**, 103695 (2023).
38. Gumus, E., Bingol, H. & Zor, E. Lateral flow assays for detection of disease biomarkers. *J Pharm Biomed Anal* **225**, 115206 (2023).

39. Ban, E., Lim, H. J., Kwon, H. & Song, E. J. Practical magnetic bead-based capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence for detecting endogenous miRNA in plasma. *Heliyon* **9**, e22809 (2023).
40. Stuopelyte, K., Daniunaite, K., Jankevičius, F. & Jarmalaite, S. Detection of miRNAs in urine of prostate cancer patients. *Medicina (B Aires)* **52**, 116–124 (2016).
41. Scheurer, M. J. J. *et al.* Influence of analytical procedures on miRNA expression analyses in saliva samples. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **52**, 748–754 (2024).
42. Akbar, S. *et al.* Blood miRNAs miR-549a, miR-552, and miR-592 serve as potential disease-specific panels to diagnose colorectal cancer. *Heliyon* **10**, e28492 (2024).
43. Huang, Y. *et al.* Bioinspired superwetable electrode towards sensitive detection of myocardial infarction-specific miRNA. *Sens Actuators B Chem* **419**, 136365 (2024).
44. Shahsavar, K., Shokri, E. & Hosseini, M. A fluorescence-readout method for miRNA-155 detection with double-hairpin molecular beacon based on quadruplex DNA structure. *Microchemical Journal* **158**, 105277 (2020).
45. Jeung, J. H., Han, H., Jang, S. H., Lee, C. Y. & Ahn, J. K. One-pot, one-step, label-free miRNA detection method based on the structural transition of dumbbell probe. *Talanta* **274**, 125944 (2024).
46. Xue, Y. *et al.* An ultrasensitive and multiplexed miRNA one-step real time RT-qPCR detection system and its application in esophageal cancer serum. *Biosens Bioelectron* **247**, 115927 (2024).
47. Zou, L., Liu, X., Yang, L. & Yun, W. Product catalysis dual entropy-driven amplification reaction strategy for miRNA-21 detection in glioblastoma. *Microchemical Journal* **206**, 111515 (2024).

48. Jiang, Z. & Liu, Z. Target recycle initiated entropy driven assembly strategy for sensitive, enzyme-free, and portable miRNA detection. *Anal Biochem* **693**, 115593 (2024).
49. Li, S. *et al.* Sensitive fluorescence detection of miRNA-124 in cardiomyocytes under oxidative stress using a nucleic acid probe. *Heliyon* **10**, e33588 (2024).
50. Mandal, D., Indaleeb, M. M., Younan, A. & Banerjee, S. Piezoelectric point-of-care biosensor for the detection of SARS-COV-2 (COVID-19) antibodies. *Sens Biosensing Res* **37**, 100510 (2022).
51. Jiao, F., Cao, F., Gao, Y., Shuang, F. & Dong, D. A biosensor based on a thermal camera using infrared radiance as the signal probe. *Talanta* **246**, 123453 (2022).
52. An, J. *et al.* Emerging electrochemical biosensors for lung cancer-associated protein biomarker and miRNA detection. *Int J Biol Macromol* 135972 (2024) doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2024.135972.
53. Pakchin, P. S., Fathi, F., Samadi, H. & Adibkia, K. Recent Advances in Receptor-Based Optical Biosensors for the Detection of Multiplex Biomarkers. *Talanta* 126852 (2024) doi:10.1016/J.TALANTA.2024.126852.
54. Kulshreshtha, N. M., Shrivastava, D. & Bisen, P. S. Contaminant sensors: nanotechnology-based contaminant sensors. *Nanobiosensors* 573–628 (2017) doi:10.1016/B978-0-12-804301-1.00014-X.
55. Cordeiro, T. A. R. *et al.* Electrochemical biosensors for neglected tropical diseases: A review. *Talanta* **234**, 122617 (2021).
56. Alipio, M. & Villena, M. L. Intelligent wearable devices and biosensors for monitoring cattle health conditions: A review and classification. *Smart Health* **27**, 100369 (2023).

57. Ahmed Taha, B. *et al.* Advancing cancer diagnostics through multifaceted optical biosensors supported by nanomaterials and artificial intelligence: A panoramic outlook. *Microchemical Journal* **205**, 111307 (2024).
58. Pohanka, M. Quartz Crystal Microbalance (QCM) Sensing Materials in Biosensors Development. *Int J Electrochem Sci* **16**, 211220 (2021).
59. Santos, D. J. A. dos *et al.* An electrochemical genomagnetic assay for detection of SARS-CoV-2 and Influenza A viruses in saliva. *Biosens Bioelectron* **255**, 116210 (2024).
60. García-Rodrigo, L. *et al.* Label-free electrochemical immunosensing of glial fibrillary acidic protein (GFAP) at synthesized rGO/MoS₂/AgNPs nanocomposite. Application to the determination in human cerebrospinal fluid. *Talanta* **270**, 125597 (2024).
61. Le Brun, G. *et al.* Studying ion transport dynamics in electrochemical measurements of lateral flow assays. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **966**, 118399 (2024).
62. Joe, C., Lee, B. H., Kim, S. H., Ko, Y. & Gu, M. B. Aptamer duo-based portable electrochemical biosensors for early diagnosis of periodontal disease. *Biosens Bioelectron* **199**, 113884 (2022).
63. Chuang, Y.-S., Wang, C.-K., Li, C.-Y., Li, C. & Wu, C.-C. Rapid Label-Free Impedimetric Detection of Progesterone Enhanced by Immunomagnetic Bead-Based Competitive Immunoreaction. doi:10.2139/SSRN.4681710.
64. Naresh, V. & Lee, N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors. *Sensors (Basel)* **21**, 1–35 (2021).
65. Baldo, T. A. *et al.* Disposable electrochemical microfluidic device for ultrasensitive detection of egg allergen in wine samples. *Talanta* **232**, 122447 (2021).

66. Silva, N. F. D. *et al.* Development of a disposable paper-based potentiometric immunosensor for real-time detection of a foodborne pathogen. *Biosens Bioelectron* **141**, 111317 (2019).
67. Cui, L. *et al.* Construction of a dual-mode biosensor for electrochemiluminescent and electrochemical sensing of alkaline phosphatase. *Sens Actuators B Chem* **374**, 132779 (2023).
68. de Oliveira, T. R., Fonseca, W. T., de Oliveira Setti, G. & Faria, R. C. Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes. *Talanta* **195**, 480–489 (2019).
69. Mahmoudi-Moghaddam, H., Tajik, S. & Beitollahi, H. A new electrochemical DNA biosensor based on modified carbon paste electrode using graphene quantum dots and ionic liquid for determination of topotecan. *Microchemical Journal* **150**, 104085 (2019).
70. Flauzino, J. M. R. *et al.* Label-free and reagentless electrochemical genosensor based on graphene acid for meat adulteration detection. *Biosens Bioelectron* **195**, 113628 (2022).
71. Verma, D. *et al.* Disposable paper-based screen-printed electrochemical immunoplatfrom for dual detection of esophageal cancer biomarkers in patients' serum samples. *Mater Adv* **5**, 2153–2168 (2024).
72. Baldo, T. A. *et al.* Disposable electrochemical microfluidic device for ultrasensitive detection of egg allergen in wine samples. *Talanta* **232**, 122447 (2021).
73. Nalepa, M. A. *et al.* Graphene derivative-based ink advances inkjet printing technology for fabrication of electrochemical sensors and biosensors. *Biosens Bioelectron* **256**, 116277 (2024).
74. Yang, S. *et al.* The enhanced properties of ZnCoNi-S electrode by magnetron sputtering of Au nanoparticles for high performance supercapacitors. *J Power Sources* **623**, 235424 (2024).

75. Ramya, P. R., Halder, S., Nagamani, K., Singh Chouhan, R. & Gandhi, S. Disposable graphene-oxide screen-printed electrode integrated with portable device for detection of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Bioelectrochemistry* **158**, 108722 (2024).
76. Negahdary, M. *et al.* Recent electrochemical sensors and biosensors for toxic agents based on screen-printed electrodes equipped with nanomaterials. *Microchemical Journal* **185**, 108281 (2023).
77. de Oliveira, T. R., Martucci, D. H. & Faria, R. C. Simple disposable microfluidic device for *Salmonella typhimurium* detection by magneto-immunoassay. *Sens Actuators B Chem* **255**, 684–691 (2018).
78. Dispositivos Descartáveis E De Baixo Custo Para A Detecção De Biomarcadores, D. DE & Censi Faria, R. Desenvolvimento de dispositivos descartáveis e de baixo custo para a detecção de biomarcadores relacionados ao câncer de colo uterino e endometrial. (2019).
79. Sihombing, Y. A. *et al.* Enhanced uric acid detection using functionalized multi-walled carbon nanotube/AgNi nanocomposites: A comparative study on screen-printed carbon electrode (SPCE) and fabric-based biosensors. *Sensors and Actuators Reports* **8**, 100223 (2024).
80. Ferreira, L. M. C. *et al.* Electrochemical determination of Roxarsone using preconcentration-based signal amplification on modified screen-printed electrode. *Food Chem* **437**, 137698 (2024).
81. Pereira, R. L., Oliveira, D., Pêgo, A. P., Santos, S. D. & Moreira, F. T. C. Electrochemical miRNA-34a-based biosensor for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Bioelectrochemistry* **154**, 108553 (2023).
82. Raucci, A. *et al.* Paper-based screen-printed electrode to detect miRNA-652 associated to triple-negative breast cancer. *Electrochim Acta* **487**, 144205 (2024).
83. Acevedo-Restrepo, I., Blandón-Naranjo, L., Vázquez, M. V. & Restrepo-Sánchez, N. Evaluation of the electrochemical response of *Saccharomyces*

- cerevisiae using screen-printed carbon electrodes (SPCE) modified with oxidized multi-walled carbon nanotubes dispersed in water – Nafion®. *Curr Res Food Sci* **6**, 100401 (2023).
84. Paramasivam, S. S., Mariappan, S. A., Sethy, N. K. & Manickam, P. Enzyme mimetic electrochemical sensor for salivary nitrite detection using copper chlorophyllin and carbon nanotubes-functionalized screen printed electrodes. *Mater Adv* **4**, 6223–6232 (2023).
 85. Wang, M. & Feng, L. A carbon based-screen-printed electrode amplified with two-dimensional reduced graphene/Fe₃O₄ nanocomposite as electroanalytical sensor for monitoring 4-aminophenol in environmental fluids. *Chemosphere* **323**, 138238 (2023).
 86. Ciou, S. H. *et al.* Sensitive label-free detection of the biomarker phosphorylated tau–217 protein in Alzheimer’s disease using a graphene-based solution-gated field effect transistor. *Biosens Bioelectron* **228**, 115174 (2023).
 87. Valverde, A. *et al.* Electrochemical immunoplatfrom to improve the reliability of breast cancer diagnosis through the simultaneous determination of RANKL and TNF in serum. *Sens Actuators B Chem* **314**, 128096 (2020).
 88. Serafín, V. *et al.* An electrochemical immunosensor for brain natriuretic peptide prepared with screen-printed carbon electrodes nanostructured with gold nanoparticles grafted through aryl diazonium salt chemistry. *Talanta* **179**, 131–138 (2018).
 89. Nascimento, E. D. *et al.* COVID-19 diagnosis by SARS-CoV-2 Spike protein detection in saliva using an ultrasensitive magneto-assay based on disposable electrochemical sensor. *Sens Actuators B Chem* **353**, 131128 (2022).

90. Baradoke, A. *et al.* Detection of antibodies against SARS-CoV-2 Spike protein by screen-printed carbon electrodes modified by colloidal gold nanoparticles. *Talanta* **268**, 125279 (2024).
91. Masud, M. K. *et al.* Nanoarchitecture Frameworks for Electrochemical miRNA Detection. *Trends Biochem Sci* **44**, 433–452 (2019).
92. Austria, E. S., Lamorena, R. B. & Arco, S. D. Synthesis and functionalization of magnetic nanoparticles for glycoprotein and glycopeptide enrichment: A review. *Microchemical Journal* **201**, 110663 (2024).
93. Keshta, B. E. *et al.* State of the art on the magnetic iron oxide Nanoparticles: Synthesis, Functionalization, and applications in wastewater treatment. *Results Chem* **7**, 101388 (2024).
94. Tan, X. *et al.* GMR detection of magnetic beads with different sizes. *J Magn Magn Mater* **597**, 171992 (2024).
95. Regina de Oliveira, T. *et al.* Molecular test for COVID-19 diagnosis based on a colorimetric genomagnetic assay. *Anal Chim Acta* **1257**, 341167 (2023).
96. Campuzano, S., Pedrero, M., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. New challenges in point of care electrochemical detection of clinical biomarkers. *Sens Actuators B Chem* **345**, 130349 (2021).
97. Kim, E. R., Joe, C., Mitchell, R. J. & Gu, M. B. Biosensors for healthcare: current and future perspectives. *Trends Biotechnol* **41**, 374–395 (2023).
98. Ozcelikay, G. *et al.* Electrochemical bioplatfrom for the determination of the most common and carcinogenic human papillomavirus DNA. *J Pharm Biomed Anal* **231**, 115411 (2023).
99. Zheng, M. & Huang, X. Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules. *J Am Chem Soc* **126**, 12047–12054 (2004).

100. Zhu, M. & Feng, L. A sensitive and rapid sensing platform for ochratoxin A detection based on triple-helix molecular switch and CMC-EDC/NHS covalent immobilized paper. *Sens Actuators B Chem* **375**, 132859 (2023).
101. Tsai, T. C. *et al.* In situ study of EDC/NHS immobilization on gold surface based on attenuated total reflection surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (ATR-SEIRAS). *Colloids Surf B Biointerfaces* **175**, 300–305 (2019).
102. Ouyang, M. *et al.* A review of biosensor technologies for blood biomarkers toward monitoring cardiovascular diseases at the point-of-care. *Biosens Bioelectron* **171**, 112621 (2021).
103. Laczka, O. *et al.* Improved bacteria detection by coupling magneto-immunocapture and amperometry at flow-channel microband electrodes. *Biosens Bioelectron* **26**, 3633–3640 (2011).
104. Berglund, G. I. *et al.* The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **417**, 463–468 (2002).
105. Roberts, W. S., Davis, F., Collyer, S. D. & Higson, S. P. J. Construction and interrogation of enzyme microarrays using scanning electrochemical microscopy – optimisation of adsorption and determination of enzymatic activity. *Analyst* **136**, 5287–5293 (2011).
106. Arya, S. K. *et al.* Capacitive aptasensor based on interdigitated electrode for breast cancer detection in undiluted human serum. *Biosens Bioelectron* **102**, 106–112 (2018).
107. Marcelo, G., Tarazona, M. P. & Saiz, E. Solution properties of poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA). *Polymer (Guildf)* **46**, 2584–2594 (2005).
108. Jiang, X., Mu, Z., Wang, J., Zhou, J. & Bai, L. A novel sandwich-type electrochemical immunosensor for sensitive detection of zearalenone using NG/PDDA/HNTs and Ti-MOF-KB composites for signal amplification. *Food Chem* **436**, 137704 (2024).

109. Amatatongchai, M., Sroysee, W., Chairam, S. & Nacapricha, D. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles. *Talanta* **133**, 134–141 (2015).
110. Barich, H. *et al.* Selecting optimal carbon inks for fabricating high-performance screen-printed electrodes for diverse electroanalytical applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **971**, 118585 (2024).
111. Pourreza, N., Abasipanah, P. & Ghomi, M. Fabrication of AuNPs into alginate biopolymer and functionalized by thiourea as a film shape probe for palladium(II) sensing. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* **100**, 194–203 (2021).
112. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem* **79**, 4215–4221 (2007).
113. Chen, C., Zhou, G., Sun, F., Liu, J. & Liu, X. A sensitive hydrogen peroxide biosensor based on a new electron mediator 1-aminoethoxy-5-ethylphenazine dioctyl sulfosuccinate. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **917**, 116390 (2022).
114. Morrin, A., Guzman, A., Killard, A. J., Pingarron, J. M. & Smyth, M. R. Characterisation of horseradish peroxidase immobilisation on an electrochemical biosensor by colorimetric and amperometric techniques. *Biosens Bioelectron* **18**, 715–720 (2003).
115. Feyzizarnagh, H. *et al.* Amperometric mediatorless hydrogen peroxide sensor with horseradish peroxidase encapsulated in peptide nanotubes. *Sens Biosensing Res* **7**, 38–41 (2016).
116. Dai, M. *et al.* Horseradish peroxidase-catalyzed polymerization of l-DOPA for mono-/bi-enzyme immobilization and amperometric biosensing of H₂O₂ and uric acid. *Talanta* **149**, 117–123 (2016).

117. Eguílaz, M., Villalonga, R., Agüí, L., Yáñez-Sedeño, P. & Pingarrón, J. M. Gold nanoparticles: Poly(diallyldimethylammonium chloride)-carbon nanotubes composites as platforms for the preparation of electrochemical enzyme biosensors: Application to the determination of cholesterol. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **661**, 171–178 (2011).
118. Ghalehno, M. H., Mirzaei, M. & Torkzadeh-Mahani, M. Electrochemical aptasensor for activated protein C using a gold nanoparticle – Chitosan/graphene paste modified carbon paste electrode. *Bioelectrochemistry* **130**, 107322 (2019).
119. Lu, Q. *et al.* Flexible paper-based Ni-MOF composite/AuNPs/CNTs film electrode for HIV DNA detection. *Biosens Bioelectron* **184**, 113229 (2021).
120. Arkan, E., Saber, R., Karimi, Z., Mostafaie, A. & Shamsipur, M. Multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode modified with gold nanoparticles as a base for preparation of a novel impedimetric immunosensor for low level detection of human serum albumin in biological fluids. *J Pharm Biomed Anal* **92**, 74–81 (2014).
121. Kala, D. *et al.* Development of paper-based DNA sensor for detection of O. tsutsugamushi using sustainable GQDs@AuNPs nanocomposite. *Chemosphere* **300**, 134428 (2022).
122. Zhang, M., Zhang, B., Li, T., Zhu, X. & Guo, W. Electrochemical detection of aminoglycoside antibiotics residuals in milk based on magnetic molecularly imprinted particles and metal ions. *Food Chem* **389**, 133120 (2022).
123. Altintas, Z., Kallempudi, S. S., Sezerman, U. & Gurbuz, Y. A novel magnetic particle-modified electrochemical sensor for immunosensor applications. *Sens Actuators B Chem* **174**, 187–194 (2012).
124. Lenzini, L., Patti, F. Di, Lepri, S., Livi, R. & Luccioli, S. Thermodynamics of DNA denaturation in a model of bacterial intergenic sequences. *Chaos Solitons Fractals* **130**, 109446 (2020).

125. Yin, S., Hossain, M. N., Li, Y., Sun, C. & Kraatz, H. B. Development of a novel electrochemical aptasensor based on catalytic hairpin assembly and DNA tetrahedron for the detection of 25-hydroxyvitamin D3. *Sens Actuators B Chem* **354**, 131217 (2022).
126. Zhang, R. Y. *et al.* A novel electrochemical biosensor for exosomal microRNA-181 detection based on a catalytic hairpin assembly circuit. *Anal Chim Acta* **1157**, 338396 (2021).
127. Macedo, D. X., Guedes, I. & Albuquerque, E. L. Thermal properties of a DNA denaturation with solvent interaction. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* **404**, 234–241 (2014).
128. Lang, B. E. & Schwarz, F. P. Thermodynamic dependence of DNA/DNA and DNA/RNA hybridization reactions on temperature and ionic strength. *Biophys Chem* **131**, 96–104 (2007).
129. Armitage, B. A. The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization. *Drug Discov Today* **8**, 222–228 (2003).
130. Wang, Y. *et al.* Triblock polyadenine probe-based electrochemical DNA sensor by integrating 3D DNAzyme walker and strand displacement for ultrasensitive and rapid detection of Pb²⁺. *Sens Actuators B Chem* **347**, 130636 (2021).
131. Wang, L. *et al.* Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe. *Biosens Bioelectron* **51**, 201–207 (2014).
132. Serafín, V. *et al.* Graphene quantum dots-functionalized multi-walled carbon nanotubes as nanocarriers in electrochemical immunosensing. Determination of IL-13 receptor $\alpha 2$ in colorectal cells and tumor tissues with different metastatic potential. *Sens Actuators B Chem* **284**, 711–722 (2019).
133. Szymczyk, A., Soliwodzka, K., Moskal, M., Rózanowski, K. & Ziółkowski, R. Further insight into the possible influence of electrode blocking agents

- on the stem-loop based electrochemical DNA sensor parameters. *Sens Actuators B Chem* **354**, 131086 (2022).
134. Zouari, M., Campuzano, S., Pingarrón, J. M. & Raouafi, N. Competitive RNA-RNA hybridization-based integrated nanostructured-disposable electrode for highly sensitive determination of miRNAs in cancer cells. *Biosens Bioelectron* **91**, 40–45 (2017).
 135. Miller, J. N. Basic statistical methods for Analytical Chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *Analyst* **116**, 3–14 (1991).
 136. Razzino, C. A. *et al.* An electrochemical immunosensor using gold nanoparticles-PAMAM-nanostructured screen-printed carbon electrodes for tau protein determination in plasma and brain tissues from Alzheimer patients. *Biosens Bioelectron* **163**, 112238 (2020).
 137. R.C Fonseca, W. T. F. Desenvolvimento de Método Eletroanalítico Utilizando Sensores Eletroquímicos Descartáveis para Detecção do Biomarcador miRNA-203 Visando o Diagnóstico de Câncer de Cabeça e Pescoço. *UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS Centro de Ciências Exatas e Tecnológica Programa de Pós-Graduação em Química* (2020).
 138. Zhuang, J., Wan, H. & Zhang, X. Electrochemical detection of miRNA-100 in the sera of gastric cancer patients based on DSN-assisted amplification. *Talanta* **225**, (2021).
 139. Torul, H. *et al.* Paper-based electrochemical biosensors for voltammetric detection of mirna biomarkers using reduced graphene oxide or mos2 nanosheets decorated with gold nanoparticle electrodes. *Biosensors (Basel)* **11**, (2021).
 140. Gundagatti, S. & Srivastava, S. Development of Electrochemical Biosensor for miR204-Based Cancer Diagnosis. *Interdiscip Sci* **14**, 596–606 (2022).

141. Serrano, V. M., Silva, I. S. P., Cardoso, A. R. & Sales, M. G. F. Carbon Electrodes with Gold Nanoparticles for the Electrochemical Detection of miRNA 21-5p. *Chemosensors* **10**, (2022).
142. Shi, Y., Wang, Q. & Xu, F. Highly Sensitive Detection of miRNA-21 Based on Electrochemical Immunosensor. *Int J Electrochem Sci* **17**, (2022).
143. Moazampour, M., Zare, H. R., Shekari, Z. & Mohammad Moshtaghioun, S. Development of an electrochemical genosensor for quantitative determination of miR-200a based on the current response of ferrocene-functionalized graphene oxide nanosheets. *Microchemical Journal* **185**, (2023).
144. Khosravi, F., Rahaie, M., Ghaani, M. R., Azimzadeh, M. & Mostafavi, E. Ultrasensitive electrochemical miR-155 nanocomposite biosensor based on functionalized/conjugated graphene materials and gold nanostars. *Sens Actuators B Chem* **375**, (2023).
145. Cimmino, W. *et al.* Design of a printed electrochemical strip towards miRNA-21 detection in urine samples: optimization of the experimental procedures for real sample application. *Anal Bioanal Chem* **415**, 4511–4520 (2023).
146. Shahbazi-Derakhshi, P. *et al.* An Ultrasensitive miRNA-Based Genosensor for Detection of MicroRNA 21 in Gastric Cancer Cells Based on Functional Signal Amplifier and Synthesized Perovskite-Graphene Oxide and AuNPs. *Biosensors (Basel)* **13**, (2023).
147. Akbari, A. *et al.* Detection of plasma miR-223 by a novel label-free graphene oxide/gold nanocomposite immunosensor in colorectal cancer patients: An electrochemical biosensor approach. *Biosens Bioelectron X* **14**, (2023).
148. Diniz, G. P., Takano, A. P. & Barreto-Chaves, M. L. M. miRNA-208a and miRNA-208b are triggered in thyroid hormone-induced cardiac

hypertrophy – Role of type 1 Angiotensin II receptor (AT1R) on miRNA-208a/ α -MHC modulation. *Mol Cell Endocrinol* **374**, 117–124 (2013).