

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

HENRIQUE ANTONIO MENDONÇA FARIA

**Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos
vírus da zika e da dengue**

São Carlos
2016

HENRIQUE ANTONIO MENDONÇA FARIA

**Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos
vírus da zika e da dengue**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto.

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de pesquisa e estudo desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Faria, Henrique Antonio Mendonça
Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos
vírus da zika e da dengue / Henrique Antonio Mendonça
Faria; orientador Valtencir Zucolotto - versão
corrigida -- São Carlos, 2016.
119 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. Genossensor. 2. Evaporação térmica. 3. Label-
Free. 4. Diagnóstico. 5. Zika. I. Zucolotto,
Valtencir, orient. II. Título.

À Victória Régia, que sempre me inspirou estudar e evoluir;

À Simoni Venturini, pelo apoio, amor e compreensão;

À Victória Elisa, nossa melhor obra.

AGRADECIMENTOS

Às três mulheres que marcaram minha vida: Victória Régia (*in memoriam*), mãe, pela inspiração; Simoni Venturini, esposa, pelo companheirismo e amor e Victória Elisa, filha, pela razão de continuar. Sem vocês o trabalho de doutorado não teria chegado ao final.

Ao meu pai José Maria (*in memoriam*) por ter me ensinado a disciplina, tão necessária para vencer tantas etapas na vida.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pelo apoio e suporte no desenvolvimento da pesquisa durante todo o período do doutorado.

Ao Instituto de Física de São Carlos, incluindo todos aos setores de apoio: biblioteca, oficina mecânica, oficina de óptica e pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de doutorado e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia, pela assessoria e disponibilidade nas medidas de microscopia de força atômica.

E finalmente a todos os colegas do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia que os anos de convivência me ensinaram novos olhares para ciência e para o mundo.

*Não vai demorar que passemos adiante uma grande e
bela ciência, que faz arte em defesa da vida.*

CARLOS CHAGAS, 1928

RESUMO

FARIA, H. A. M. **Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos vírus da zika e da dengue**. 2016. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Após setenta anos de sua descoberta, o vírus da zika surgiu no Brasil, espalhou-se rapidamente pelas Américas e trouxe complicações incomuns em doenças causadas por *Flavivirus*, como a microcefalia. A Organização Mundial da Saúde classifica a zika como a doença viral mais preocupante da atualidade e considera urgente desenvolver novos métodos de diagnóstico para ela e doenças correlatas como a dengue. Embora existam exames para identificar infecções pelos vírus dessas duas doenças, ainda não há um método rápido, específico e de baixo custo para o diagnóstico precoce. Visando preencher essa lacuna, este trabalho teve como objetivo construir dois tipos de biossensores eletroquímicos de DNA para detecção *label-free* desses dois vírus. Foram fabricados eletrodos descartáveis em substrato de politereftalato de etileno metalizado com filme fino de ouro nas configurações com um e três contatos. As sequências genéticas de iniciadores e sondas de captura foram desenhadas especialmente para este trabalho com base na análise dos genomas dos vírus. O primeiro biossensor utilizou o eletrodo em uma célula eletroquímica e foi capaz de identificar sequências de DNA da zika ou da dengue. As análises por espectroscopia de impedância eletroquímica mostraram que o biossensor é seletivo à sequência alvo com limite de detecção de $(9,86 \pm 0,89) \text{ nmol L}^{-1}$. O segundo biossensor utilizou um eletrodo de três contatos para identificação de sequências de DNA em uma gota da amostra. No contato central, usado como eletrodo de trabalho, foi imobilizada a sequência de captura e os contatos laterais funcionaram como eletrodos de referência e auxiliar. Nesse sistema as medidas de impedância indicaram limite de detecção de $(25,0 \pm 1,7) \text{ nmol L}^{-1}$. Os biossensores desenvolvidos mostraram seletividade para identificar o material genético dos vírus da zika e da dengue nos ensaios com DNA sintético e, portanto, são promissores para a análise de amostras reais, principalmente de produtos da polimerase da cadeia reversa.

Palavras-chave: Genossensor. Evaporação térmica. *Label-free*. Diagnóstico. Zika.

ABSTRACT

FARIA, H. A. M. **Disposable DNA biosensors for zika and dengue diagnosis**. 2016. 119 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

After seventy years of its discovery, zika virus has emerged in Brazil, spread rapidly throughout the Americas, bringing unusual complications in diseases caused by flaviviruses, such as microcephaly. The World Health Organization classifies zika as the most harmful viral disease today and considers urgent the development of new diagnostic methods for zika and related diseases, such as dengue. Although there are tests to identify both infections, no current diagnostic method is rapid, specific and cost-effective. This thesis describes two types of electrochemical DNA biosensors for label-free detection of these zika and dengue. Disposable electrodes were fabricated on polyethylene terephthalate substrates covered with a nanometric gold layer by thermal evaporation, manufactured in one- and three-contact configurations. Genetic sequences of primers and complementary capture probes were designed based on the analysis of the virus genomes. The first biosensor we developed used the new electrode in an electrochemical cell and was able to identify zika or dengue DNA sequences. Analyses by electrochemical impedance spectroscopy showed that these biosensors are selective for zika or dengue with a detection limit of $(9.86 \pm 0.89) \text{ nmol L}^{-1}$. A second type of biosensor used a three-contact electrode to identify DNA sequences in a drop of sample. In the central contact, used as a working electrode, the capture sequence was immobilized and the lateral contacts acted as reference and auxiliary electrodes. In this system the impedance measurements indicated a limit of detection of $(25.0 \pm 1.7) \text{ nmol L}^{-1}$. The developed biosensors showed selectivity for zika and dengue in the synthetic DNA assays, and therefore are promising for the analysis of real samples, especially the polymerase chain reaction amplicon.

Keywords: DNA biosensor. Thermal evaporation. Label-free. Diagnosis. Zika.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Corrente alternada
AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CHIKV	Vírus da chikungunya
CV	<i>Cyclic voltammetry</i>
DENV	Vírus da dengue
DPV	<i>Differential pulse voltammetry</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDX	Espectro de raios X por energia dispersiva
EIS	<i>Electrochemical impedance spectroscopy</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	<i>European Patent Office</i>
FET	Transistor de efeito de campo
FRA	<i>Frequency Response Analyser</i>
GPES	<i>General Purpose Electrochemical System</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IUPAC	<i>Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JEV	Vírus da encefalite japonesa
LEV	Vírus da encefalite de St. Louis
MCH	Mercaptohexanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MVE	Murray vírus
NS5	Proteína não estrutural nos <i>Flavivirus</i>
PB	<i>Phosphate buffer</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PET	Politereftalato de etileno
PRNT	<i>Plaque reduction neutralization test</i>

RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SAMs	<i>Self-assembled monolayers</i>
SPEs	<i>Screen-printed electrodes</i>
SWV	<i>Square wave voltammetry</i>
TE	Tampão tris(hidroximetil)aminometano / ácido etilenodiamino tetra-acético
USPTO	<i>United States Patent Trademark Office</i>
UV	Espectroscopia de absorção no ultravioleta (λ entre 340 a 220 nm)
WHO	<i>World Health Organization</i>
WNV	Vírus do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKV	Vírus da zika

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>IgM</i>	Imunoglobulina M
<i>IgG</i>	Imunoglobulina G
<i>CG</i>	Citosina-guanina
<i>AT</i>	Adenina-timina
T_m	Temperatura de fusão [°C]
<i>bp</i>	Pares de bases do DNA
<i>cDNA</i>	Ácido desoxirribonucleico complementar
R_{ct}	Resistência de transferência de carga [Ω]
R_a	Rugosidade por área [m]
R_{rms}	Rugosidade quadrática média [m]
<i>Zcap</i>	Sequência de DNA de captura do vírus da zika
<i>Dcap</i>	Sequência de DNA de captura do vírus da dengue
<i>Zamp</i>	Sequência de DNA alvo do vírus da zika
<i>Damp</i>	Sequência de DNA alvo do vírus da dengue
<i>A230</i>	Absorbância no espectro UV no comprimento de onda de 230 nm
<i>A260</i>	Absorbância no espectro UV no comprimento de onda de 260 nm
<i>A280</i>	Absorbância no espectro UV no comprimento de onda de 280 nm
λ_{max}	Comprimento de onda de absorção máxima [m]
A_{ea}	Área eletroativa do eletrodo [m ²]
A_{ge}	Área geométrica do eletrodo [m ²]
<i>DNAcap</i>	Sequência de DNA de captura
<i>DNAamp</i>	Sequência de DNA alvo complementar
<i>Au-PET</i>	Eletrodo de Au metalizado em substrato de PET com trilha única
<i>Au3-PET</i>	Eletrodo de Au metalizado em substrato de PET com três contatos
<i>R</i>	Rugosidade
E_{pa}	Pico de potencial anódico [V]
E_{pc}	Pico de potencial catódico [V]
ΔE_p	Diferença entre o pico de potencial catódico e anódico $ E_{pa} - E_{pc} $ [V]
I_{pa}	Pico de corrente anódica [A]
I_{pc}	Pico de corrente catódica [A]
<i>J</i>	Densidade de corrente [A m ⁻²]

Λ	Grau de reversibilidade do sistema eletroquímico
k_o	Constante de velocidade [m s^{-1}];
D_r	Coefficientes de difusão da espécie reduzida [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
D_o	Coefficientes de difusão da espécie oxidada [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]
F	Constante de Faraday ($96485,3328 \text{ C mol}^{-1}$)
n	Número de elétrons em uma reação
R	Constante dos gases [$\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$]
T	Temperatura absoluta [K]
f_R	Fator de rugosidade
n_a	Número de mols de gás adsorvido
N_A	Constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$)
d_{as}	Densidade atômica superficial do ouro [átomos cm^{-2}]
e	Carga elementar [C]
Q_m	Carga para redução do óxido de ouro [C]
Q_{dc}	Carga da dupla camada capacitiva [C]
ε	Coefficiente de extinção [$\text{mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$]
l	Caminho óptico na espectroscopia UV [cm]
C	Concentração [mol L^{-1}]
$A_{\lambda_{max}}$	Absorbância no comprimento de onda máximo
R_{Ω}	Resistência ôhmica devida ao eletrólito [Ω]
R_w	Impedância de Warburg [Ω]
C_{dc}	Capacitância da dupla camada [C]
R_{ct}	Resistência de transferência de carga [Ω]
Z''	Componente imaginária da impedância [Ω]
Z'	Componente real da impedância [Ω]
ω	Frequência angular de oscilação [Hz]
$R_{ct \text{ limpo}}$	Resistência de transferência de carga no eletrodo limpo [Ω]
$R_{ct \text{ Imob}}$	Resistência de transferência de carga com sequência de captura imobilizada [Ω]
$R_{ct \text{ Hibrid}}$	Resistência de transferência de carga com sequência alvo hibridizada [Ω]
LOD	Limite de detecção inferior [mol L^{-1}]
SD	Desvio padrão do branco

SUMÁRIO

Capítulo 1 INTRODUÇÃO	19
Capítulo 2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
Capítulo 3 REVISÃO DA LITERATURA	23
3.1 Zika uma doença de muitas faces	23
3.1.1 Epidemiologia do vírus da zika	23
3.1.2 Virologia	24
3.1.3 Modos de transmissão do vírus da zika	24
3.1.4 Aspectos clínicos e complicações neurológicas	26
3.1.5 Diagnóstico para as infecções de zika	28
3.1.6 Tratamento prevenção e controle	31
3.2 Dengue uma doença viral com quatro sorotipos	32
3.3 Projeto de iniciadores e sondas de DNA para diagnóstico de doenças	33
3.3.1 Parâmetros intrínsecos do iniciador e sonda de captura	36
3.3.2 Parâmetros extrínsecos entre os pares de iniciadores e sondas de captura	36
3.4 Biossensores eletroquímicos para detecção de DNA	37
3.5 Patentes relacionadas aos biossensores de DNA	43
Capítulo 4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Fabricação de eletrodos descartáveis de Au-PET	47
4.2 Caracterização morfológica dos eletrodos	48
4.3 Caracterização eletroquímica dos eletrodos	48
4.3.1 Voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica	48
4.3.2 Sensibilidade do eletrodo Au-PET com o pH	49
4.4 Caracterização das sequências de captura e sequências alvo de DNA sintético	49
4.4.1 Caracterização das sequências por espectroscopia de absorção no ultravioleta	49
4.4.2 Caracterização das sequências de DNA por microscopia de força atômica	51
4.5 Técnicas de caracterização	51
4.5.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV)	51
4.5.2 Microscopia de força atômica (AFM)	52
4.5.3 Voltametria cíclica (CV)	52
4.5.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)	52
4.5.5 Voltametria de pulso diferencial (DPV)	52
4.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.6 Etapas de construção do biossensor	53
Capítulo 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Fabricação dos eletrodos de Au-PET	55
5.2 Morfologia dos eletrodos descartáveis de Au-PET	57
5.2.1 Estudo da morfologia e rugosidade dos eletrodos de Au-PET	57
5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura	60

5.3	Caracterização eletroquímica do eletrodo de trilha única (Au-PET)	62
5.3.1	Voltametria cíclica	62
5.3.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica	64
5.3.3	Cálculo da área eletroativa dos eletrodos Au-PET	65
5.3.4	Sensibilidade do eletrodo Au-PET com relação ao pH	68
5.4	Projeto de iniciadores, sondas de captura e sequências alvo para detecção dos vírus da zika e da dengue	69
5.5	Determinação das concentrações e análise de pureza das soluções de DNA	72
5.6	Visualização de sequências de DNA por AFM	74
Capítulo 6 BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE ZIKA E DENGUE EM CÉLULA ELETROQUÍMICA		77
6.1	Introdução	77
6.2	Descrição da configuração experimental	77
6.2.1	Imobilização de sequências de captura nos eletrodos	78
6.2.2	Reação de hibridização das sequências no biossensor	79
6.3	Biossensor para detecção de zika na célula eletroquímica	79
6.3.1	Espectroscopia de impedância eletroquímica e circuito equivalente	79
6.3.2	Tempo de imobilização das sondas de captura <i>Zcap</i>	84
6.3.3	Temperatura de imobilização das sondas de captura <i>Zcap</i>	86
6.3.4	Concentrações de imobilização das sondas de captura <i>Zcap</i>	87
6.3.5	Hibridização de DNA complementar (<i>Zamp</i>) e não complementar (<i>Damp</i>)	88
6.4	Biossensor para detecção de dengue na célula eletroquímica	92
6.4.1	Descrição da configuração experimental	92
6.4.2	Tempo de imobilização das sondas de captura <i>Dcap</i>	92
6.4.3	Temperatura de imobilização das sondas de captura <i>Dcap</i>	92
6.4.4	Concentrações de imobilização das sondas de captura <i>Dcap</i>	93
6.4.5	Hibridização de DNA complementar (<i>Damp</i>) e não complementar (<i>Zamp</i>)	93
Capítulo 7 BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE ZIKA EM ELETRODO DE TRÊS CONTATOS (Au³-PET)		95
7.1	Caracterização eletroquímica do eletrodo de três contatos Au ³ -PET	95
7.1.1	Cálculo da área eletroativa do eletrodo Au ³ -PET na célula eletroquímica	95
7.1.2	Voltametria cíclica do eletrodo Au ³ -PET no sistema de gota	96
7.1.3	Imobilização de sequências de captura nos eletrodos	97
7.1.4	Reação de hibridização das sequências no biossensor	98
7.2	Hibridização de DNA complementar (<i>Zamp</i>) e não complementar (<i>Damp</i>)	98
Capítulo 8 CONCLUSÕES		103
Capítulo 9 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS		105
REFERÊNCIAS		107
Anexo A Sequência genômica da proteína NS5 do vírus da zika		117
Anexo B Sequência genômica da proteína NS5 do vírus da dengue		119

1 INTRODUÇÃO

O vírus da zika é um *Flavivirus* da família *Flaviridae* do mesmo gênero da dengue e febre amarela. O vírus da zika permaneceu em obscuridade por 70 anos e até março de 2015 nenhum caso havia sido reportado no Brasil.¹ Foi então introduzido no país, vindo das ilhas do Pacífico, e em um período de um ano espalhou-se rapidamente pelas Américas.² As infecções pelo vírus da zika nas Américas ainda são de difícil avaliação clínica porque no início de manifestação os sintomas são inespecíficos e a reatividade cruzada dos anticorpos com outros *Flavivirus* como a dengue complica o diagnóstico sorológico. Portanto, dado o histórico de alta incidência de dengue na região, milhões de infecção por zika podem ocorrer à medida que o vírus continue a se espalhar.³⁻⁴

A *World Health Organization* (WHO) levantou diversas questões para a condução da doença, em um encontro em Genebra em março de 2016 que envolveu 130 *experts* de 27 países, com especialistas em virologia, imunologia, epidemiologia, neurologia, desenvolvedores de produtos e fundos de investimentos. Para a Organização, é urgente produzir e desenvolver novos métodos de diagnóstico para o vírus da zika e doenças infecciosas relacionadas.⁵ Atualmente, uma das grandes necessidades para as autoridades de saúde no campo do diagnóstico é a identificação precoce das infecções pelos vírus da zika e dengue.

No Brasil o número de casos dessas duas doenças continua crescendo. Em especial a zika vem alarmando a população, não só do país, mas de todo o mundo devido à correlação com microcefalia em recém-nascidos e transmissão sexual. Todas as 27 unidades da Federação confirmaram laboratorialmente autoctonia da transmissão da zika com um número total de 200 mil casos registrados, até a semana epidemiológica 37 de 2016 (Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, volume 47, n. 34). No que se refere à dengue, o número de casos notificados no Brasil no ano de 2016, até a semana 37, foi de aproximadamente 1,44 milhões, o que mostra a equiparação com o número total de casos de 2015 (1,44 milhões).

A grande necessidade no campo do diagnóstico dessas duas doenças com significativos impactos na população motivou a elaboração deste trabalho que teve como objetivo desenvolver um novo método de diagnóstico para essas duas doenças virais. Foram então projetados, e construídos biossensores eletroquímicos para a análise molecular de sequências genéticas que identificam esses dois vírus. A triagem e encaminhamento dos pacientes logo no início dos sintomas são cruciais para diminuição dos impactos dessas duas doenças. Nesse sentido, a análise molecular apresenta vantagens para diferenciar os vírus da

zika e dengue quando comparados com testes sorológicos e ELISA. Assim, o foco central deste trabalho foi projetar e construir biossensores capazes de analisar produtos da técnica da polimerase da cadeia reversa (do inglês, *Polymerase Chain Reaction* - PCR), e associar os avanços da pesquisa em biossensores com essa técnica consolidada de análise molecular. Esperamos que esta estratégia possa levar o diagnóstico precoce da zika e dengue para locais sem estrutura laboratorial.

Os biossensores são vantajosos com relação a outras técnicas de análise de produtos da PCR, pois, podem agregar rapidez e precisão ao ensaio molecular, podendo ainda realizar a análise simultânea de múltiplos analitos.⁶ Os biossensores eletroquímicos de DNA desenvolvidos neste trabalho, também chamados de genossensores, são compostos por um transdutor de sinal eletroquímico e um fragmento de DNA como elemento biológico de reconhecimento. Os dispositivos estão baseados no evento da hibridização, que na biologia molecular consiste na ligação por pontes de hidrogênio entre as bases de uma fita de captura imobilizada no biossensor e fita alvo presente na amostra.⁷ O termo hibridização gera uma mudança na impedância da superfície do transdutor que é então mensurada por técnicas eletroanalíticas. Os biossensores foram projetados e fabricados em eletrodos descartáveis com o objetivo de analisar produtos da PCR. Até a conclusão deste trabalho foram desenhadas as sequências para diferenciar os vírus da zika e dengue, fabricados os transdutores e construídos dois tipos de biossensores que foram então testados com DNA sintético.

A tese está organizada em nove capítulos, como segue: No **capítulo 1** a motivação para realização do trabalho é apresentada, em seguida no **capítulo 2** os objetivos para sua concretização. O **capítulo 3** traz uma revisão bibliográfica das infecções pelos vírus da zika e dengue. A metodologia para o projeto de iniciadores e sondas de DNA e os principais avanços no desenvolvimento dos biossensores eletroquímicos de DNA, com foco na detecção *label-free*. Por último a relação e descrição das principais patentes de métodos e dispositivos genossensores. O **capítulo 4** descreve os materiais utilizados assim como, metodologias e técnicas de caracterização empregadas em cada etapa do desenvolvimento dos biossensores. O **capítulo 5** apresenta os resultados referentes à fabricação dos transdutores, projeto de iniciadores e sondas de captura, bem como caracterizações morfológicas e eletroquímicas. No **capítulo 6** são apresentados os resultados da construção de biossensores para zika e dengue com funcionamento em célula eletroquímica convencional e DNA sintético. E no **capítulo 7** os resultados de um biossensor de três contatos descartável para identificação de sequências virais em uma gota de amostra. O **capítulo 8** apresenta as conclusões finais e no **capítulo 9** são sugeridas as próximas etapas para continuidade deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é desenvolver biossensores eletroquímicos descartáveis para detecção de sequências de DNA dos vírus da zika e dengue.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Projetar e fabricar eletrodos evaporados descartáveis para utilização em biossensores eletroquímicos;
- ✓ Caracterizar morfologicamente a superfície condutiva dos eletrodos;
- ✓ Caracterizar os eletrodos por técnicas eletroanalíticas;
- ✓ Desenhar, *in silico*, iniciadores (*primers*) e sondas de captura específicas para amplificar e identificar as sequências alvo dos vírus da zika e dengue;
- ✓ Otimizar as etapas de imobilização das sequências de captura na superfície do eletrodo utilizando DNA sintético;
- ✓ Caracterizar a reação de hibridização entre a sequência de captura e sequência de DNA alvo utilizando eletrodos em célula eletroquímica convencional;
- ✓ Construir e caracterizar biossensor com três contatos, em uma única tira de teste, para realizar a detecção de sequências virais de DNA em uma gota.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Zika uma doença de muitas faces

3.1.1 Epidemiologia do vírus da zika

O vírus da zika é um *Flavivirus* da família *Flaviridae* do gênero *Flavivirus*, cujo genoma foi sequenciado em 2006. Foi isolado pela primeira vez em 1947 no macaco *Rhesus* sentinela durante um estudo sobre febre amarela na floresta de Zika, Uganda. A transmissão ocorre principalmente por mosquitos do gênero *Aedes*, mas pode ocorrer por infecção congênita⁸ e por contato sexual.⁹

O vírus da zika permaneceu em obscuridade por 70 anos e até março de 2015 nenhum caso havia sido reportado no Brasil. Então, foi introduzido no país, vindo das ilhas do Pacífico, e em um período de um ano espalhou-se rapidamente pela Américas.² Entre abril e novembro de 2015, 18 dos 27 estados brasileiros reportaram casos autóctones do vírus da zika. Após emergir no Brasil foi observado um crescimento de 20 vezes nos casos de microcefalia¹⁰, o que colocou a zika no posto da mais preocupante doença infecciosa ligada às deficiências nos recém-nascidos. O aumento da microcefalia causou um alerta global, e a *World Health Organization* (WHO), em dezembro de 2015, emitiu o primeiro alerta sobre a associação da infecção por zika e síndromes de má formação congênitas neurológicas.¹¹

A doença causada pelo vírus da zika em humanos foi reconhecida pela primeira vez na Nigéria, em 1953.¹² Após mais de meio século, em 2007, o vírus da zika causou surpresa quando reapareceu na ilha de YAP, Micronésia, com ocorrência de 5000 infecções em uma população total de 6700 habitantes.⁹ Os médicos da ilha reportaram uma epidemia caracterizada pelo aparecimento de erupções na pele, conjuntivite e artralgia. Embora alguns pacientes contivessem anticorpos IgM contra o vírus da dengue, os sintomas da nova doença eram diferentes. Um teste subsequente através da análise molecular comprovou ser uma epidemia de infecção pelo vírus da zika. O fato mais significativo foi que desde a descoberta do vírus em 1947, nenhum outro surto havia sido relatado e somente 14 casos de zika haviam sido identificados no intervalo de 60 anos.⁹ Seis anos depois, um novo surto na Polinésia francesa entre 2013 e 2014 envolvendo 32.000 pessoas redirecionou o foco da atenção para as infecções por zika.¹³

O vírus da zika foi identificado pela primeira vez nas Américas em março de 2015 quando um surto de uma doença, ainda desconhecida, que apresentava exantema ocorreu na

Bahia, Brasil.¹⁴ As datas epidemiológicas indicam que o surto começou em Fevereiro e estendeu-se até Junho de 2015.¹⁵ Em Outubro, o vírus já havia se espalhado por 14 estados brasileiros e o primeiro caso de infecção autóctone fora registrado na Colômbia. O ministério da saúde do Brasil estimou em 1,3 milhões de casos suspeitos até o final de 2015 e até março de 2016 a Colômbia já havia registrado 51.473 casos da doença. No início de 2016 o vírus da zika já estava presente em 33 países e territórios das Américas.¹⁶

3.1.2 Virologia

Os dados moleculares das sequencias do vírus da zika são suficientes para revelar padrões de sua evolução e migração. O vírus originado no leste da África, subsequentemente, se espalhou pelo oeste do continente e então para Ásia, resultando em três linhagens fundamentais: Nigeriana, conjunto MR766 e Asiática.¹⁷ Todas as sequências relacionadas com as epidemias nas Américas são do genótipo asiático, mais próximas das sequências de YAP, Camboja, Tailândia e Polinésia Francesa.¹⁸ As sequências das Américas, até então analisadas são geneticamente similares, com aproximadamente 99% de homologia com a linhagem asiática.

Por outro lado, há uma conservação forte em todas as sequências existentes no mundo, com menos de 12% de divergência de nucleotídeos.¹⁹ Esse é um dado relevante para o desenvolvimento de vacinas ou métodos de diagnóstico baseados no genoma, pois podem ser universais quando convenientemente planejados. Contudo, devido à natureza muito próxima entre os *Flavivirus*, detalhes adicionais no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e vacinas devem ser observados para que seja possível distinguir esses vírus.

3.1.3 Modos de transmissão do vírus da zika

O ciclo de transmissão selvagem envolvendo primatas só foi identificado na África²⁰ e nos meios urbanos, o vírus da zika é transmitido em um ciclo que envolve: homem – mosquito – homem. Duas espécies do mosquito aedes, o *aegypti* e o *albopictus*, têm sido identificados como os principais vetores.²¹ O vírus da zika é encontrado com pequena frequência em outras espécies de mosquitos como anófeles e culex, o que indica que esses gêneros possuem uma baixa capacidade vetorial.²⁰ A **Figura 3.1** ilustra o ciclo de infecção pelo vírus da zika e os efeitos severos relacionados à doença.

Evidências substanciais indicam que o vírus da zika possui transmissão congênita, ou seja, quando o vírus é transmitido da mãe para o embrião ou para o feto durante a gravidez, porque o RNA do vírus da zika foi detectado no fluido amniótico de mães cujos fetos apresentaram anormalidades detectadas por ultrassonografia.²²⁻²³ Outros estudos relatam que antígenos virais de RNA foram encontrados em tecidos do cérebro e placentas de crianças que nasceram com microcefalia e faleceram após o parto.²⁴ A extensão dos efeitos na formação dos fetos serão comentados com mais detalhes no item 3.1.4.

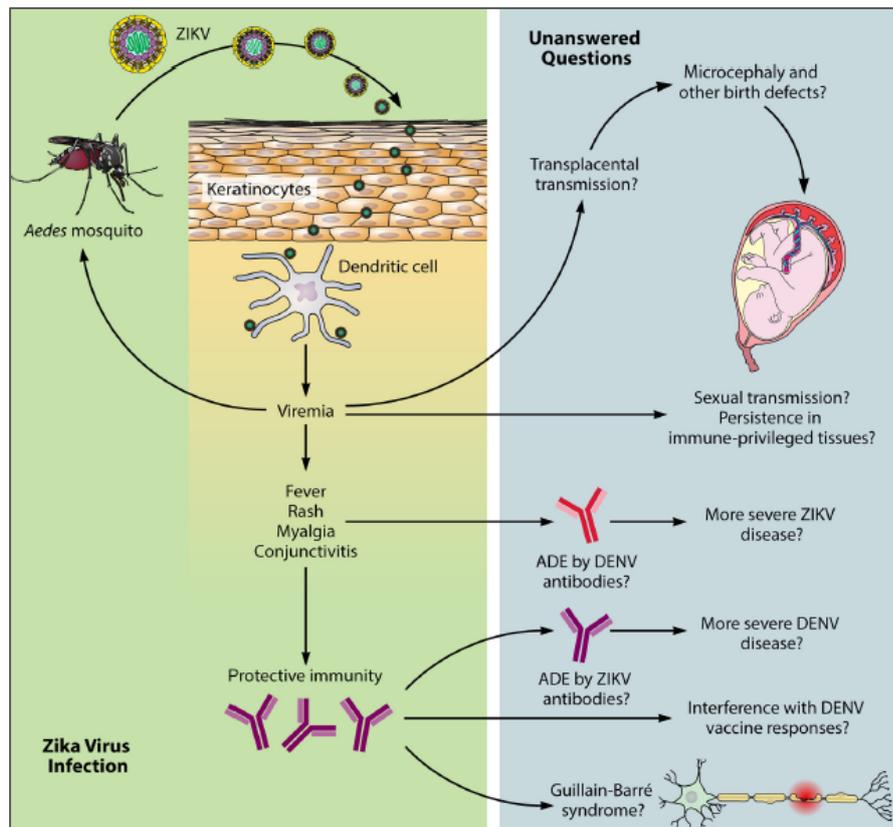


Figura 3.1 - Ciclo de infecção pelo vírus da zika: o quadro verde ilustra o ciclo típico da infecção; o quadro azul identifica os efeitos severos que podem estar relacionados às infecções. ZIKV - vírus da zika, DENV - vírus da dengue, ADE - relação dependente de anticorpos.

Fonte: LAZEAR; DIAMOND.²⁵

As evidências da transmissão sexual do vírus da zika foram relatadas em dois estudos que mostraram a presença do vírus da zika no sêmen. O primeiro²⁶ reportou um caso de infecção pelo vírus da zika em uma mulher saudável de 24 anos, moradora de Paris, que apresentou os sintomas da doença em 20 fevereiro de 2016. Ela não recebeu nenhuma medicação, nem transfusão de sangue e muito menos viajou para regiões onde a zika é endêmica. Esta paciente relatou ter tido relações sexuais com um homem que esteve no Brasil duas semanas antes do aparecimento dos sintomas na paciente mulher. O paciente homem de 46 anos reportou sintomas de febre, mialgia e erupção cutânea que iniciaram em 7 de

fevereiro de 2016, mas que desapareceram ao chegar a Paris. Através de exames moleculares foi detectada a presença de RNA do vírus da zika no sêmen do paciente, 62 dias após o início dos sintomas,²⁶ o que confirmou a transmissão.

No segundo estudo, um pesquisador americano que trabalhou em uma vila do Senegal em agosto de 2008²⁷ reportou ter sido picado por mosquito várias vezes nesse país. Voltando ao Colorado em 24 de agosto, depois de 6 dias, apresentou sintomas de infecção por zika que foi confirmada por exame de hematoaglutinação de anticorpos. No Colorado, no dia 9 de setembro a mulher do pesquisador começou a apresentar os sintomas da doença. A paciente não esteve em áreas de risco, pois não saiu do país desde 2007 e tampouco havia recebido transfusão de sangue. Nesse caso as evidências indicam que houve a transmissão do pesquisador para sua mulher através do contato sexual. A transmissão por transfusão de sangue é outra via plenamente aceita, já que outros *Flavivirus* como febre amarela e dengue são passados nas transfusões.²⁸

3.1.4 Aspectos clínicos e complicações neurológicas

O período exato de incubação do vírus da zika é ainda desconhecido, mas é similar a outros *Flavivirus* como a dengue. A viremia é detectada quando os sintomas comuns à doença começam a manifestar-se. Entre os infectados durante o surto na Polinésia francesa, em 2014, 269 pacientes apresentaram conjuntivites, artralgia e manchas vermelhas 3 a 10 dias após a confirmação no exame do sangue por RT-PCR.²⁹ Os sintomas mais comuns das infecções ocorridas na epidemia de YAP,⁹ em 2007, foram: erupções na pele (90% dos pacientes), febre (65%), artrite ou artralgia (65%), conjuntivite (55%), mialgia (48%), dores de cabeça (45%), dor retro-orbital (39%), edema (19%) e vômitos (10%). Esses sintomas comuns também têm ocorrido com frequência similar em mulheres grávidas nas infecções por zika no Brasil.

Desde que o vírus da zika foi identificado no Brasil e começou a se espalhar pelas Américas, a infecção por zika durante a gravidez foi associada à má formação dos fetos, sendo a mais relevante a microcefalia. A avaliação dos dados disponíveis,³⁰ até o momento, mostra que existe a ocorrência da microcefalia e má formação no cérebro, causada pelo vírus da zika. Entretanto, muitas questões sobre essa ligação continuam em aberto, como por exemplo, a magnitude da anomalia nos fetos em decorrência do período de gravidez em que a gestante foi infectada pelo vírus.

A microcefalia é uma constatação clínica, verificada pela medida da circunferência cranial, em que as medidas da circunferência levam em conta a idade gestacional e o sexo do

bebê.³¹ Entretanto, a obrigatoriedade do registro carece de um controle durante as correntes epidemias por zika. O Centro para Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Center for Disease Control and Prevention* – CDC) define a microcefalia como sendo a circunferência occipitofrontal abaixo do terceiro percentil para idade gestacional e sexo.³² A prevalência da microcefalia nos Estados Unidos é de aproximadamente 6 a 12 casos a cada 10.000 nascimentos e uma prevalência similar é esperada em outros países.³³

A microcefalia também pode ocorrer por outras causas como: síndromes genéticas, perturbação vascular durante o desenvolvimento cerebral, deficiência nutricional e exposição a toxinas, como o mercúrio, por exemplo.³⁴ Os casos iniciais reportados no Brasil sugerem que alguns dos recém-nascidos com microcefalia relacionada às infecções pelo vírus da zika apresentaram um fenótipo consistente com perturbação cerebral do feto.³⁵⁻³⁷ Uma relação geográfica e temporal foi observada entre a síndrome de Guilherme – Barré e os surtos de infecção pelo vírus da zika no Pacífico e nas Américas.³⁸⁻⁴⁰

As infecções pelo vírus da zika durante a gravidez foram ligadas com deficiências no nascimento, como a microcefalia. Entretanto, a magnitude dos riscos ainda permanece incerta e necessita de um número maior de estudos para a completa avaliação.⁴¹ A caracterização dos efeitos das infecções maternas por rubéola e citomegalovírus serve como referência para comparar os períodos de ocorrência dos sintomas.⁴²⁻⁴³ Para o citomegalovírus, por exemplo, o risco para o feto é maior durante o primeiro trimestre de gravidez.⁴⁴ Estudos preliminares feitos no Brasil indicaram que anormalidades fetais detectadas por ultrassonografia estavam presentes em 29% das mulheres com infecções de zika durante a gravidez.⁴⁵ A perda fetal prematura associada à infecção materna tem ocorrido entre 6 e 32 semanas de gestação.⁴⁶

Na epidemia da Polinésia francesa, 2013-2014 foi estimado o risco de 95% de casos de microcefalia causados por zika no primeiro trimestre da gravidez. Na epidemia corrente no Brasil, a partir de 2015, milhares de casos de crianças com suspeita de microcefalia ou outras anormalidades do sistema nervoso central foram associados à zika. Entretanto, existem incertezas e limitações quanto às estimativas atuais da microcefalia associada à infecções. Primeiramente, porque os dados são limitados, especialmente nos registros do estado da Bahia, onde as taxas de infecção são desconhecidas. As informações são conflitantes devido à dificuldade de confirmação clínica da microcefalia e a não obrigatoriedade do registro desta anormalidade no Brasil antes de 2015.⁴¹

Um estudo recente⁴¹ revelou associação de casos de infecção sintomática de zika durante todos os trimestres da gestação e indicam como período mais crítico o situado entre a décima quarta e a décima sétima semana, ou seja, a transição entre o primeiro e o segundo

trimestre da gestação. Entretanto, a relação entre o primeiro trimestre da gravidez e o risco de microcefalia, tanto na Micronésia como na Bahia não foi claramente esclarecida porque os casos de infecção assintomática de zika na gravidez não são levados em conta. Ainda são deixadas de lado as infecções no estágio inicial quando a gravidez ainda não foi confirmada. Assim, fica clara a necessidade de um maior conjunto de dados que possam avaliar todas as idades gestacionais nos casos de infecção sintomática e assintomática pelo vírus da zika.

O aumento do número de casos de microcefalia no Brasil foi identificado a partir de setembro de 2015, nos recém-nascidos da mesma região em que os casos de zika foram reportados.⁴⁷ Essa elevação de casos também foi notada na epidemia de zika ocorrida entre 2013 e 2014 na Polinésia francesa.²⁹ A suspeita da ligação não foi surpresa, uma vez que já era conhecido a mais de 50 anos, que o vírus da rubéola causa defeitos congênitos. Entretanto, nenhum caso de má formação nos fetos tinham sido registrado nas epidemias de zika na ilha de Yap.³⁰

Até meados de Fevereiro de 2016 mais de 4300 casos de microcefalia foram reportados no Brasil.⁸ Embora, a superestimação e o diagnóstico equívoco possam ter influenciado esse número, a ligação das deformações fetais com a zika foi levantada. Retrospectivamente, pesquisadores franceses identificaram o aumento do número de anormalidades fetais, incluindo a microcefalia após os surtos de infecção por zika na Polinésia em 2013-2014.²⁹ Os achados de RNA do vírus da zika no fluido amniótico²² e tecidos cerebrais de fetos com microcefalia,³⁶ nascidos de mães com antecedentes de infecção por zika durante a gravidez, fornecem forte evidência de ligação da microcefalia com infecções por zika.²⁹

3.1.5 Diagnóstico para as infecções de zika

Os principais diagnósticos para infecções pelo vírus da zika são: a detecção de anticorpos IgM Elisa (do Inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) e a detecção de ácidos nucleicos virais por transcrição reversa da cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction* - RT-PCR). A detecção de ácidos nucleicos em soro fornece diagnóstico definitivo com eficácia durante a fase de viremia, ou seja, até sete dias após o início dos sintomas clínicos.¹⁷ Entretanto, o RNA viral já foi detectado em soro de mulheres grávidas aproximadamente 10 semanas após a infecção, nas quais foi identificada a ocorrência de infecção congênita.³⁷

Embora o período preciso do início e duração de anticorpos IgM, em resposta ao vírus da zika, detectáveis por Elisa não esteja bem definido, dados conhecidos de outros *Flavivirus* sugerem que a IgM aparece após a primeira semana do início dos sintomas e permanece por vários meses após a infecção.⁴⁸

A considerável reatividade cruzada dos anticorpos contra *Flavivirus* dificulta os testes sorológicos. O grande complicador da reatividade cruzada reside no fato de que indivíduos expostos previamente a outro *Flavivirus*, seja através de vacinação ou infecção, irão desenvolver uma resposta imunológica mais rápida do que se tivessem a infecção pela primeira vez.^{17,49-51} Essa resposta é particularmente problemática em países nos quais a dengue é endêmica, ou seja, nos locais onde mais de 90% da população pode ter sido exposta ao vírus da dengue.

A WHO fornece orientações sobre as estratégias atuais de testes da infecção pelo vírus da zika.⁵² A determinação do exame adequado depende do período da doença após o início dos sintomas. Até sete dias após o início dos sintomas o teste recomendado é o de detecção de RNA viral com coleta de sangue total, soro ou urina. Após o sétimo dia o exame recomendado é o de sorologia (detecção de IgM) em amostras de sangue total e soro. Recomenda-se, sempre que possível, a coleta de amostras emparelhadas com diferença de duas a três semanas. Entretanto, os testes positivos de IgM não são conclusivos, apenas indicam casos prováveis da doença. Quando na ausência de IgM da dengue e outros *flavivirus* e teste positivo para IgM da zika haverá a suspeita de exposição recente ao vírus da zika. Em casos de maior risco como em mulheres grávidas o teste de neutralização por redução de placas (do inglês, *plaque reduction neutralization test* – PRNT) é utilizado como exame confirmatório. Nos laboratórios que realizam o PRNT, um aumento de quatro vezes na titulação de anticorpos neutralizadores, com a ausência no título de anticorpos para outros *flavivirus*, constitui forte evidência de infecção recente pelo vírus da zika.

O PRNT é utilizado para quantificar o título de anticorpo neutralizante para um determinado vírus.⁵³ A amostra diluída é adicionada a uma suspensão viral que após a incubação é depositada sobre uma monocamada de células. A superfície da camada celular é fixada em carboximetilcelulose para impedir que o vírus se propague indiscriminadamente. A concentração de unidades formadoras de placas é estimada após alguns dias. As unidades formadoras de placas são medidas por observação microscópica, anticorpos fluorescentes ou corantes específicos que reagem com as células infectadas. A concentração de soro para reduzir o número de placas em 50% em comparação com o vírus livre dá a medida de anticorpos presentes. Esta técnica de imunoensaio é considerada atualmente como mais exata

para a detecção e medição de anticorpos que podem neutralizar um vírus causador da doença. A PRNT possui uma sensibilidade mais elevada do que outros testes como a hemaglutinação e o imunoenensaio enzimático. Além disso, é mais específica do que outros métodos sorológicos para o diagnóstico de arbovírus. Uma limitação desse ensaio é que a capacidade de neutralização dos anticorpos é dependente do tipo e da maturação da célula utilizada.⁵⁴ Portanto, o protocolo de execução é um fator determinante para resultados confiáveis.

No Brasil, em razão da circulação da dengue, a técnica diagnóstica confirmatória mais utilizada é a RT-PCR, implantada em 24 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) e nos laboratórios de referência nacionais.⁵⁵ Os diagnósticos sorológicos (IgM) são recomendados a partir do sétimo dia após o aparecimento dos sintomas. Após o décimo quinto dia também pode ser usada a sorologia por IgG. Em Janeiro de 2017, o Ministério da Saúde emitiu Nota informativa conjunta SVS/SAS contendo informações sobre testes rápidos *BahiaFarma* de zika.⁵⁵ O documento esclarece sobre o fornecimento de testes rápidos imunocromatográficos IgM/IgG para zika, que são testes qualitativos de triagem para detecção diferencial das imunoglobulinas G e M. Quando apresentarem resultado positivo as amostras dos paciente devem ser encaminhadas para realização da sorologia ELISA IgM ou IgG, ou em casos de gestantes e idosos a RT-PCR, em um LACEN.

O CDC apresenta critérios mais atuais para determinar uma possível infecção pelo vírus da zika.⁵⁶ As recomendações do CDC quanto aos exames indicados são iguais ao da WHO, entretanto há uma dilatação do número de dias para os exames de detecção. Para pacientes sintomáticos de infecção por zika, até o décimo quarto dia do início dos sintomas, o CDC indica a detecção de RNA em soro e urina. Para resultado positivo em qualquer amostra o exame molecular é suficiente para diagnosticar a infecção por zika. Se os resultados do exame de RNA forem negativos o soro deverá ser testado quanto à presença de IgM antizika. O teste de IgM antidengue também deve ser realizado se a paciente estiver grávida. Para os indivíduos sintomáticos, após 14 dias do início dos sintomas o teste recomendado é o sorológico IgM, se positivo deverá ser seguido por PRNT para confirmar o diagnóstico. Entretanto, o documento em nota, esclarece que o teste confirmatório por PRNT não é recomendado nos países onde a dengue é endêmica, nesse caso Porto Rico.

Alguns estudos preliminares^{42,57} sugerem que o RNA do vírus da zika pode ser detectado por mais tempo na urina. Se confirmados, o período definido para os exames moleculares como a RT-PCR poderá ser estendido além da primeira semana. Outros estudos⁴ têm comparado os testes sorológicos com a RT-PCR em amostras de saliva e soro, e indicam que o ensaio molecular tem maior sensibilidade em saliva do que no soro, entretanto, não foi

verificado se o teste na saliva estende o período de detecção do RNA para além de uma semana. Se os estudos futuros confirmarem que as detecções na urina e saliva estendem o período de diagnóstico molecular, esse método terá grande vantagem sobre os sorológicos.

No campo dos biossensores pode-se levantar a aplicabilidade dos imunossensores para os diagnósticos das infecções por zika. Embora de menor complexidade quando comparados com os genossensores, os imunossensores apresentam, no caso de países onde há a coexistência de zika e dengue, o mesmo inconveniente dos métodos diagnósticos sorológicos. Portanto, não permitirá o diagnóstico definitivo mesmo quando construídos com antígeno-anticorpo monoclonal, necessários para identificar com especificidade o vírus em análise.

3.1.6 Tratamento prevenção e controle

Assim como em outros *Flavivirus*, o tratamento das infecções por zika se destinam a atenuar os sintomas, pois não existem ainda vacinas para o vírus. As medidas de prevenção e controle consistem em evitar a picada do mosquito, reduzir transmissão sexual, e controlar a reprodução do vetor. No controle das infecções pelo vírus da zika é de extrema importância reduzir infecções em mulheres grávidas e para esse fim podem ser adotados cuidados especiais, muitas vezes simples, como: incluir uso de repelentes, usar telas nas camas e nas janelas, e adotar proteção sexual quando em contato com parceiros que estiverem em áreas de risco de infecção.⁵⁸⁻⁶⁰

A atual incidência do vírus da zika nas Américas é de difícil avaliação porque os sintomas são inespecíficos e a reatividade cruzada dos anticorpos com outros *Flavivirus* complica o diagnóstico sorológico em áreas onde a dengue é endêmica. Portanto, dado o histórico de alta incidência de dengue na região e a recente experiência com a Chikungunya nas Américas, milhões de infecção pelo vírus da zika devem ser esperadas à medida que o vírus continue a se espalhar.³⁻⁴ Se o Brasil serve de referência para os demais países da América Latina e o Caribe, um substancial número de crianças com microcefalia pode ser esperada nos próximos anos. A duração da ocorrência de vírus da zika nas Américas é ainda incerta, mas o que fica clara é a necessidade do desenvolvimento de vacinas e novos métodos de diagnóstico capazes de identificar os tipos de *Flavivirus*. Existem muitas viroses com características similares à zika como a dengue e febre amarela que podem ser confundidas com a zika no início dos sintomas. Além disso, muitas viroses ainda desconhecidas podem emergir, pois, ainda não se sabe ao certo por que a zika emergiu agora.⁵

Uma das maiores dificuldades para as diretrizes de diagnóstico e tratamento das infecções pelo vírus da zika é que a informação disponível é muito recente. Dos 313 artigos relacionados com a zika no *PubMed* até 2015, somente 25 foram publicados entre 1952 e 2009, data da primeira epidemia ocorrida fora da África.⁵ O crescente interesse e preocupação para com a zika são notáveis, visto que somente no ano de 2016, até o mês de novembro, foram publicados 1007 artigos disponíveis na base *Web of Science*, o que mostra como a enfermidade mobilizou um número considerável de grupos de pesquisa em tão curto período.

3.2 Dengue uma doença viral com quatro sorotipos

A dengue é uma doença viral infecciosa amplamente disseminada nas regiões urbanas do mundo. Está incluída no grupo das 17 enfermidades negligenciadas⁶¹ e é endêmica em 128 países, com incidência de mais de 390 milhões de infecções anuais, dados de 2013.³ Estudos mostram que nos países em que a doença prevalece 3,9 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção por dengue,⁶² o que é muito significativo porque os casos severos de dengue podem levar ao óbito.

Atualmente não existe um método rápido e conclusivo para o diagnóstico laboratorial precoce da dengue.⁶³ A necessidade de métodos mais eficientes de detecção vem sendo colocada pela Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization* - WHO) nas diretrizes de condução da doença.⁶⁴ O tratamento clínico quando ministrado no início dos sintomas pode diminuir a ocupação nas unidades de saúde e hospitais, e ainda evitar a progressão da doença para as formas severas, que podem levar ao óbito. A WHO salienta que o diagnóstico precoce é a chave para reduzir a zero os casos de morte pela doença.

A manifestação dos sintomas da dengue inicia-se entre 3 e 7 dias após a incubação do vírus pelo mosquito. A doença se divide em três fases que se completam em torno de 14 dias: febril, crítica e de recuperação. A **Figura 3.2** ilustra o ciclo de infecção pelo vírus dengue e os momentos de maior eficácia dos métodos de diagnóstico atuais, diagrama que também pode ser aplicado às infecções por zika. Após uma primeira infecção, o indivíduo pode contrair novamente o vírus de outro sorotipo da dengue caracterizando a infecção secundária. Outro fator agravante é que no gênero *Flavivirus* a febre amarela e a zika, dentre outras, também possuem a reação cruzada com a dengue e podem induzir a segunda infecção, na maioria dos casos com manifestações mais severas para o paciente.⁶⁵

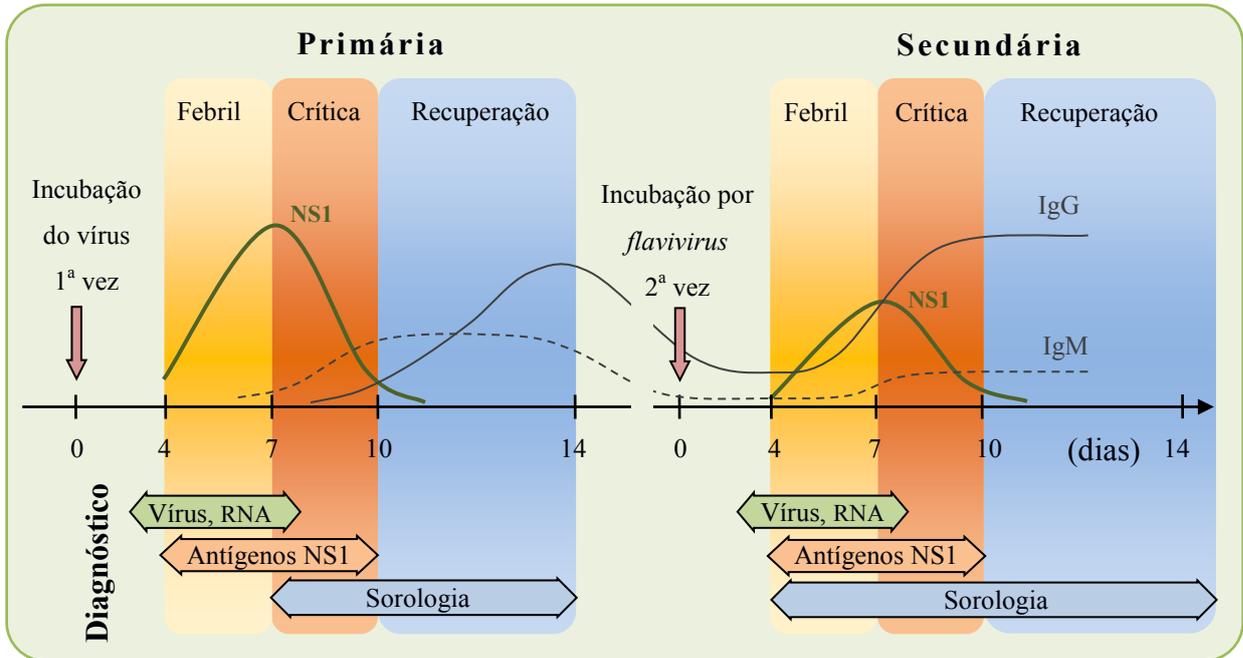


Figura 3.2 - Ciclo de infecção pelo vírus da dengue: nas fases iniciais da doença a detecção de antígenos NS1 e de RNA são os métodos de diagnóstico utilizados. O RNA do vírus está presente na corrente sanguínea logo após a incubação.

Fonte: Adaptada de PEELING e GUZMAN et al.^{63,66}

Os procedimentos de diagnóstico laboratorial para a dengue compreendem atualmente quatro grupos: isolamento viral, testes sorológicos, ensaio molecular (RNA) e detecção de antígenos virais (NS1),⁶³ que são os mesmos para zika. O isolamento viral e a detecção do genoma são os métodos mais específicos de diagnóstico.⁶⁶ Embora o diagnóstico por sorologia (IgM e IgG) seja largamente utilizado, o teste não é conclusivo e necessita de coletas em fases distintas da doença. A técnica mais eficaz de ensaio molecular utiliza a reação da polimerase em cadeia reversa (*Polymerase chain reverse – PCR*) em tempo real. Porém, devido ao alto custo dos equipamentos e à complexidade de operação esta técnica é ainda inviável como alternativa de diagnóstico precoce na maioria dos países onde a dengue é endêmica.

3.3 Projeto de iniciadores e sondas de DNA para diagnóstico de doenças

Atualmente, o estudo dos genomas é beneficiado por uma série de ferramentas computacionais, área de estudo denominada bioinformática. As bases de dados de acesso público disponíveis, em que pesquisadores depositam as sequências dos genomas, oferecem uma vasta variedade de organismos, sendo a mais completa a base de dados do *GenBank*.

Existem muitas variáveis para se levar em conta no projeto e construção de biossensores para detecção de produtos da PCR. Sendo a mais crítica para identificar o vírus o correto projeto do iniciador (no inglês, *primer*), com estreita ligação com as sondas de captura. Em realidade muitos dos parâmetros para desenhar um iniciador são usados para desenhar sondas de captura que hibridizarão com a sequência alvo. A escolha mais adequada determina o sucesso da amplificação da sequência alvo pela PCR e a eficiência da hibridização na plataforma do biossensor. A principal consideração no projeto do iniciador é obter produto da amplificação (no inglês, *amplicon*) com alta especificidade para identificar o vírus. A primeira vista, a escolha de iniciadores e a obtenção das condições ideais para uma reação PCR parecem uma tarefa fácil com o auxílio dos pacotes computacionais. Entretanto, um projeto deste tipo envolve uma série de parâmetros que devem ser cruzados até a obtenção de um conjunto confiável que possa identificar univocamente o organismo em análise. Para uma ideia quantitativa, empresas especializadas chegam a cobrar por um projeto de bioinformática, do tipo necessário para este trabalho, valores médios de US\$ 7.500,00 com prazo para entrega de sete semanas.⁶⁷

Muitas das regras para o projeto de iniciadores são empíricas, o que indica que a obtenção de uma reação PCR bem sucedida só se verificará através de experimentos confirmatórios envolvendo as sequências projetadas. Portanto, aderir a essas regras aumentará significativamente as probabilidades de sucesso.⁶⁸ Quando se trata do projeto de iniciadores para o diagnóstico de doenças é de fundamental importância cruzar a sequência proposta para o iniciador com os genomas de outros vírus. Uma vez que iniciadores de baixa especificidade podem gerar resultados falso-positivos no diagnóstico, o que significa detectar um organismo que em realidade não existe na amostra analisada.

O procedimento inicial para escolha de sequências para identificar um vírus consiste no estudo do genoma com a finalidade de selecionar regiões conservadas em diferentes linhagens do mesmo organismo.⁶⁹ Na etapa seguinte o genoma de interesse é alinhado com genomas de organismos do mesmo gênero, família ou espécie com o objetivo de se eliminar regiões similares. O alinhamento pode ser realizado por pares utilizando *softwares* como o BLAST (do inglês, *Basic local alignment search tool*), pacote de domínio público que utiliza uma abordagem heurística, para obter uma ótima relação entre sensibilidade e seletividade. Outra possibilidade é o alinhamento de múltiplas sequências por *softwares* como Clustal.⁶⁹

A PCR multiplex é uma modalidade que consiste da amplificação simultânea, no mesmo tubo, de sequências alvo de dois ou mais organismos. Em uma PCR multiplex o tempo de preparação, amplificação e análise são menores do que se as amostras fossem

processadas em uma PCR simples. As aplicações da PCR multiplex incluem: identificação de patógenos, estudos forenses, diagnósticos de doenças genéticas e diagnóstico diferencial de doenças infecciosas, e são aplicáveis na análise concomitante de zika e dengue.

O projeto de iniciadores para a PCR multiplex requer um refinamento ainda maior de todos os parâmetros envolvidos na PCR simples. Os iniciadores devem ser posicionados em regiões bem caracterizadas do genoma para evitar amplificação não específica de sequências similares. O iniciador deve ser desenhado de maneira que as cinéticas e temperaturas de hibridização sejam similares para todo conjunto de genomas incluídos. A composição de bases CG (citosina-guanina) sugerida para o iniciador deve ficar entre 45 a 55% e o comprimento entre 23 a 28 nucleotídeos.⁶⁹ Os valores da temperatura de fusão (T_m) para todos os iniciadores devem estar em uma faixa de tolerância de $\pm 5^\circ\text{C}$. O tamanho dos vários produtos deve estar próximo um do outro, dentro de uma faixa de 100 a 600 pares de bases (do inglês, *base pairs* - *bp*). Nesse caso, o tempo de extensão deve ser de 2 a 3 minutos maior do que na PCR simples.⁷⁰ Os principais requisitos encontrados na literatura para o projeto de iniciadores para PCR multiplex podem ser sintetizados em dez passos fundamentais:

1. Escolher a região do genoma viral com menor variabilidade entre as diferentes linhagens disponíveis nos bancos de dados;
2. Selecionar as regiões do RNA relacionadas a uma proteína;
3. Alinhar as regiões selecionadas com outros vírus dentro de um mesmo gênero;
4. Utilizar *softwares* para escolha e análise dos iniciadores como:
http://seq.yeastgenoma.org/cgi-bio/web-iniciador; http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/iniciador3/; www.universalprobelibrary.com
5. Escolher poucos parâmetros para entrada inicial no *software*;
6. Eliminar iniciadores indesejados segundo critérios intrínsecos e extrínsecos;
7. Selecionar iniciadores relevantes;
8. Refinar escolha introduzindo novos parâmetros até se obter o melhor iniciador;
9. Amplificar sequência alvo pela PCR com os iniciadores desenhados;
10. Avaliar eficiência e se necessário repetir os passos 5 a 8 até se obter o iniciador ideal.

A sonda de captura utilizada pelo biossensor possui na maioria dos casos a mesma sequência do iniciador. Então, todos os parâmetros utilizados na metodologia para o projeto de iniciadores pode ser usada para o projeto de sonda de captura nos biossensores de DNA, que utilizam o sistema de hibridização. Existem dois conjuntos de parâmetros para o projeto

de iniciadores e, em consequência, das sondas de captura: os intrínsecos que dizem respeito às características de cada sequência e os extrínsecos que levam em conta as interações entre as sequências.⁶⁹ Esses conjuntos de parâmetros são relacionados nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

3.3.1 Parâmetros intrínsecos do iniciador e sonda de captura

Especificidade: no mínimo, os três primeiros nucleotídeos do terminal 3' da sequência devem ter ligação unívoca com a sequência alvo, e não devem ligar-se com outras partes do mesmo iniciador;

Terminal 3': terminal em que a síntese do produto da PCR e a hibridização da sonda com o alvo se inicia. Evitar a presença de três ou mais bases C ou G, sendo as combinações recomendadas: CG, GC, CC ou GG. A combinação contendo G/C assegura a correta ligação do terminal 3' devido a forte ligação por pontes de hidrogênio entre essas bases;

Auto complementariedade: dentro de toda sequência do iniciador quaisquer três bases contínuas não devem se ligar com outras partes da mesma sequência;

Composição de oligonucleotídeos: a composição de 45 a 55% de bases GC permite uma fusão eficiente e uma ligação específica durante a PCR. O número de nucleotídeos deve ser igual ou próximo entre os dois iniciadores e também entre os pares multiplex;

Comprimento iniciador: o número recomendado de nucleotídeos deve situar de 23 a 28 pares de base.

3.3.2 Parâmetros extrínsecos entre os pares de iniciadores e sondas de captura

Complementariedade: para se evitar a formação de híbridos (dímeros) entre pares de iniciadores deve-se remover a complementariedade entre os terminais 3' dos dois iniciadores. Evitar a ligação de partes do iniciador senso com o iniciador reverso;

Temperatura fusão (T_m): deve ser a mesma para o par com valores entre 60° e 70°C com tolerância de 2 a 5°C; O cálculo simplificado da T_m pode ser efetuado pela equação: T_m (iniciador/captura) = $2AT + 4GC$. A T_m calculada deve ser incorporada no protocolo da PCR, particularidade que deve ser observada quando dois conjuntos de pares de iniciadores com diferentes T_m são usados em uma PCR na amplificação de diferentes fragmentos;

Distância entre o par senso e reverso dentro do produto da amplificação: a distância entre os dois iniciadores deve ficar entre 100 a 600 bp. Essa distância permite uma síntese eficiente de produtos da PCR;

Tamanho do produto: para propósitos em análises clínicas os produtos devem conter de 100 a 300 *pb*. Preferencialmente, o número de bases do produto de cada espécie alvo deverá ser igual entre si na amplificação multiplex;

Temperatura de anelamento: Mais alta em 2 a 5°C do que a temperatura de anelamento na PCR simples.

3.4 Biossensores eletroquímicos para detecção de DNA

Devido o alto potencial para aplicação no diagnóstico de doenças existe um interesse crescente no desenvolvimento de biossensores de DNA desde a década passada.^{71,72} Um biossensor eletroquímico de DNA é definido pela *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) como sendo um biossensor eletroquímico composto por um DNA e um transdutor de sinal eletroquímico.⁷ Essa classe de biossensor atrai a atenção da indústria de dispositivos diagnósticos devido à possibilidade de miniaturização, breve tempo de resposta, precisão nos resultados e baixo custo.⁷³ A **Figura 3.3** ilustra os componentes de um biossensor eletroquímico para análise de DNA.

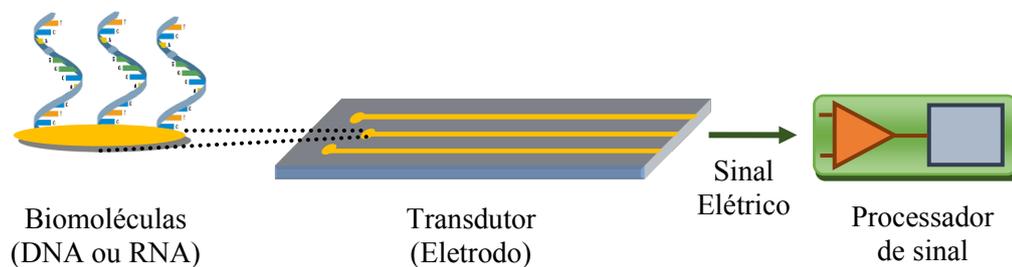


Figura 3.3 - Componentes de um biossensor eletroquímico de DNA: elemento biológico de reconhecimento (DNA ou RNA); transdutor (eletrodo) e processador de sinal elétrico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O princípio de operação de um biossensor de DNA é baseado no evento de hibridização entre uma sequência simples imobilizada na superfície, denominada captura, e uma sequência alvo complementar presente em uma amostra em solução. A hibridização gera uma reação eletroquímica na superfície transdutora que pode ser mensurada como um sinal analítico. Vários tipos de transdutores, como piezoelétricos,⁷⁴ ópticos⁷⁵ ou sistemas eletroquímicos⁷⁶ têm sido usados para a análise da hibridização. Especialmente os transdutores eletroquímicos são os mais versáteis para utilização no ensaio molecular devido à

possibilidade de miniaturização, baixo custo e portabilidade. A **Figura 3.4** ilustra o evento de hibridização na superfície de um biossensor.

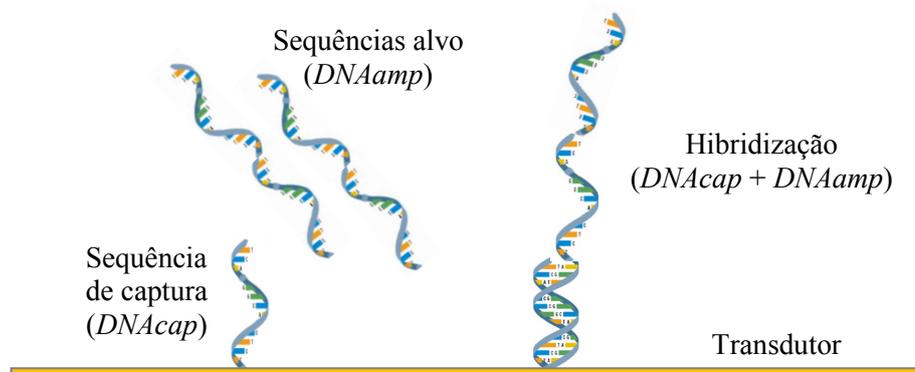


Figura 3.4 - Evento da hibridização: sequência simples de DNA de captura (*DNAcap*) imobilizada na superfície de um transdutor e a hibridização com uma sequência alvo complementar (*DNAcap* + *DNAamp*).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A hibridização de sequências de captura nos biossensores pode ocorrer tanto com sequências-alvo sintéticas quanto com as naturais, na realidade um produto da PCR de uma amostra real é um DNA sintético. Atualmente, numerosos tipos de DNA sintético estão disponíveis comercialmente para utilização em biossensores. As sequências de DNA sintético podem ser desenhadas de acordo com o genoma de interesse para o diagnóstico e para sua imobilização covalente nos transdutores os terminais podem ser funcionalizados com tiol, dissulfetos, aminas ou biotina.⁷⁷

Em eletrodos de Au as sequências de captura são imobilizadas por ligação covalente pela modificação de tiol (-R-SH)⁷⁸⁻⁷⁹ que é uma ligação estável que possibilita a fixação em um único ponto da plataforma preservando a mobilidade conformacional da cadeia do DNA. A imobilização covalente é vantajosa porque as ligações eletrostáticas, de outras partes do esqueleto da sequência de captura, com a superfície são instáveis e podem induzir a perda de especificidade na hibridização.⁸⁰ Além do DNA, pode-se empregar a intercalação de moléculas como o mercaptohexanol (MCH) que bloqueiam os sítios não ocupados pelo DNA ligado e favorecem somente as ligações complementares entre as sequências. A funcionalização da superfície com DNA ou com a conjugação DNA-MCH é denominada auto-organização em monocamadas (do Inglês, *self-assembled monolayers* - SAMs), muito utilizada nos biossensores de DNA.

Muitas abordagens têm sido usadas para detectar as reações de hibridização por métodos ópticos e eletroquímicos. Nos métodos eletroquímicos, uma molécula redox é

utilizada para detectar o evento de hibridização e com frequência uma enzima atua como elemento de amplificação do sinal. Nos métodos ópticos, moléculas fluorescentes marcadoras são ligadas covalentemente a uma terceira sequência, complementar à sequência alvo, com o objetivo de identificar a ocorrência da hibridização. A configuração é chamada de hibridização sanduiche, uma vez que a sequência alvo hibridiza parcialmente com a sequência de captura e com a sequência marcada.

Os biossensores de DNA podem ser divididos em dois grupos principais, os que utilizam marcações e os que não as utilizam (do inglês, *label-free*).⁷³ No grupo dos biossensores marcados uma das abordagens é baseada na resposta eletroquímica de um marcador redox ativo que muda sua concentração com a hibridização do DNA. Os marcadores são chamados de indicadores de hibridização e possuem alta afinidade com ssDNA ou dsDNA, sendo os mais comuns os metais complexos e os corantes que interagem com as ligações de hidrogênio do dsDNA ou possuem seletividade de ligação com as bases como a guanina. Outro processo usual utiliza moléculas marcadoras como o ferroceno ligadas à sequência de captura ou alvo. Após a formação da dupla fita o ferroceno intensifica a transferência de elétrons.

O grupo de genossensores *label-free* tem grande vantagem para detecção do material genético em medicina forense e análises clínicas já que simplificam os passos para detecção. A detecção direta elimina as etapas de marcação, o que reduz o tempo e o custo da análise. Assim, a detecção *label-free* torna-se mais vantajosa e possibilita a aplicabilidade dos genossensores no diagnóstico de doenças. Na detecção *label-free*, a hibridização provoca mudanças nas propriedades elétricas da superfície do eletrodo, tais como a impedância,⁸¹ resistência⁸² e potencial⁸³ que podem ser mensuradas como um sinal analítico.

Uma das técnicas mais utilizadas nos genossensores *label-free* é a espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *electrochemical Impedance spectroscopy* - EIS).⁸⁴⁻⁸⁵ O interesse pela EIS também pode ser atribuído à possibilidade de coletar espectros sobre uma larga faixa de frequências, permitindo a completa caracterização da superfície em um curto intervalo de tempo.⁸⁶ Os maiores esforços para combinar a EIS com a detecção de DNA focam no aumento da sensibilidade por meio de métodos de imobilização,⁸⁷ tipo de sequência da captura,⁸⁸ cobertura da superfície⁸⁹ assim como a utilização de diferentes materiais na funcionalização da superfície do transdutor.⁹⁰

Nas medidas de EIS a hibridização da fita complementar com a fita de captura imobilizada no eletrodo é detectada pela variação da resistência de transferência de carga (R_{ct}), retirada do espectro de impedância (gráfico de Nyquist), como ilustrado na **Figura 3.5**.

Ainda é possível caracterizar o biossensor utilizando a configuração com dois eletrodos com a medida de impedância elétrica para detecção da hibridização.⁹¹

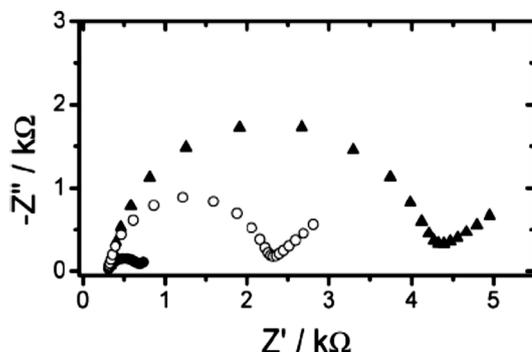


Figura 3.5 - Espectro de impedância (gráfico de Nyquist) em um biossensor de DNA que utiliza eletrodo de ouro: (●) eletrodo limpo; (▲) imobilizado com *DNACap/MCH* e (○) hibridizado (*DNACap+DNAmp*).

Fonte: GEBALA; SCHUHMANN.⁸⁵

No que se refere à plataforma para construção dos biossensores *label-free* a utilização de eletrodos descartáveis é de grande interesse, pois para fins de diagnóstico a regeneração de eletrodos na maioria dos casos não é indicada ou mesmo inviável operacionalmente. Um dos processos mais usados atualmente para fabricação de eletrodos descartáveis é a impressão de pastas metálicas condutivas sobre o substrato (do Inglês, *screen-printed electrodes-SPEs*), onde máscaras delimitam as regiões de impressão. Os SPEs podem ser fabricados em diversos tipos de substrato de suporte, com grande variação de materiais e configurações do eletrodo. Esse método de fabricação tem atraído a atenção de pesquisadores e setores da indústria nos últimos anos devido à simplicidade e baixo custo.⁹²⁻⁹³ Entretanto, um inconveniente deste método é a alta rugosidade da superfícies que interfere na construção de SAMs.

Outro método eficaz para fabricação de eletrodos descartáveis consiste na evaporação térmica de filmes finos em câmara de vácuo.⁹⁴ Nesse tipo de fabricação, também denominado metalização, partículas em estado de vapor se solidificam no substrato alvo. A evaporação fornece uma superfície metálica homogênea, de baixa rugosidade e isenta de elementos contaminantes. As temperaturas de fusão do metal e o alto vácuo dentro da câmara possibilitam um ganho de qualidade quando comparado com o processo de *screen-printed*. Além disso, o processo de evaporação é extremamente reprodutível e envolve um número reduzido etapas, materiais e solventes, o que é vantajoso ao se transferir a tecnologia para o setor produtivo. A **Tabela 3.1** compara as principais características das técnicas de SPEs e evaporação térmica para fabricação de eletrodos descartáveis.

Tabela 3.1 - Comparação dos métodos de fabricação de eletrodos de ouro descartáveis fabricados pelo processo *screen-printed* e por evaporação térmica.

Característica	<i>Screen-Printed</i> ⁹⁵⁻⁹⁶	Evaporação Térmica**
Rugosidade por área	1,06 a 2,99 μm	0,69 a 1,69 nm
Espessura do filme	> 10 μm	30 a 200 nm
Controle do filme	Baixo	Alto
Menor dimensão geométrica ^a	0,1 mm	0,8 mm
ΔEp^* em velocidade de varredura de 100 mVs^{-1}	62 a 76 mV	77 a 97 mV
I_{pa}/I_{pc}^*	0,99 \pm 0,03 a 1,15 \pm 0,08	1,04 \pm 0,20 a 1,23 \pm 0,30

Fonte: Elaborada pelo autor.

^a - Utilização de tela com 325 *mesh* nos SPEs e molde físico para a configuração das trilhas condutivas no eletrodo evaporado;

* - Eletrólito de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em KCl 1,0 mmol L^{-1} ;

** - Dados com base nos resultados deste trabalho.

Dentre os diversos materiais para evaporação os metais nobres, em especial Au, Ag e Pt, se destacam pela alta taxa de transferência de carga e a baixa reatividade quando comparados com o carbono e pastas metálicas como as utilizadas nos SPEs. O grande benefício da utilização de metais nobres como o ouro em eletrodos de trabalhos é a forte ligação covalente de grupos tiol (-SH) que favorece a construção de SAMs.⁹⁷

Para produção em larga escala de biossensores descartáveis são usuais os filmes finos metálicos depositados em materiais poliméricos, de menor custo quando comparados aos substratos sólidos de vidro e silício.^{72,98} A metalização sobre substrato polimérico é simplificada quando se utilizam moldes físicos vazados, que necessitam como preparação somente a limpeza da superfície do polímero com metanol, e a sua fixação nos moldes para a evaporação do ouro. Outra vantagem do substrato polimérico é que a deposição do filme pode ser feita diretamente na superfície limpa não necessitando de camada de adesão adicional como as camadas de cromo comumente usadas em substratos de vidro.

Quando o produto da PCR é analisado em um biossensor, novamente as abordagens com e sem marcação são utilizadas. Nos métodos marcados alguns trabalhos utilizam enzimas para detectar a hibridização.⁹⁹⁻¹⁰⁰ Por outro lado, nos genossensores *label-free* tanto a oxidação da guanina e adenina e a EIS são utilizadas para detecção do produto.¹⁰¹⁻¹⁰²

O desenvolvimento de genossensores requer a otimização de diversos fatores, como concentração de sondas de captura, tempo de imobilização, temperatura da reação, dentre outras. Na literatura encontra-se uma grande variação de soluções tampão, tempos para

formação de SAMs e de hibridização. O ensaio combinado de todos os parâmetros para caracterização inicial aumenta de maneira dramática o número de experimentos necessários. Então, para minimizar o número de experimentos a aplicação de ferramentas estatísticas como o planejamento fatorial fracionário pode auxiliar nessa otimização.¹⁰³⁻¹⁰⁴

A ideia da análise de produtos da PCR por biossensores eletroquímicos foi relatada em alguns estudos, que mostraram ser possível substituir a detecção tradicional em eletroforese em gel, *Southern blotting* ou espectrofotometria por um biossensor. Nesse sentido, Lai *et al.* utilizaram um método eletroquímico para detecção de sequências específicas de produtos não purificados da PCR para identificar a *Salmonella Typhimurium*.¹⁰⁵ Nessa abordagem, uma PCR assimétrica foi utilizada para amplificação de sequências alvo da *Salmonella*. A PCR assimétrica consiste na multiplicação de uma das sequências do DNA da dupla hélice, o que resulta em um produto da PCR composto quase que exclusivamente da sequência alvo a ser identificada pelo biossensor em contraste com a PCR tradicional em que ambas sequências são amplificadas. No estudo de Lai o eletrodo de trabalho foi fabricado através da metalização de ouro sobre vidro, e um produto da PCR de 100 bases foi detectado através da técnica de voltametria que associa o decrescimento no potencial com a redução do azul de metileno após a hibridização.

A utilização de múltiplos eletrodos descartáveis impressos em ouro em um único substrato, é uma alternativa para detecção simultânea de vários agentes causadores de doenças. Farabullini *et al.*¹⁰⁶ apresentaram um biossensor eletroquímico para identificação de dois tipos de bactérias contaminantes de alimentos, a *Salmonella spp.* e a *Listeria monocytogenes*. Uma sonda de captura previamente ancorada na superfície de ouro hibridiza com o produto da PCR no formato de hibridização sanduíche e uma sonda adicional marcada com fluoróforos ou enzima se liga à outra extremidade do produto. A voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry* - DPV) foi a técnica eletroquímica utilizada para identificar o sinal de oxidação do α -naphthyl colocado na presença de um conjugado de *streptavidin-alkaline phosphatase*. Um potenciostato multicanal foi utilizado para a medida simultânea da concentração das bactérias. Alguns pontos relevantes apresentados foram: o estudo da melhor posição de ligação da sequência de captura com o produto da PCR e a configuração do biossensor em tira descartável para análise de múltiplos analitos. Contudo, a utilização da hibridização sanduíche e o conjugado enzimático acrescentam dois passos a mais no processo. Um avanço posterior para detecção de múltiplos analitos foi apresentado pelo mesmo grupo⁹⁹ onde foi utilizada a mesma metodologia de medida de pulso diferencial e conjugado *streptavidin-alkaline phosphatase*, mas o projeto da

tira de teste do biossensor mostrou uma evolução, sendo constituído de oito eletrodos de trabalho, que funcionam em pares e melhoram a confiabilidade de detecção.

A utilização de eletrodos de ouro para ancoragem de sondas de DNA de captura é adotada com frequência nos biossensores de DNA. Mesmo lançando mão de metodologias mais avançadas, como espectroscopia Raman, para detecção de produtos da PCR a superfície de ouro ganha destaque porque não sofre oxidação significativa capaz de interferir na detecção por técnicas eletroanalíticas. Essa característica favorece as medidas de transferência de carga relacionadas à hibridização de sequências de DNA. Em um estudo de Papadopoulou¹⁰⁰ a identificação de polimorfismo da *Yersinia Pestis* com produtos de 262 bases foi realizada na forma não purificada. Uma metodologia criteriosa para extração e amplificação em uma PCR duplex assimétrica foi desenvolvida, entretanto, para detecção necessitou-se de marcação dos produtos com fluoróforo e de um equipamento Raman, o que aumentou a complexidade.

Um biossensor eletroquímico para detecção de patógenos pela análise de produtos da PCR foi apresentado recentemente por Yan e colaboradores.¹⁰⁷ As sondas de captura foram imobilizadas em uma superfície de ouro e utilizando um conjugado de *streptavidin-alkaline phosphatase* no modelo de hibridização sanduíche a detecção utilizou as técnicas de EIS e voltametria de onda quadrada (do inglês, *square wave voltammetry* - SWV). O estudo fez uma comparação entre a detecção de sequências de DNA de *Salmonella* tanto na forma sintética quanto das naturais provenientes de amostras reais. Embora exista uma alta complexidade no procedimento adotado, o estudo demonstrou que é possível aplicar o conceito da detecção direta, isto é, sem a necessidade de marcação com fluoróforos, para analisar produtos da PCR.

No que se refere ao diagnóstico de doenças infecciosas como a dengue e zika um dispositivo ideal de diagnóstico deverá reunir um conjunto de qualidades como: leitura direta do produto da PCR; medida simultânea de dois ou mais analitos; eletrodos descartáveis; equipamento portátil de leitura de sinal e resposta da análise em aproximadamente 1 hora.

3.5 Patentes relacionadas aos biossensores de DNA

No que se refere ao campo das patentes ainda não existe, até o momento da redação deste trabalho, uma metodologia proposta de ensaio molecular para zika que envolva produtos da PCR e biossensores. Algumas ideias podem servir de base para se chegar à proposição de um genossensor para essas duas doenças. A pesquisa das patentes de biossensores

eletroquímicos de DNA que utilizam a hibridização e processos relacionados foi realizada em âmbito nacional no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) e internacional no *European Patent Office* (EPO) e *United States Patent Trademark Office* (USPTO), com datas referentes à última publicação. Na relação das patentes consultadas não foi feita a distinção entre as que estão em situação de pedido e as que já foram concedidas.

A palavra-chave *biossensor* foi usada para busca no INPI, onde foram encontradas duas patentes relacionadas com este trabalho. A primeira patente, PI 9815122-3, 2000,¹⁰⁸ descreve a confecção de tiras de teste de biossensores eletroquímicos, em especial para uso nos medidores de glicose, originada de empresa multinacional. A segunda, um pedido de inovação, PI 1102719-3, 2014,¹⁰⁹ descreve um biossensor eletroquímico que consiste no processo para detecção de ácidos nucleicos e a confecção de uma de fita teste para reconhecimento de DNA e RNA, cujo objetivo é o de diagnosticar doenças. A patente descreve sucintamente as fases de imobilização da sonda de ácido nucleico, a hibridização e detecção. A tira de teste possui como substrato o cloreto polivinila (PVC) ou acetato de polivinila (PVA) e os eletrodos são constituídos de pasta condutora impressas no substrato. O sinal eletroquímico resultante do evento da hibridização é detectado pela técnica de voltametria, com um potencial variável de 0,4 a 1,4 V. O valor da corrente indica a ocorrência da hibridização. Entretanto, observa-se nos gráficos que a técnica de voltametria não foi suficientemente sensível para detectar diferenças entre a hibridização entre a sequências de captura e alvo. Na literatura tem sido mais usual as técnicas de espectroscopia de impedância e voltametria de pulso diferencial para os biossensores de DNA do tipo *label-free*.

A análise de produtos da PCR da sequência alvo por um biossensor é um dos caminhos mais diretos para se utilizar o biossensor no diagnóstico de doenças. Nesse sentido, o pedido de patente BR 102013031310-6, 2015,¹¹⁰ apresentou a ideia seminal para a análise de produtos da PCR em biossensor. A patente descreve um genossensor eletroquímico para diagnóstico da meningite meningocócica. O biossensor utiliza um eletrodo de trabalho de grafite e filme polimérico condutor para imobilização de uma sonda de captura capaz de hibridizar com sequências complementares da bactéria *Neisseria meningitidis*. Entretanto, o método proposto consegue medir a hibridização dos produtos da PCR somente de forma indireta, com auxílio de agentes intercaladores como o brometo de etídio, o que indica ainda uma dependência com o método bioquímico tradicional de análise.

A consulta ao EPO e USPTO utilizou as palavras-chave *biossensor* AND *electrochemical* AND *nucleic acid* OR *DNA*, nesse caso foram selecionadas aquelas patentes com relação mais próxima com a proposta desenvolvida neste trabalho. Nesse sentido, a patente

WO2010117341, 2010,¹¹¹ descreve um método de detecção eletroquímica de sequências alvo por hibridização em que a sequência de captura é imobilizada em uma superfície metálica plana capaz de transferir elétrons após a hibridização. São utilizadas nanopartículas metálicas em solução como promotores de condução elétrica. A patente US20060205013, 2006,¹¹² descreve um biossensor que utiliza um transistor de efeito de campo (FET) e um ligante molecular. Um ácido nucleico que pode se ligar horizontalmente ao ligante é imobilizado na superfície da porta do transistor. O método permite um aumento do sinal de hibridização devido à imobilização horizontal das sequências. Porém, ligações não complementares podem induzir à resultados falso positivos.

A patente US20120283107, 2012,¹¹³ descreve o método e um dispositivo de detecção direta da reação de hibridização em eletrodos planos de Au. A perturbação das cargas elétricas próximas à superfície é detectada como transiente de corrente em um amplificador operacional ligado ao eletrodo. A patente US20100201381, 2010,¹¹⁴ descreve um dispositivo composto de trilhas condutivas seccionadas, em que nos espaços vazios, de dimensões 1 µm, são imobilizadas sequências de DNA funcionalizadas com nanopartículas metálicas e conformadas em *hairpin* (semicírculos). Na configuração inicial as nanopartículas estabelecem uma ponte condutiva e caso a amostra contenha sequências complementares as sequências de capturas são estiradas após a hibridização e a formação em *hairpin* é aberta, o que induz à descontinuidade da trilha que é interpretada como sinal positivo de hibridização.

No que se refere à aplicação da técnica RT-PCR para diferenciação do vírus da dengue em infecções, a patente WO 2010030243, 2010,¹¹⁵ apresentou um método de RT-PCR duplex para amplificação de sequências alvo dos vírus da dengue concomitante com sequências do vírus chikungunya. A invenção discorre sobre o método para detectar chikungunya e dengue, através da análise de ácidos nucleicos presentes na amostra. O processo consiste de três passos: (a) projeto de iniciadores e sequências sinalizadoras para detecção; (b) amplificação utilizando iniciadores específicos para identificar sequências alvo de dengue e chikungunya em PCR duplex; (c) detecção das sequências alvo por reação de hibridização. A etapa de detecção envolve a associação das sequências alvo com microesferas que são identificadas por fluoróforos e diferenciam os dois tipos de vírus. A proposta de diferenciação é muito positiva, contudo, o método apresentado nessa patente aponta uma série de desvantagens como: o processo envolve etapas adicionais de marcação e identificação que aumentam o tempo e custo da análise. É possível reconhecer, pelas anterioridades, que a integração dos biossensores com análise dos produtos da PCR é viável, e com espaço para proposição de novos produtos para aplicação no diagnóstico em ensaios moleculares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O substrato de politereftalato de etileno (PET) em folhas de 30×30 cm com espessura de 1,0 mm foi adquirido da *Goodfellow* (UK) e o ouro para evaporação, pureza de 99,9% foi adquirido da Marsan (SP). As sequências de DNA sintético foram adquiridas liofilizadas da *Sigma-Aldrich*, sendo as sequências de captura e alvo purificadas pelo fabricante por HPLC. A coluna de exclusão molecular *Sephadex*TM NAPTM-5 para purificação adicional do DNA de captura foi adquirida da GE *Helthcare* (UK). Todos os reagentes foram utilizados como recebidos e as soluções preparadas com água ultrapura deionizada (resistividade = 18,2 M Ω cm) esterilizada em autoclave. Foram adquiridos da *Synth* os reagentes metanol e acetona. Foi adquirido da *Hexapur Bio Lab* o tris(hidroximetil)aminometano – (HOCH₂)₃CNH₂, $\geq 99,8\%$; Foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* os seguintes reagentes: ditioneitol – DTT pureza $\geq 99,0\%$; ferricianeto de potássio – K₃Fe(CN)₆, $\geq 99,0\%$; ferrocianeto de potássio – K₄Fe(CN)₆, $\geq 99,0\%$; hidróxido de potássio – KOH, $\geq 85,0\%$; ácido sulfúrico – H₂SO₄, 95,0 a 98,0%; cloreto de potássio – KCl, $\geq 99,0\%$; cloreto de hidrogênio – HCl, $\geq 99,0\%$; hidróxido de sódio – NaOH, $\geq 99,0\%$; fosfato de sódio dibásico – Na₂HPO₄; fosfato de sódio monobásico di-hidratado – NaH₂PO₄•2H₂O; ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈), $\geq 99,0\%$. As soluções tampão estoque foram preparadas nas concentrações: tampão TE 10 mmol L⁻¹ [10 mmol L⁻¹ de (HOCH₂)₃CNH₂ e 0,1 mmol L⁻¹ C₁₀H₁₆N₂O₈]; tampão fosfato – PB 0,20 mol L⁻¹ (0,20 mol L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 50 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄•2H₂O, pH 7,4); tampão fosfato salino – PBS 0,20 mol L⁻¹ (0,20 mol L⁻¹ de Na₂HPO₄; 50 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄•2H₂O e 3,0 mol L⁻¹ NaCl).

4.1 Fabricação de eletrodos descartáveis de Au-PET

Os eletrodos foram fabricados em um substrato de politereftalato de etileno (PET), na forma de tira de teste descartável em duas configurações, como representado na **Figura 4.1**.

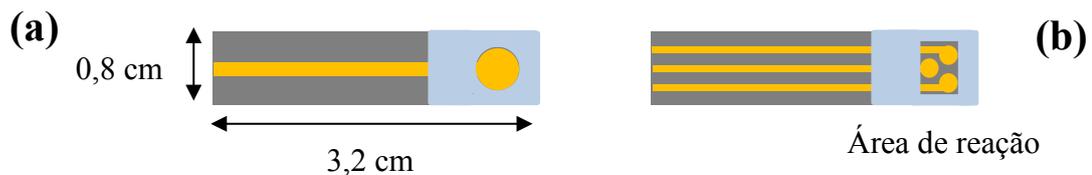


Figura 4.1 - Desenho esquemático sem escala dos eletrodos descartáveis fabricados em substrato de politereftalato de etileno (PET) metalizados com ouro: (a) eletrodo de trilha única (Au-PET); (b) eletrodo de três contatos (Au3-PET).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As trilhas condutivas metalizadas em ouro possuem uma extremidade linear para conexão ao equipamento de medida enquanto a extremidade com circunferências, área de reação, é destinada a imobilização de sondas de captura, onde um adesivo vazado é colocado sobre as trilhas para delimitar a região de contato da solução.

Na preparação, os substratos de PET foram cortados com guilhotina nas dimensões de $0,8 \times 3,2$ cm, limpos com metanol em banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida foram secos em fluxo de N_2 e fixados em moldes vazados de alumínio para evaporação. Os filmes de ouro foram depositados por evaporação térmica diretamente sobre o substrato polimérico em uma câmara Balzers BAK 750. Antes da evaporação a câmara contendo os substratos permaneceu em vácuo de 10^{-5} Pa por 12 horas e foi submetida à descarga iônica por 400s antes da evaporação. A taxa de deposição de ouro foi de 3 nm/s, totalizando uma espessura final do filme de 150 nm medida por cristal de quartzo da evaporadora. Após a retirada da câmara os eletrodos foram armazenados individualmente em tubos *eppendorf*.

4.2 Caracterização morfológica dos eletrodos

A análise de rugosidade do substrato de PET foi realizada comparativamente com substratos de vidro, silício e mica. Os valores da rugosidade por área (R_a) e rugosidade quadrática média (R_{rms}) foram obtidos por microscopia de força atômica em imagens de topografia nas dimensões de 5×5 μm . Para as medidas de rugosidade o substrato de PET foi limpo com metanol em banho de ultrassom por 5 minutos. O substrato de vidro foi limpo com solução de acetona/metanol (1:1 v/v). O silício recebido do fabricante, sem uso prévio, foi limpo com solução de acetona/metanol (1:1 v/v). A mica foi preparada retirando-se o plano superior por clivagem com fita adesiva. Para essa caracterização a evaporação do filme de ouro no PET, no vidro e na mica foi realizada concomitantemente na mesma câmara Balzers.

4.3 Caracterização eletroquímica dos eletrodos

4.3.1 Voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica

As caracterizações eletroquímicas dos eletrodos evaporados de Au-PET foram realizadas comparativamente com eletrodos de ouro comercial da *HD Instruments* (US), diâmetro de 2 mm, área geométrica de $3,14 \text{ mm}^2$. Os desvios médios das medidas foram

calculados com base nos resultados de três eletrodos distintos de cada tipo. As técnicas de voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry* - CV) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram executadas em uma célula de três eletrodos com volume de 15 mL, em um potenciostato/galvanostato *Autolab*. Como contraeletrodo foi utilizado uma espiral de fio de platina de 20 mm², eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) e como eletrodo de trabalho a lâmina de Au-PET ou ouro barra comercial, em eletrólito de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 1,0 mmol L⁻¹. Antes das caracterização ambos os eletrodos foram polidos eletroquimicamente por CV em H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹, primeiramente com potencial entre 0 e 1,8 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de varredura de 500 mVs⁻¹ (30 ciclos), e em seguida, entre 0 e 1,6 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹ (10 ciclos).

4.3.2 Sensibilidade do eletrodo Au-PET com o pH

Uma vez que os eletrodos são utilizados para medidas de transferência de carga, a sensibilidade ao pH é uma caracterização relevante e foi avaliada pelo método de cronopotenciometria no potenciostato/galvanostato *Autolab* PGSTAT 302. As medidas foram realizadas com os terminais do contraeletrodo e referência ligados concomitantemente a um eletrodo Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Como eletrodo de trabalho foi utilizado o eletrodo Au-PET, previamente polido eletroquimicamente. Um medidor de pH de bancada Hanna foi colocado em paralelo com os demais eletrodos em uma célula eletroquímica de volume inicial com 20 mL. O pH da solução inicial de PBS 1,0 mmol L⁻¹ foi calibrado para 5,0 com adição de HCl 0,1 mol L⁻¹. O aumento do pH foi induzido pela adição de alíquotas de 10 µL de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Após a estabilização do potencial ao novo pH uma nova alíquota foi introduzida. As medidas foram realizadas em três eletrodos distintos na faixa estudada entre 4,5 a 9,5 do pH. Para os demais experimentos foi adotado o pH de 7,4 correspondente ao pH biológico.

4.4 Caracterização das sequências de captura e sequências alvo de DNA sintético

4.4.1 Caracterização das sequências por espectroscopia de absorção no ultravioleta

As sequências de DNA recebidas liofilizadas foram suspensas em tampão TE para preparo das alíquotas. Tanto as sequências de captura (*Zcap* e *Dcap*) quanto as sequências

alvo (*Zamp* e *Damp*) foram distribuídas em alíquotas de 10 μL a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e novamente secas em centrífuga de vácuo na temperatura ambiente. Esse procedimento de secagem proporciona maior tempo de armazenamento dos oligonucleotídeos sintéticos e foi adotado para as alíquotas utilizadas neste trabalho. Segundo as especificações do fabricante (*Sigma-Aldrich*) oligonucleotídeos secos armazenados a -20°C são preservados de degradação por 24 meses, ao passo que ao serem armazenados a -20°C ou mesmo a -80°C em tampão TE e água a durabilidade cai para 7 meses. As alíquotas das sequências alvo (*Zamp* e *Damp*) para utilização nos biossensores foram então suspensas em tampão (PB 0,05 mol L^{-1} + NaCl 0,2 mol L^{-1}) e utilizadas até um prazo máximo de 30 dias. Antes das etapas de imobilização e hibridização as soluções de DNA sintético foram analisadas por espectroscopia UV (340 a 220 nm), em uma cubeta de quartzo. A calibração das concentrações e verificações de possíveis contaminações por proteínas ou outros compostos foi avaliada pelos espectros UV. A presença de proteínas foi verificada pela relação entre absorbâncias em 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}) e a presença de sais e outros compostos pela relação A_{260}/A_{230} , seguindo a metodologia sugerida por Wilfinger *et al.*¹¹⁶

Os oligonucleotídeos modificados com tiol (*Zcap* e *Zcap*) foram fornecidos pelo fabricante com proteção para a ligação dissulfeto ($\text{R}^1\text{-S-S-R}^2$) para minimizar a oxidação que resulta na formação de dímeros entre os oligonucleotídeos. O rompimento da ligação S-S e liberação do tiol (-SH) favorece a ligação da sequência de captura com a superfície do ouro. Para esse tratamento foi aplicado o procedimento de redução com ditioneitol (DTT), ilustrado na **Figura 4.2**.

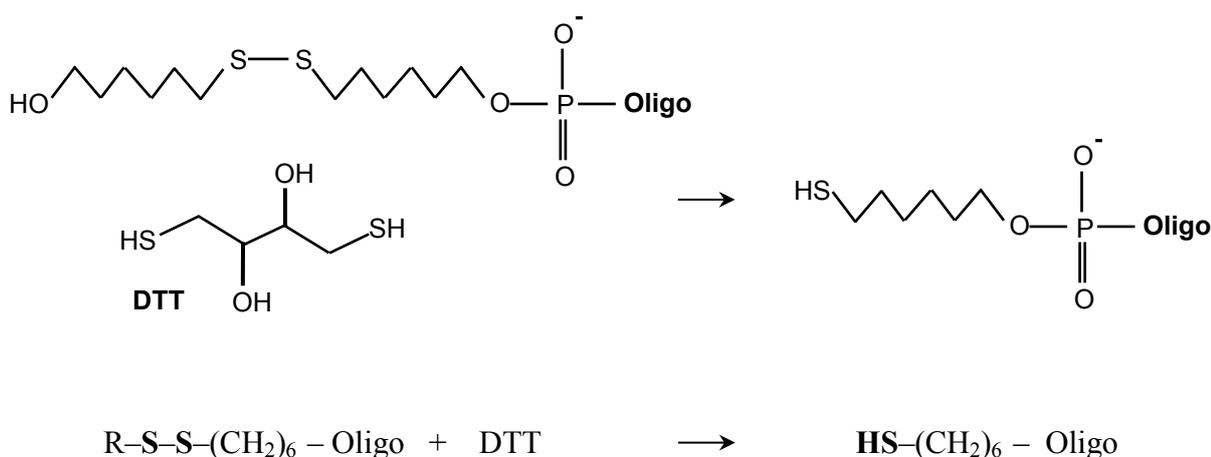


Figura 4.2 – Redução da ligação S-S por ditioneitol (DTT) nos oligonucleotídeos sintéticos funcionalizados com grupo tiol. Produto final resultante após a filtração em coluna de exclusão molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O procedimento executado consistiu de duas etapas: **Parte 1: ativação do oligo-dissulfeto**: Uma alíquota de oligonucleotídeo de captura previamente seca foi diluída em 500 μL de solução contendo DTT 0,04 mol L^{-1} em tampão PB 0,17 mol L^{-1} (pH 8,0). Os oligonucleotídeos permaneceram na solução por 16h a temperatura de 25°C abrigados da luz. **Parte 2, purificação**: Após o período de incubação os oligonucleotídeos foram purificados por filtração em gel em coluna de exclusão molecular por gravidade *Sephadex*TM NAPTM-5, *GE Healthcare*. A coluna NAPTM-5 foi inicialmente equilibrada a temperatura de 25°C com 10 mL de tampão PBS 0,17 mol L^{-1} (pH 7,4). O volume de 500 μL de oligo-DTT foi adicionado na coluna e após a completa penetração no gel os oligonucleotídeos foram eluídos com 500 μL do mesmo tampão PBS 0,17 mol L^{-1} . Após a purificação o volume final das soluções de *Zcap* e *Dcap* foi de 500 μL com concentrações entre 0,8 a 1,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, variações obtidas em purificações de pelo menos cinco amostras secas.

4.4.2 Caracterização das sequências de DNA por microscopia de força atômica

Para visualizar as sequências de DNA foi utilizada a microscopia de força atômica. Na preparação, 30 μL da solução de *DNACap* foram depositados em um substrato de mica, após a secagem em dessecador a temperatura de 25°C as medidas foram realizadas. Foi utilizado um microscópio *Park*, pertencente ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), Campinas-SP, projeto de pesquisa AFM 16810, operando no modo contato intermitente com cantiléver de silício, frequência de ressonância de 300 kHz e constante de força 40 N/m.

4.5 Técnicas de caracterização

4.5.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta (UV)

A espectroscopia no ultravioleta, no comprimento de onda de 340 a 220 nm, foi utilizada para quantificar a concentração de todas as soluções contendo as sequências de captura e alvo de DNA. As medidas foram realizadas em um equipamento *Hitachi* U-2900, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm, previamente limpa com hipoclorito de sódio a 2% e acetona antes de cada medida.

4.5.2 Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (do inglês, *atomic force microscopy* - AFM) foi utilizada na caracterização da superfície do substrato e do eletrodo. As imagens foram obtidas em um microscópio FlexaAFM da *Nanosurf*, operando no modo contato intermitente com cantiléver de silício, frequência de ressonância de 300 kHz, constante de força 40 N/m.

4.5.3 Voltametria cíclica (CV)

A Voltametria cíclica (do inglês, *cyclic voltammetry* - CV) foi utilizada na caracterização eletroquímica dos eletrodos. Os voltamogramas foram obtidos em um potenciostato/galvanostato *Autolab* PGSTAT 302, gerenciado pelo software GPES (do inglês, *General Purpose Electrochemical System*) versão 4.9. Antes de cada caracterização e etapa de imobilização de DNA os eletrodos Au-PET foram eletroquimicamente polidos por voltametria cíclica em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , primeiramente com potencial entre 0 e 1,8 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de 500 mVs^{-1} (30 ciclos), e em seguida, entre 0 e 1,6 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de 100 mVs^{-1} (10 ciclos). No passo seguinte, o fator de rugosidade dos eletrodos foi determinado a partir da razão da área eletroativa (A_{ea}) e área geométrica do eletrodo (A_{ge}). A A_{ea} é a área de superfície microscópica obtida pelo método de adsorção do oxigênio. A A_{ge} foi calculada a partir do diâmetro da superfície do eletrodo: para o eletrodo de contato único 0,20 cm^2 , e para o eletrodo de três contatos 0,038 cm^2 .

4.5.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

A Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês, *electrochemical impedance spectroscopy* - EIS) foi utilizada para as medidas de transferência de cargas no eletrodo. O diagrama de Nyquist foi obtido através de medidas em um potenciostato/galvanostato *Autolab* PGSTAT 302, gerenciado pelo software FRA (do inglês, *Frequency Response Analyser*) versão 4.9. A faixa de frequência medida foi de 30 a 0,1 kHz, com amplitude AC de 5 mV.

4.5.5 Voltametria de pulso diferencial (DPV)

As medidas de voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry* - DPV) foram realizadas em solução tampão PB 0,1 mol L^{-1} , contendo partes

iguais do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Os parâmetros utilizados foram: tempo de modulação de $0,055 \text{ s}$, intervalo de tempo de $0,0175 \text{ s}$, passo de potencial de 5 mV , amplitude de modulação de 70 mV e potencial de $-0,4$ a $+0,4 \text{ V}$.

4.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para caracterizar a morfologia e composição do substrato metalizado com ouro. As imagens foram obtidas em um microscópio *Inspect F50* (FEI, Holanda), operando com tensão de aceleração entre 5 a 15 kV e leitura de elétrons secundários (SE). Antes das medidas, tanto a área metalizada com Au como a área do substrato de PET foram recobertos com uma camada de Pt de 5 nm . Os espectros de raios X por energia dispersiva (do inglês, *energy dispersive X-ray* - EDX) foram obtidos no mesmo equipamento, pertencente ao Instituto de Física de São Carlos.

4.6 Etapas de construção do biossensor

A construção do biossensor consistiu de três etapas: a fabricação e caracterização dos eletrodos, o projeto de sequências de DNA e a imobilização das sequências nos eletrodos, como mostra a **Figura 4.3**. Na etapa de fabricação dos eletrodos a qualidade do substrato exerce fator crucial para obtenção de um eletrodo com baixa rugosidade e estabilidade mecânica. A fabricação do eletrodo consistiu das seguintes fases: limpeza, secagem, colocação do substrato em moldes de alumínio e evaporação térmica do ouro diretamente na superfície. O substrato fornecido com película protetora, de fácil corte, foi limpo com metanol em banho de ultrassom. A principal vantagem do substrato polimérico é a alta aderência da camada do ouro, não sendo necessária camada de preparação de cromo, usualmente utilizada em substratos de vidro. A camada de cromo em substrato polimérico não é indicada devido à formação de microfendas na superfície durante a limpeza eletroquímica. Após a fabricação os eletrodos foram caracterizados quanto à morfologia e quanto à resposta eletroquímica.

O projeto das sequências de DNA que identificam o vírus foi uma etapa fundamental para a construção do biossensor. Foram adotadas com rigor todas as regras para obtenção de iniciadores capazes de diferenciar os vírus da zika e da dengue na detecção. Essa etapa envolveu o estudo dos genomas dos vírus, definição de regiões codificantes de proteínas e alinhamento dos genomas da zika e da dengue com software CLUSTAL X.

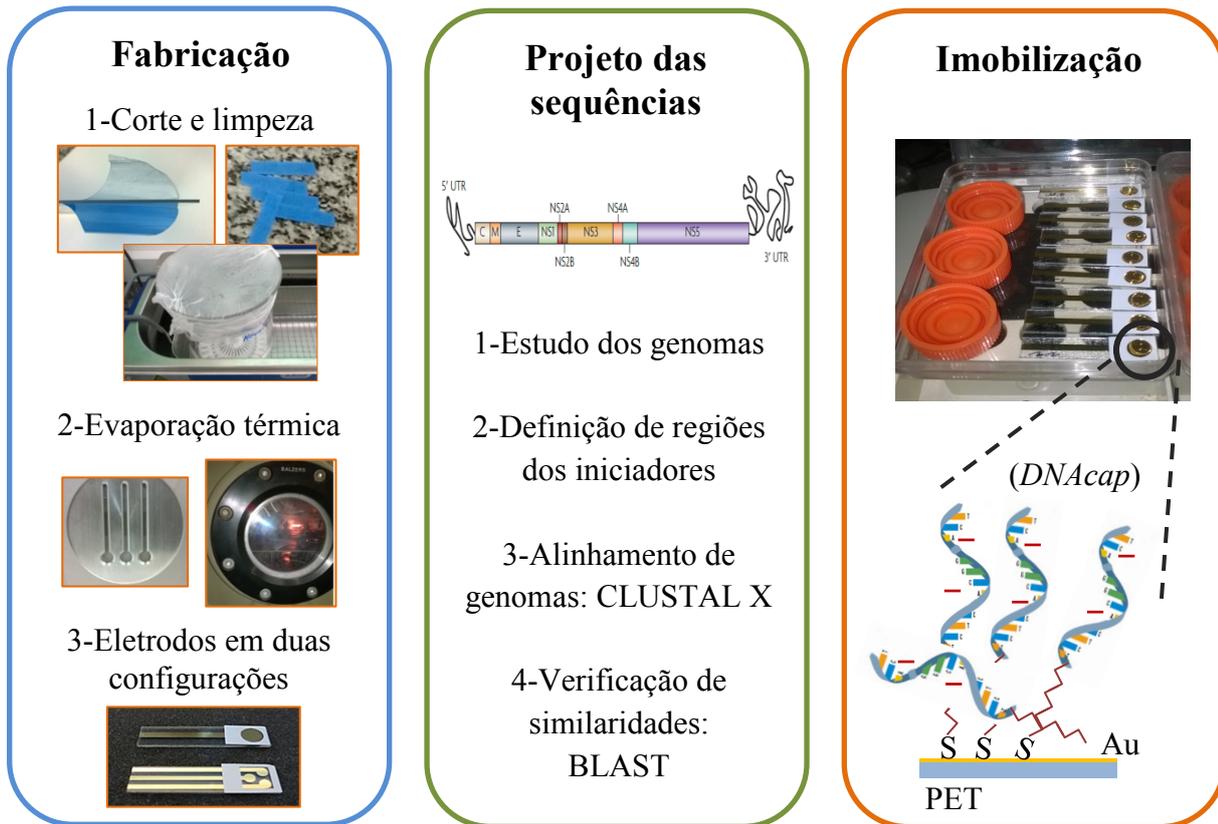


Figura 4.3 - Representação das etapas de construção do biossensor: fabricação do eletrodo, projeto das sequências de DNA e imobilização das sequências de captura (*DNACap*).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Então, foram projetados prováveis iniciadores e sondas de captura cujas sequências foram comparadas com os genomas de seis *flavivirus* e mais o genoma da chikungunya através do software BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). O processo de escolha e comparação das sequências foi repetido até a obtenção de iniciadores com baixa similaridade.

Utilizando os eletrodos fabricados e as sequências projetadas a última etapa de construção consistiu na imobilização das sequências de DNA de captura na superfície do eletrodo. Foram determinados, através de experimentos, a melhor concentração das sequências, o tempo e temperatura ideais para incubação. Um dos fatores críticos da fase de incubação é a evaporação da solução contendo as sequências. Para manter a umidade adequada utilizou-se uma câmara fechada de polipropileno contendo recipientes com água ultrapura. Este arranjo garantiu a permanência da gota da solução durante todo o processo nos eletrodos Au-PET. Entretanto, nos eletrodos Au₃-PET, devido ao diâmetro reduzido da região de deposição da gota foi necessária colocação adicional de recipientes com água além do completo fechamento da câmara com adesivos, impedindo assim a evaporação da solução.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fabricação dos eletrodos de Au-PET

Os eletrodos de Au-PET para o desenvolvimento dos biossensores deste trabalho foram fabricados em duas configurações, como ilustra a **Figura 5.1**. Os eletrodos com trilha única (Au-PET) foram usados em uma célula eletroquímica tradicional e os eletrodos com três contatos (Au3-PET) usados em medidas de amostras com gotas.



Figura 5.1 - Fotografias dos eletrodos Au-PET fabricados pelo método de evaporação térmica de Au sobre substrato de PET: **(a)** eletrodo de três contatos (Au3-PET); **(b)** eletrodo de trilha única (Au-PET).
Fonte: Elaborada pelo autor.

As dimensões do substrato, $3,2 \times 0,8$ cm, foram escolhidas para que todas as etapas do processo de construção possam ser realizadas em tubos *ependorf* de 2 mL. Essa característica geométrica proporciona o armazenamento, a limpeza, funcionalização e medida de amostras nesse recipiente comum em laboratório. As dimensões dos círculos de imobilização foram determinadas através do contato de gotas de diferentes volumes e obteve-se o diâmetro de 5 mm para comportar uma gota de $30 \mu\text{L}$ no eletrodo Au-PET, **Figura 5.2a**. No eletrodo Au3-PET a área total das 3 esferas comporta $60 \mu\text{L}$, **Figura 5.2b**, enquanto a esfera menor com diâmetro de 2,2 mm comporta $5 \mu\text{L}$, **Figura 5.2c**,

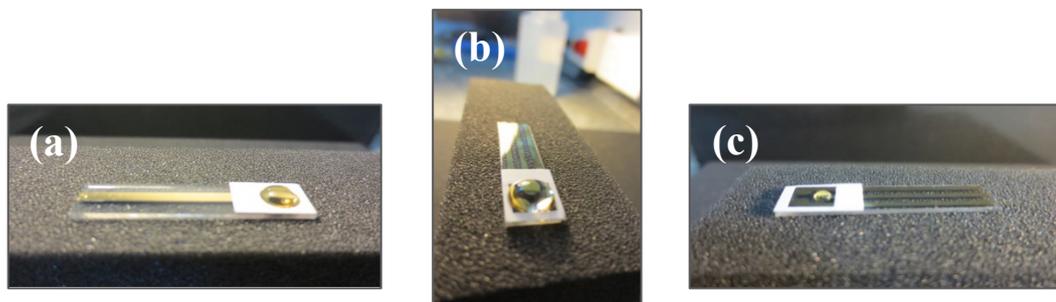


Figura 5.2 - Volumes de solução comportados pelos eletrodos: **(a)** Au-PET, $30 \mu\text{L}$; **(b)** Au3-PET, $60 \mu\text{L}$ nas três esferas e **(c)** Au3-PET, $5 \mu\text{L}$ na esfera menor.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Embora o desenvolvimento de genossensores esteja mais ligado às áreas de pesquisa de ponta, em algum momento, poderá ser criado um dispositivo para servir a população, que segue um caminho natural: pesquisa, patente e produção em larga escala. Um exemplo desse caminho foi o desenvolvimento dos biossensores de glicose, que a partir do conceito inicial proposto por Clark e Lions,¹¹⁷ em 1962, por mais de cinco décadas recebeu inúmeras contribuições até chegar aos modelos simples disponíveis atualmente. Hoje é possível adquirir um medidor de glicose em uma farmácia, por menos de US\$ 35,00, com dimensões de um *pendrive* e que acompanha tiras de teste que permitem ao portador de diabetes o monitoramento de seus níveis de glicose em casa.

Visando uma possível produção, o custo total de cada eletrodo impresso Au-PET foi avaliado tomando como base os valores dos materiais adquiridos no âmbito de pesquisa. Os materiais e processos envolvidos na produção foram: substrato de PET, ouro, reagentes e utilização de equipamentos, cujos respectivos valores estão relacionados na **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1 - Custos unitários de produção de eletrodos evaporados de Au-PET. Valores tomados com base nos custos de materiais para fins de pesquisa.

Material ou processo	Área (mm ²)	Volume (m ³)	Massa (g)	Custo (US\$)
PET	256	256 10 ⁻⁶	356 10 ⁻³	0,50
Ouro metalizado mais as perdas na câmara	59,2	5,92 10 ⁻¹²	209 10 ⁻⁶	0,68
Reagentes	Utilizados na preparação e limpeza			0,02
Utilização de equipamentos	Preparação e evaporação			0,76
DNA de captura	Volume de 30 µL a 0,5 µmol L ⁻¹			0,53
Custo de materiais por unidade (US\$)				2,49

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o cálculo da quantidade total de ouro foi considerada a perda evaporada dentro da câmara, uma vez que em cada metalização a câmara tem capacidade para produzir 150 eletrodos, com um consumo de 2,5 g de ouro sólido. O custo final dos materiais e processo por unidade ficou em US\$ 2,49. Para fins comparativos, um eletrodo impresso semelhante vendido por empresa comercial para fins de pesquisa sai a um custo de US\$ 5,48 a unidade. A opção de fabricar os eletrodos evaporados para esta pesquisa já foi vantajosa do ponto de vista financeiro, além de outros aspectos como controle de processo e maior reprodutibilidade entre eletrodos. Para produção em larga escala estima-se que esse custo seja reduzido de 50 a 60% do valor de pesquisa, o que indica que a produção dos eletrodos Au-PET é viável do ponto de

vista econômico. Entretanto, no custo final de um futuro produto comercializável deverá ser acrescido o valor da mão de obra intelectual e a utilização das instalações envolvidas na pesquisa e desenvolvimento. A valoração de patentes consiste na construção de uma função que represente a evolução de valor ao longo dos seus vinte anos de vigência. Para um estudo inicial do contexto das patentes e modelos de transferência de tecnologia no país sugere-se o livro *Transferência de tecnologia: estratégias para estruturação e gestão de núcleos de inovação tecnológica*¹¹⁸. O texto trata de forma ampla e atualizada a questão e inclui indicações de boas práticas de transferência, comercialização e interação entre instituições científicas e tecnológicas. Outro trabalho técnico atualizado sobre a valoração de patentes é o artigo de Guimarães¹¹⁹ que trás estudo de caso de instituição de pesquisa brasileira e faz referências aos textos mais significativos para valorar uma patente.

5.2 Morfologia dos eletrodos descartáveis de Au-PET

5.2.1 Estudo da morfologia e rugosidade dos eletrodos de Au-PET

A formação de monocamadas auto-organizadas (*self-assembled monolayers* - SAMs) é diretamente influenciado pela rugosidade (R) da superfície. Valores elevados para R prejudicam a orientação das monocamadas, uma vez que sítios não preenchidos com tiol-DNA ficam expostos favorecendo a passagem de cargas elétricas. Em superfícies com alta rugosidade pode ocorrer ainda a adsorção eletrostática de sequências-alvo tornando o biossensor de DNA menos específico para detecção de sequências complementares. Portanto, a análise da rugosidade contribuiu para avaliar se a superfície dos eletrodos Au-PET era aceitável comparativamente com outros substratos e eletrodos, uma vez que na construção dos biossensores utilizou-se a organização de sequências de captura em SAMs. Além disso, a medida da rugosidade serve como parâmetro para verificar a reprodutibilidade da construção entre eletrodos. A rugosidade dos eletrodos Au-PET foi avaliada, inicialmente por microscopia de força atômica, em termos comparativos com eletrodos fabricados em materiais usuais como o vidro e o silício. A **Figura 5.3** mostra imagem do substrato de PET vazio e após a evaporação térmica com ouro, assim como a análise da rugosidade obtida por microscopia de força atômica (do inglês, *atomic force microscopy* - AFM).

O perfil de rugosidade, **Figuras 5.3b e 5.3d**, foi tomado na imagem de topografia por AFM das **Figuras 5.3a e 5.3c**, perfis 1 (em branco tracejado) e perfis 2 (em vermelho sólido), respectivamente ao substrato de PET e à superfície evaporada com Au sobre PET. O substrato

de PET, **Figuras 5.3b**, apresentou distância máxima entre o vale mais profundo e o pico mais alto no perfil 1 de 4 nm e no perfil 2 de 1 nm. Enquanto que na superfície de Au sobre PET, **Figuras 5.3d** essa distância máxima no perfil 1 foi de 25 nm, e no perfil 2 em torno de 4 nm. Embora existam os pontos mais altos, o padrão de rugosidade do perfil 2 é predominante em ambas superfícies.

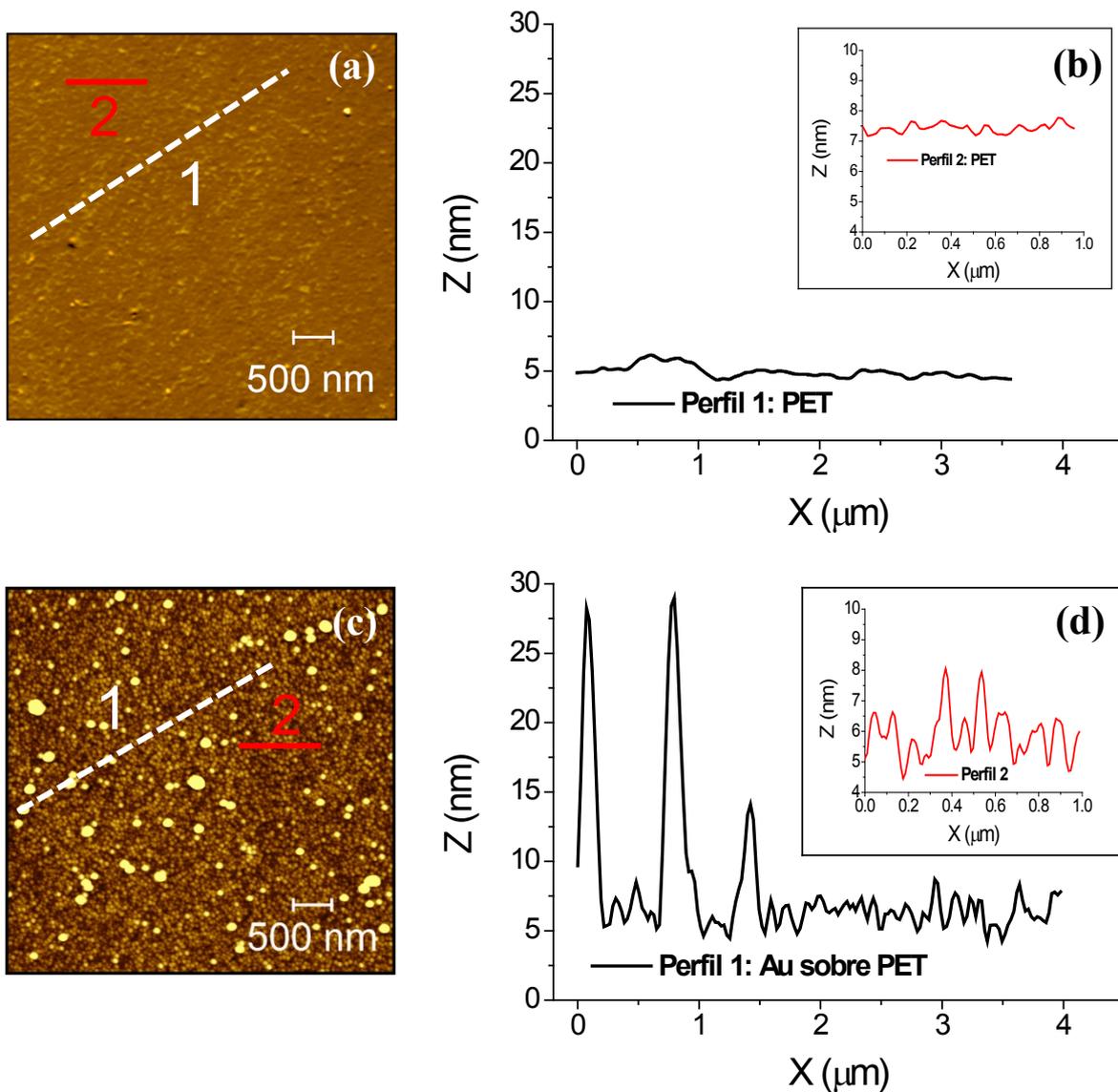


Figura 5.3 - Substrato de PET: (a) Imagem de topografia obtida por microscopia de força atômica; (b) Perfis de rugosidade obtido da imagem em (a): perfil 1 em linha branca tracejada e perfil 2 em vermelho sólida. **Eletrodo Au-PET:** (c) Imagem de topografia e (d) Perfis de rugosidade obtido da imagem em (c). Imagens tratadas no *software Gwyddion* versão 2.42.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As rugosidades por área (R_a) e rugosidade quadrática média (R_{rms}) do substrato de PET evaporado com ouro, mostradas na **Tabela 5.2**, foram comparadas com as rugosidades do vidro, mica e silício, evaporados simultaneamente na mesma câmara. Em todos os substratos

após a evaporação do ouro há um pequeno aumento na rugosidade decorrente do processo que provoca o aparecimento de partículas maiores na superfície.

Tabela 5.2 - Rugosidade por área (R_a) e rugosidade quadrática média (R_{rms}) do substrato de PET antes e após a evaporação comparada com vidro, mica, e silício. Valores determinados em uma imagem de topografia por AFM de $5 \times 5 \mu\text{m}$, utilizando o *software Gwyddion* versão 2.42.

Material	R_a (nm)	R_{rms} (nm)
	$R_a = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i - \bar{X} $	$R_{rms} = \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2}$
PET	1,53	1,96
Au-PET	1,69	2,40
Vidro	1,03	1,70
Au-Vidro	1,16	1,83
Mica	0,69	1,40
Au-Mica	0,97	1,41
Silício sem uso	0,67	1,47

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de contraste de fase do eletrodo Au-PET obtida por AFM revela uma superfície composta por único elemento, não evidenciando o aparecimento de contaminantes na amostra, como mostrado na imagem de contraste de fase por microscopia de força atômica, **Figura 5.4a** e na imagem em topografia 3D, **Figura 5.4b**.

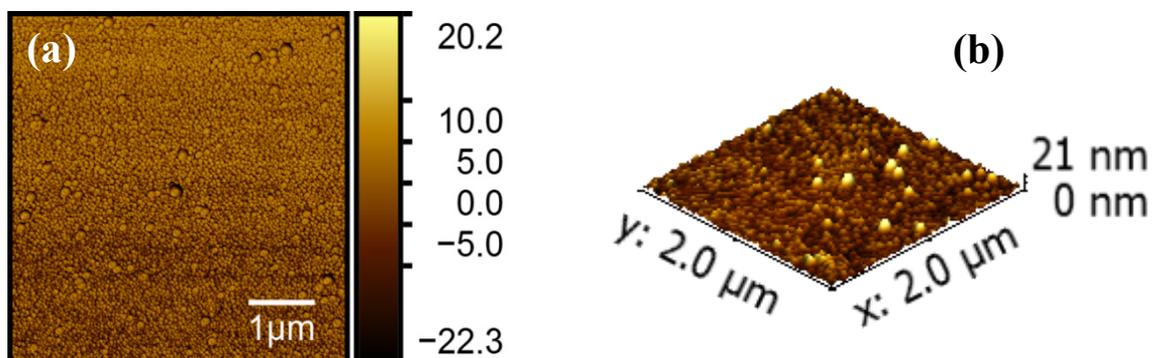


Figura 5.4 - Eletrodo Au-PET: **(a)** Imagem de contraste de fase obtida por AFM. **(b)** Imagem de topografia 3D. Imagens tratadas no *software Gwyddion* versão 2.42.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A espessura da camada de Au depositada no substrato de PET foi programada durante a evaporação para atingir 150 nm, controle obtido através das medidas de acréscimo de massa no cristal de quartzo da evaporadora Balzers. O perfil da espessura desta camada foi verificado por AFM, ensaio no qual o eletrodo Au-PET foi submerso em nitrogênio líquido e fraturado pela ação de ultrassom durante 30 segundos. A **Figuras 5.5a e 5.5b** mostra as imagens de AFM e o perfil real da camada de Au depositada no substrato, respectivamente.

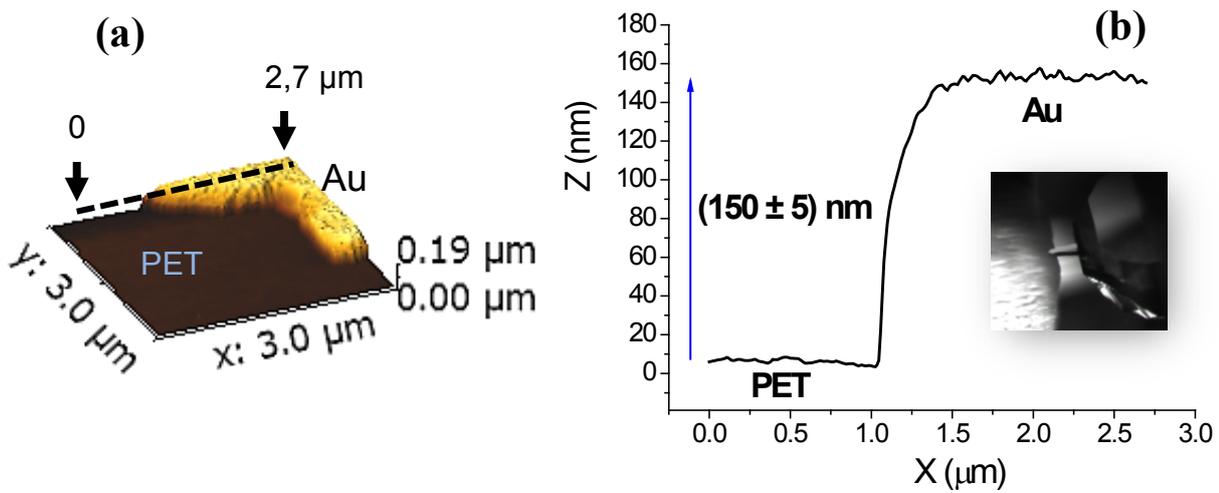


Figura 5.5 - Perfil da camada de Au metalizada no substrato de PET: **(a)** Imagem de topografia 3D do eletrodo Au-PET após fratura em nitrogênio líquido sob ultrassom; **(b)** Perfil da fratura obtida por microscopia de força atômica cujo erro foi estimado com base na medida de três pontos distintos da fratura. Detalhe em **(b)**: fotografia do cantilever no ponto de fratura, aumento óptico de 750x. Imagens tratadas no *software Gwyddion* versão 2.42.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As medidas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) tiveram como objetivo a análise da composição da superfície utilizando a espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDX). A aceleração do feixe foi ajustada para 10 kV, uma vez que para maiores valores o *spot* de penetração de elétrons ultrapassou a espessura de 150 nm de Au depositado, efeito evidenciado durante as medidas pelo aparecimento de bandas mais intensas correspondentes aos elementos C e O constituintes do substrato de PET. Portanto, as medidas da camada de Au depositada no substrato, obtidas pelo cristal de quartzo da metalizadora, pela fratura da camada de ouro e penetração do feixe de elétrons, mesmo tomada em eletrodos aleatórios, foram iguais dentro da pequena margem de erro (150 ± 5) nm, o que revela a uniformidade da espessura da camada obtida no processo de evaporação.

A análise qualitativa da superfície por espectroscopia EDX do substrato de PET, **Figura 5.6b**, mostra a prevalência dos elementos característicos do polímero como C e O. A superfície do substrato de PET, **Figura 5.6a**, para tomada das micrografias foi preparada com uma camada de 5 nm de Pt, o que justifica o aparecimento do pico correspondente no espectro.

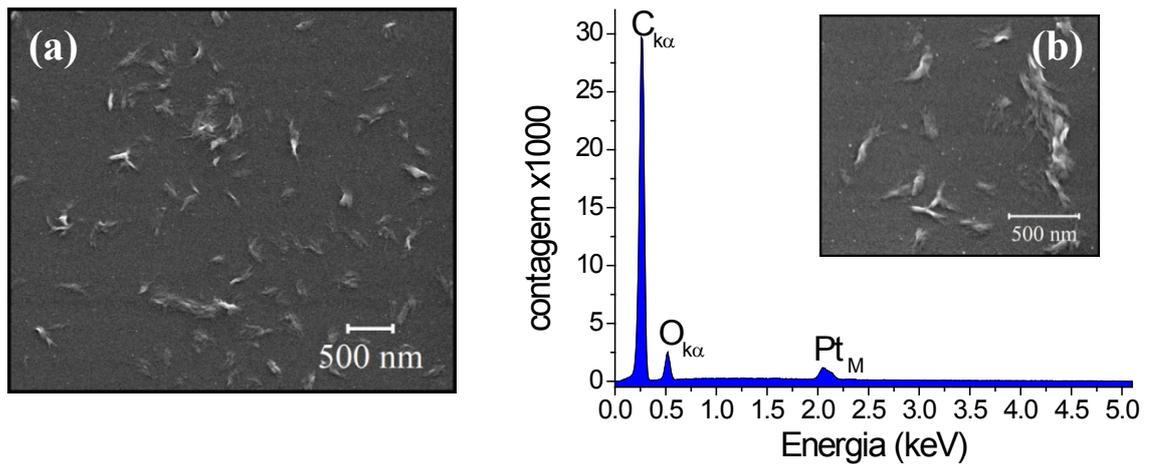


Figura 5.6 - (a) Microscopia eletrônica de varredura no substrato de PET, previamente limpo, coberto com 5 nm de Pt para microscopia; (b) espectro de raios X por energia dispersiva (EDX) do substrato de PET. Detalhe em (b): região de varredura da análise por EDX.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise qualitativa da superfície do substrato de PET evaporado com Au revela a inexistência significativa de outros elementos metálicos, como mostrado no espectro EDX da **Figura 5.7b**.

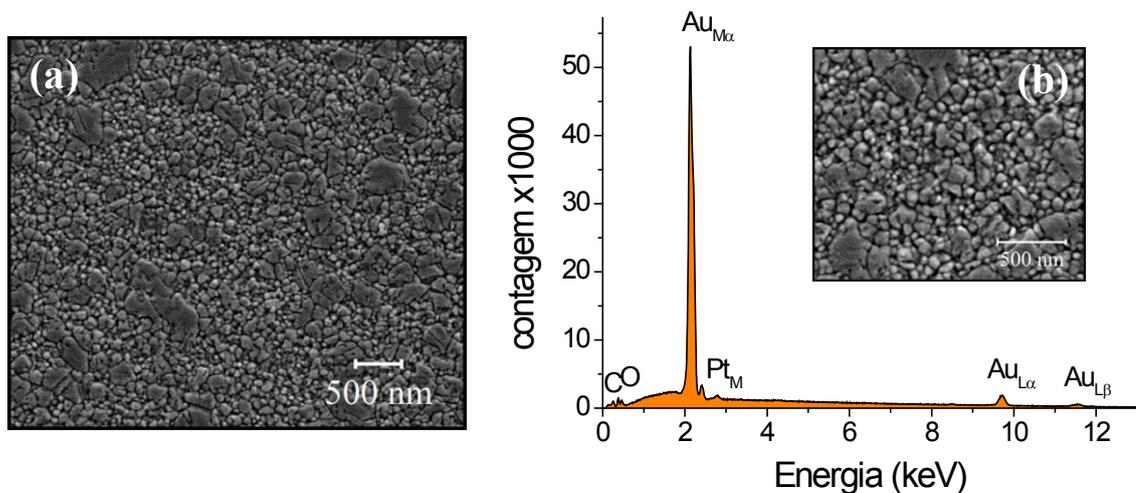


Figura 5.7 - (a) Microscopia eletrônica de varredura da superfície de Au metalizada no substrato de PET; (b) Espectro EDX da superfície do Au, previamente limpo. Detalhe em (b): região de varredura da análise por EDX.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 Caracterização eletroquímica do eletrodo de trilha única (Au-PET)

5.3.1 Voltametria cíclica

A caracterização eletroquímica dos eletrodos evaporados Au-PET foi inicialmente avaliada através de voltamogramas cíclicos comparativamente com eletrodos de ouro barra, nas velocidades de varredura de 10 a 400 mV/s, como ilustram as **Figuras 5.8a e 5.8b**

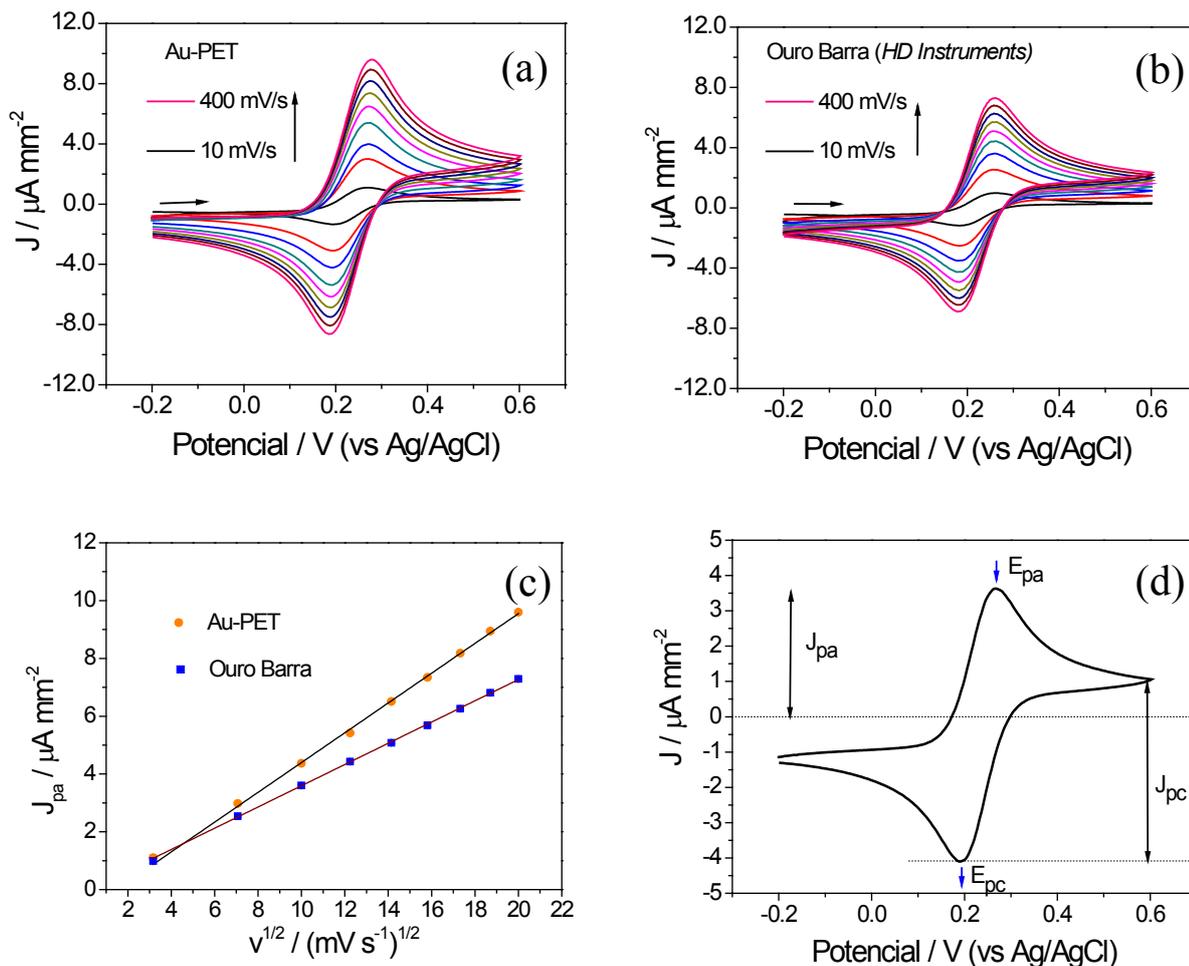


Figura 5.8 - (a) Voltamograma cíclico do eletrodo Au-PET com a velocidade de varredura de 10 a 400 mV/s; (b) Voltamograma cíclico de um eletrodo de ouro comercial do tipo barra; (c) Picos de densidade de corrente anódica (J_{pa}) nos eletrodos Au-PET (●) e ouro barra (■), correspondentes à raiz quadrada das velocidades de varredura; (d) parâmetros típicos de um voltamograma cíclico. Eletrólito $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L⁻¹ em KCl 1,0 mmol L⁻¹.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos eletrodos de Au-PET, os picos da densidade de corrente anódica apresentaram deslocamento linear relativo ao aumento da raiz quadrada das velocidades de varredura, **Figura 5.8c**, inclinação ($0,52 \pm 0,01$) na reta ($J_{pa} = av^{1/2} + b$) com ajuste de $R^2 = 0,998$. O mesmo

ocorreu para os picos de corrente nos eletrodos comerciais de ouro, $(0,37 \pm 0,01)$, ajuste de $R^2=0,999$. A **Figura 5.8d** mostra um voltamograma cíclico com indicação dos parâmetros típicos e que de acordo com a teoria de Nicholson e Shain,¹²⁰ podem ser usados para determinar a reversibilidade de um sistema eletroanalítico composto de eletrodos e eletrólito. Para um sistema reversível os seguintes parâmetros são observados: $\Delta E_p = |E_{p_a} - E_{p_c}| = 59,0$ mV; $I_{p_a}/I_{p_c} = 1$; E_{p_a} e E_{p_c} independem da velocidade de varredura. Para os sistemas semirreversíveis ΔE_p cresce com o aumento da velocidade de varredura e a relação I_{p_a}/I_{p_c} assume valores maiores do que a unidade.

No eletrodo Au-PET observa-se a separação crescente entre os picos catódicos e anódicos dependente da velocidade de varredura. Uma medida quantitativa do grau de reversibilidade (Λ), parâmetro adimensional, pode ser definida como sendo a razão entre cinética e transporte,¹²⁰ equação (5.1).

$$\Lambda = \frac{\kappa_o}{(D_o^{\alpha_a} D_r^{\alpha_c} \sigma)^{1/2}} \quad (5.1)$$

Sendo, κ_o , a constante de velocidade [ms^{-1}]; D_r e D_o , os coeficientes de difusão da espécie reduzida e oxidada [m^2s^{-1}], respectivamente. $\sigma = v(nF/RT)$ [s^{-1}]. Quando $D_r = D_o = D$:

$$\Lambda = \kappa_o [D \sigma]^{-1/2} \quad (5.2)$$

Assim os valores do grau de reversibilidade podem ser relacionados com as variações entre os potenciais de pico catódico e anódico.¹²⁰ Para eletrodos planos estacionários sugerem-se as seguintes amplitudes: sistema reversível $\Lambda \geq 15$; sistema semirreversível $15 > \Lambda > 10^{-2}$ e irreversível $\Lambda \leq 10^{-2}$. A **Tabela 5.3** mostra os três parâmetros relacionados à reversibilidade nos eletrodos Au-PET, obtidos nos voltamogramas da **Figura 5.8a**, comparados com parâmetros para um sistema reversível.

Tabela 5.3 – Parâmetros para avaliação da reversibilidade dos eletrodos Au-PET tomados nos voltamogramas da Figura 5.8a. Valores para o parâmetro Λ obtidos em Brett e Brett.¹²⁰

Parâmetro	Au-PET ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$)	Sistema reversível
ΔE_p	$77,0 \pm 0,5 \text{ mV}$	$59,0 \text{ mV}$
$ I_{p_a}/I_{p_c} $	$1,23 \pm 0,30$	$1,0$
Λ (reversibilidade)	$2,60 \pm 0,05$	≥ 15

Fonte: Elaborada pelo autor.

Portanto, o parâmetro de reversibilidade obtido ($\Lambda=2,60 \pm 0,05$) indica que o eletrodo Au-PET em eletrólito de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ pode ser classificado como um sistema semirreversível. O cálculo do parâmetro de reversibilidade foi desenvolvido inicialmente para eletrodos do tipo gota de Hg, portanto, a sua aplicação em eletrodos de filmes metálicos pode não ser exata em alguns aspectos da teoria de Nicholson e Shain,¹²⁰ a qual se apoia. Entretanto, a metodologia foi utilizada neste trabalho como parâmetro comparativo entre os eletrodos de ouro barra e os eletrodos de Au-PET, sendo válida neste contexto a relação de resposta entre os eletrodos uma vez que os critérios do cálculo foram iguais.

5.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

O eletrodo Au-PET possui baixa impedância para transferência de cargas, indicada pelas curvas retilíneas no diagrama de Nyquist da **Figura 5.9**. Os eletrodos de ouro do tipo barra apresentaram uma pequena impedância na região de altas frequências que pode ser atribuída ao uso desse eletrodo, submetido a grande número de experimentos com adsorção de biomoléculas. Nesse caso, os compostos com tiol somente seriam eliminados com um polimento severo, o que não foi adotado como método de limpeza. Uma vez que o procedimento de limpeza realizado foi o polimento eletroquímico em meio ácido de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, algum elemento ficou adsorvido na superfície. Por outro lado, os eletrodos Au-PET usados nessa caracterização eram novos e, portanto, isentos de material orgânico.

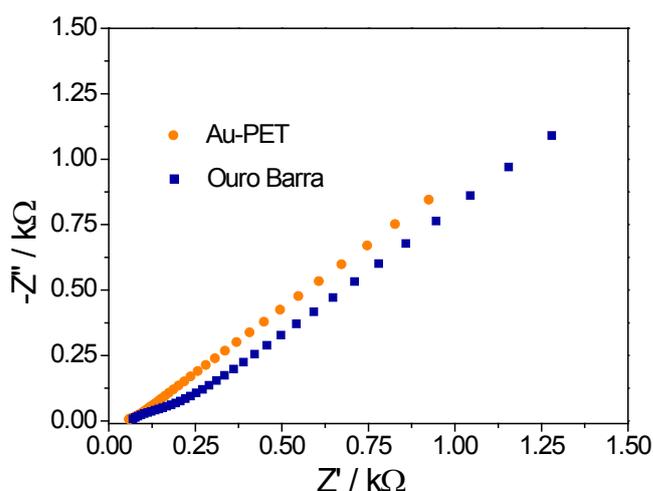


Figura 5.9 - Espectroscopia de impedância Eletroquímica (EIS), representada no diagrama de Nyquist do eletrodo Au-PET (●) e eletrodo de ouro barra *HD Instruments* (■). Eletrólito $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 1,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.3 Cálculo da área eletroativa dos eletrodos Au-PET

O fator de rugosidade (f_R) é definido como sendo a razão entre a área eletroativa (A_{ea}) e a área geométrica (A_{ge}) do eletrodo. Para determinar a A_{ea} uma série de métodos foi revista por Trasatti e Petrii.¹²¹ Dentre todos os métodos válidos foi escolhida a medida de adsorção de oxigênio em meio ácido para avaliação da A_{ea} e posterior cálculo do f_R dos eletrodos Au-PET. O voltamograma cíclico característico do processo de quimiossorção e redução do óxido de ouro na superfície do eletrodo Au-PET, em H_2SO_4 0,5 mol L⁻¹, é mostrado na **Figura 5.10**. A curva foi tomada logo após o polimento eletroquímico, em uma nova solução de H_2SO_4 , submetida à purga de N_2 durante 30 minutos antes das medidas.

Em consistência com a literatura,¹²² para a superfície policristalina, a formação do óxido de ouro ocorre no intervalo de potencial de 1,10 a 1,45 V. Com a inversão no sentido da varredura o óxido é reduzido no pico de potencial de redução em 0,92 V. Os principais picos correspondentes às etapas do processo foram indicados na **Figura 5.10**, cujas etapas são descritas a seguir.

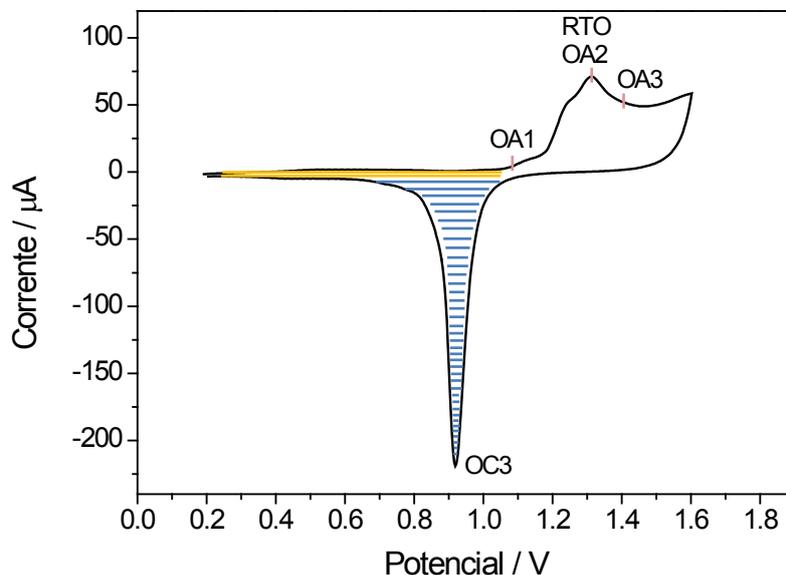


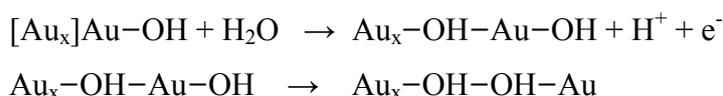
Figura 5.10 - Voltamograma para o cálculo da área eletroativa dos eletrodos Au-PET em H_2SO_4 0,5 mol L⁻¹ com velocidade de varredura de 100 mVs⁻¹. Carga para redução do óxido de ouro (Q_m), área hachurada em azul. Carga da dupla camada (Q_{dc}), área laranja.

Fonte: Elaborada pelo autor.

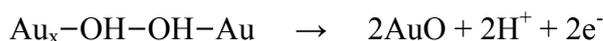
Primeiramente, a formação do óxido na superfície do ouro ocorre a partir da substituição de ânions adsorvidos por moléculas de água e sua consequente oxidação com transferência de um elétron,^{122,123} ponto OA1 em 1,10 V em H_2SO_4 0,5 mol L⁻¹:



O segundo pico, OA2 em 1,35 V, corresponde à deposição de OH acompanhada pela desorção de ânions. Simultaneamente, RTO em 1,35 V, a camada metálica mais superficial contendo a hidroxila adsorvida sofre uma rotação. Esses dois processos foram denominados *replacement-turnover* por Angerstein-Kozłowska *et al.*:¹²²



Na última etapa, OA3 em 1,40 V, se completa a formação da monocamada OH com a re-adsorção de moléculas de água na superfície oxidada.



No processo inverso ocorre novamente a rotação da camada mais superficial do metal e a redução do óxido de ouro, todavia ambos os processos são rápidos a temperatura ambiente e em baixas velocidades de varredura. Assim, observa-se apenas um pico de redução, OC3 em 0,92 V. O mecanismo de formação e redução de óxidos na superfície do ouro é relevante para formação de SAMs, uma vez que moléculas de tiol estabelecerão ligações nos sítios ativos da superfície. Esse processo pode ser usado para calcular a área eletroativa (A_{ea}) ou área microscópica e fornece informação a respeito da quantidade de sítios de adsorção disponíveis na superfície. A A_{ea} consiste na área total exposta da superfície, o que inclui depressões, ondulações ou quaisquer defeitos, mesmo a nível atômico.¹²⁴

A área eletroativa calculada pode sofrer alteração em polimentos eletroquímicos sucessivos, entretanto, tomados eletrodos novos e executando o processo pela primeira vez é possível obter valores reprodutíveis para o eletrodo Au-PET. A A_{ea} pode então ser calculada partindo-se da equação (5.3).¹²⁵

$$A_{ea} = \frac{n_a \cdot N_A}{d_{as}} \quad (5.3)$$

Sendo A_{ea} a área eletroativa, n_a o número de mols de gás adsorvido, N_A a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$) e d_{as} a densidade atômica superficial do ouro. Uma vez que a quantidade de gás está relacionada com a quantidade de carga, $n_a = Q_m/F$, e a transferência de elétrons pode ser representada pela relação $e = F/N_A$, então a equação (5.3) pode ser reescrita como na equação (5.4).

$$A_{ea} = \frac{Q_m N_A}{F d_{as}} = \frac{Q_m}{e \cdot d_{as}} \quad (5.4)$$

Onde F é a constante de Faraday ($96485,3328 \text{ C mol}^{-1}$), e a carga elementar e Q_m a carga para redução do óxido de ouro. O fator $e \cdot d_{as}$ é uma constante experimental dependente da característica superficial do ouro. Para a redução desta monocamada, baseado no cálculo da concentração média dos átomos de ouro na superfície, Trasatti e Petrii¹⁰⁵ sugerem um valor experimental para $e \cdot d_{as}$ de $390 \mu\text{C cm}^{-2}$. O valor da carga Q_m é obtido da integração do pico de redução do óxido de ouro (corrente catódica), área hachurada em azul na **Figura 5.10**. Entretanto, existe a contribuição da carga da dupla camada capacitiva (Q_{dc}), área laranja, que para maior exatidão na determinação da área eletroativa deve ser subtraída do valor de Q_m . Finalmente o fator de rugosidade (f_R) é calculado pela relação entre a área eletroativa (A_{ea}) e a área geométrica (A_{ge}), como indicado na equação (5.5).

$$f_R = \frac{A_{ea}}{A_{ge}} = \frac{1}{A_{ge}} \cdot \frac{Q_m - Q_{dc}}{390 \mu[\text{C cm}^{-2}]} \quad (5.5)$$

Neste trabalho o valor médio de $Q_m - Q_{dc}$ foi de $(229 \pm 39) \mu\text{C}$, para cinco eletrodos tomados aleatoriamente e medidos em experimentos distintos. A área geométrica do eletrodo de trilha única ($d = 0,5 \text{ cm}$) foi calculada em $0,20 \text{ cm}^2$. Portanto o f_R médio calculado na equação (5.6) resultou em:

$$f_R = \frac{1}{0,20 [\text{cm}^2]} \cdot \frac{229 \mu[\text{C}]}{390 \mu[\text{C cm}^{-2}]} = (2,93 \pm 0,41) \quad (5.6)$$

A literatura indica que os valores adequados para SAMs de grande reprodutibilidade são obtidos para fatores de rugosidade entre 1,5 – 1,8.¹²⁶ Entretanto, trabalhos mais recentes reportam valores entre 1,5-2,0¹²⁷ para eletrodos de ouro do tipo barra. O valor do fator de

rugosidade nos eletrodos Au-PET $f_R = (2,93 \pm 0,41)$ ficou acima dos valores usuais, existindo ainda uma variação significativa entre eletrodos. Sendo assim, a variação de f_R pode afetar a reprodutibilidade na formação de SAMs de DNA funcionalizadas com tiol utilizada para a construção dos biossensores. Essa característica do eletrodo deverá ser levada em conta na avaliação dos resultados da construção do biossensor.

5.3.4 Sensibilidade do eletrodo Au-PET com relação ao pH

A sensibilidade do eletrodo Au-PET com a variação do pH foi avaliada por cronopotenciometria em uma célula eletroquímica, com pH inicial de 4,5. Após a adição de alíquotas de NaOH observou-se quedas consecutivas no potencial de circuito aberto, entre o eletrodo de referência Ag/AgCl e o eletrodo de trabalho Au-PET, **Figura 5.11a**. O decréscimo do potencial é devido ao aumento de cargas negativas (OH^-) na solução. O cálculo tomou como base a inclinação da reta de melhor ajuste ($R^2 = 0,980$) dos pontos de queda no potencial, mostrada na **Figura 5.11b**, tomados em três eletrodos em experimentos distintos. A sensibilidade do eletrodo Au-PET ao pH foi de $(30,7 \pm 0,8)$ mV/pH.

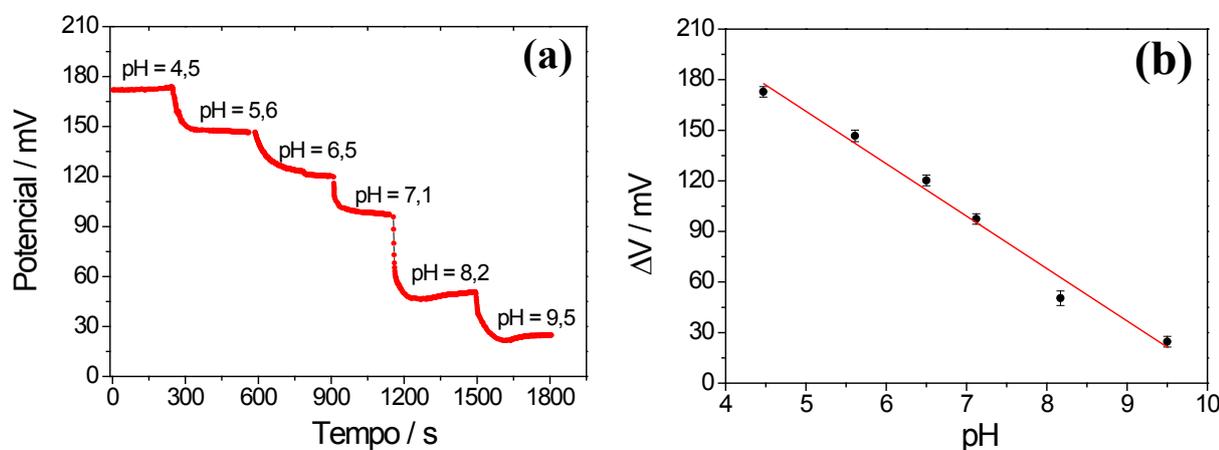


Figura 5.11 - Sensibilidade do eletrodo Au-PET à variação do pH: **(a)** Cronopotenciometria, decréscimos no potencial com adição de alíquotas de $10 \mu\text{L}$ de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; **(b)** Variação do potencial com o pH, medida em triplicata em eletrodos distintos, $R^2=0,980$, inclinação $(30,7 \pm 0,8)$ mV/pH. Volume inicial da célula de 20 mL com solução de PBS $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em um trabalho reportado recentemente por Figueiredo *et al.*¹²⁸ um biossensor para detecção da proteína NS1 do vírus da dengue, construído em um substrato de vidro Bk7 metalizado com uma trilha única de ouro e teve uma resposta ao pH de (29 ± 1) mV/pH. Portanto, o eletrodo Au-PET apresentou sensibilidade ao pH praticamente igual ao Bk7-ouro

dentro erro experimental, o que mostra que o substrato de PET não altera o comportamento do Au com relação do pH.

5.4 Projeto de iniciadores, sondas de captura e sequências alvo para detecção dos vírus da zika e da dengue

A primeira etapa para o projeto de iniciadores, sondas de captura e sequências alvo para os biossensores deste trabalho foi a escolha de sequências específicas capazes de diferenciar os vírus da zika e dengue. Para análise dos genomas foram utilizadas as sequências completas do RNA dos vírus depositadas no *GenBank*, sob os códigos NC_012532.1 (zika) e NC_001477.1 (dengue). Com base no conhecimento filogenético desses dois vírus,^{18,129} pertencentes ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviridae*, foi escolhida a região do genoma viral que codifica a proteína não estrutural NS5. As regiões codificantes dessa proteína são as mais conservadas em diferentes linhagens e favorecem a escolha de iniciadores universais. Os genomas dos dois vírus foram alinhados com o *software* Clustal X e então foi identificada a sequência alvo que mais diferencia os dois organismos. Em função da reação PCR duplex, os dois pares de iniciadores, as sondas de captura e as sequência alvo foram desenhadas levando-se em consideração todos os parâmetros necessários para a integração mais eficiente entre a etapa de amplificação da PCR e a detecção dos produtos pelo biossensor.

O projeto dos pares de iniciadores para amplificação em PCR duplex e geração de produtos adequados para detecção no biossensor foi realizado com auxílio do *software* *PrimerQuest Tool* (IDT DNA Technologies). Foram incluídos parâmetros adicionais àqueles normalmente utilizados no projeto de iniciadores de maneira a facilitar a análise simultânea do produto da PCR duplex pelo biossensor. Dentre esses parâmetros os mais importantes foram: iniciadores com 23 a 28 bases, número de bases do produto da PCR igual para os dois tipos de vírus, temperatura de fusão entre os produtos com diferença de até 5°C.

Para que os valores do sinal decorrente do evento de hibridização sejam semelhantes, tanto na quantidade de cargas elétricas e dimensão física, os produtos da PCR duplex foram desenhados para conter somatórios das bases AT (adenina-timina) e CG (citosina-guanina) com maior proximidade possível. Como resultados dessa etapa de bioinformática foram obtidos iniciadores e sondas de captura contendo 23 e 24 nucleotídeos e produtos com 100 nucleotídeos.

As sequências desenhadas com exclusividade para este trabalho são mostradas na **Tabela 5.4** e identificadas como segue: **(1) Correspondentes ao vírus da zika:** *Zfor*-iniciador senso; *Zrev*-iniciador reverso; *Zcap*-sonda de captura; *Zamp*-produto da PCR. **(2) Correspondentes ao vírus da dengue:** *Dfor*-iniciador senso; *Drev*-iniciador reverso; *Dcap*-sonda de captura; *Damp*-produto da PCR. Nos anexos A e B, no final do texto deste trabalho, são representadas as sequências das regiões que codificam a proteína NS5 nos genomas dos vírus da zika e dengue, respectivamente. A sequência que gera o produto da PCR está marcada em negrito nos genomas e é complementar nos sentido 3'-5' às sequências *Damp* e *Zamp*, que são as sequências alvo para detecção.

As posições inicial e final referem-se à posição da sequência no genoma do vírus, anexos A e B, no final deste texto. As sondas de captura (*Zcap* e *Dcap*) são funcionalizadas com uma molécula de tiol para ligação covalente com o ouro, cujas sequências são idênticas aos iniciadores senso (*Zfor* e *Dfor*), respectivamente.

Tabela 5.4 - Relação das sequências de iniciadores, sondas de captura e produto da PCR (*Zamp* e *Damp*) correspondentes aos vírus da zika e da dengue desenhadas para este trabalho. Regiões em negrito em *Zamp* e *Damp* são complementares no sentido 3'-5' às sequências de captura *Zcap* e *Dcap*, respectivamente. As posições inicial e final referem-se às posições complementares nos genomas, apresentados nos anexos A e B, no final deste texto.

Código	Sequência	Posição inicial 5'-3'	Posição final 5'-3'	Número bases
Vírus da zika				
<i>Zfor</i>	5' AGACTTATGGTTGTTGAGGAAGCC 3'	9556	9579	24
<i>Zrev</i>	5' CGCCATTCGTTTGAGTCTATCCC 3'	9615	9637	23
<i>Zcap</i>	5' -tiol- AGACTTATGGTTGTTGAGGAAGCC 3'	9556	9579	24
<i>Zamp</i> (cDNA)	5' TCCACTGACCGCCATTCGTTTGAGTCTATCCCAT CCATTGCTCTGCAACCATCTGGTCACTTTCCT GGCTTCCTCAACAACCATAAGTCTTGCATCTCT 3'	9547	9646	100
Vírus da dengue				
<i>Dfor</i>	5' GCCGAGTGTGGTAGAACTTTGG 3'	8037	8059	23
<i>Drev</i>	5' GGAGTTTCTTGAGAGTGGATTTCG 3'	8095	8118	24
<i>Dcap</i>	5'-tiol- GCCGAGTGTGGTAGAACTTTGG 3'	8037	8059	23
<i>Damp</i> (cDNA)	5' TTCATGAGTGGAGTTTCTTGAGAGTGGATTTCGC ACTAGCATTCCCATGTTTTCTTTGCATTGCT CCAAAGTTTCTACCACACTCGGCATATAGGGA 3'	8028	8127	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

A utilização de um único iniciador para amplificar os quatro sorotipos do vírus da dengue é uma alternativa inviável do ponto de vista de especificidade de diagnóstico. Esta abordagem utiliza regiões dos genomas que não codificam proteínas e possuem similaridade nos quatro sorotipos, mas são extremamente similares a outros vírus do mesmo gênero como febre amarela, zika, dentre outros. Portanto, devido à alta similaridade o uso de sequências na região que não codifica proteínas pode gerar resultados falso-positivos de diagnóstico, ou seja, detectar um tipo de vírus que na realidade não está presente no indivíduo. Uma alternativa para desenvolver um biossensor para dengue é a escolha de um sorotipo com maior prevalência no país ou macrorregião. No Brasil, segundo os boletins epidemiológicos volume 47, n. 3 e n. 8, referentes aos anos de 2015 e 2016, respectivamente, o sorotipo Denv 1 representa aproximadamente 94% de todos os casos. Então nesse trabalho, o projeto dos iniciadores e sondas de captura para detectar a dengue utilizou o sorotipo 1 nos biossensores.

Para verificar a especificidade dos iniciadores e sondas de captura desenhadas para este trabalho as sequências para os vírus da zika e dengue foram comparadas com os genomas dos principais vírus pertencentes ao mesmo gênero, *Flavivirus*. Dentre eles foram incluídos: vírus da febre amarela (YFV); vírus da encefalite de St. Louis (LEV); vírus do Nilo (WNV); vírus da encefalite japonesa (JEV) e murray vírus (MVE). Também foi verificada a semelhança dos iniciadores com o genoma da chikungunya (Chikv). A **Tabela 5.5** relaciona a similaridade encontrada entre os iniciadores propostos e os genomas dos vírus citados.

Tabela 5.5 - Similaridade entre os iniciadores desenhados para identificar os vírus da zika e da dengue, e os genomas de outros vírus do mesmo gênero *Flavivirus* e do vírus da chikungunya. Sendo: YFV-vírus da febre amarela; LEV-vírus da encefalite de St. Louis; WNV-vírus do Nilo; JEV-vírus da encefalite japonesa, MVE-murray vírus e CHIKV-chikungunya.

Iniciador	Número de bases	YFV	LEV	WNV	JEV	MVE	Chikv	Zika	Dengue
<i>Zfor</i>	24	10	9	11	10	9	9	-	9
<i>Zrev</i>	23	8	9	10	8	8	7	-	8
<i>Dfor</i>	23	10	9	10	9	8	11	8	-
<i>Drev</i>	24	9	9	9	10	11	10	9	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

A similaridade verificada considerou uma sequência contínua de bases iguais e os resultados apresentados na **Tabela 5.5** indicam uma baixa similaridade dos iniciadores desenhados neste trabalho com os genomas do mesmo gênero. Sendo assim, a identificação dos vírus da zika e dengue pela análise do produto da PCR prevista é específica do ponto de

vista da complementariedade das sequências, e em consequência, as sondas de captura podem ser usadas para diferenciar essas duas doenças e não produzirão resultados falso-positivos para os outros seis vírus verificados.

5.5 Determinação das concentrações e análise de pureza das soluções de DNA

Um dos pontos críticos para controlar a construção de SAMs utilizando tiol-DNA é quantificar corretamente as concentrações das soluções de DNA. Para essa quantificação a técnica mais utilizada é a espectroscopia no ultravioleta (UV).¹³⁰ O modelo mais acurado, denominado *Nearest-neighbor model*, para determinar o coeficiente de absorção molar (ϵ) no comprimento de absorção máxima (λ_{max}), correspondente do espectro de UV, leva em conta tanto a composição das bases quanto a estrutura secundária de DNA decorrente da interação entre bases adjacentes. Alguns equipamentos dedicados à análise de oligonucleotídeos por UV possuem algoritmos internos para o cálculo e fornecem os valores de concentração em diversas unidades utilizando-se volumes da solução da ordem de μL . Contudo, a determinação da concentração das soluções pode também ser realizada em espectrofotômetros tradicionais utilizando a lei de Lambert-Beer.

Na lei de Lambert-Beer a absorbância (A) é diretamente proporcional ao coeficiente de absorção molar ϵ [$\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}$], à espessura do caminho óptico l [cm] e à concentração C [mol L^{-1}] do analito, como expresso na equação (5.7).

$$A_{\lambda_{max}} = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (5.7)$$

O valor da absorbância no comprimento de onda máximo ($A_{\lambda_{max}}$) é obtido no espectro UV, e como o caminho óptico (espessura da cubeta) é conhecido, falta para determinação da concentração o coeficiente de absorção molar (ϵ), que foi calculado aplicando-se o *Nearest-neighbor model*. Vale lembrar que o coeficiente ϵ depende do número de bases e da sequência em que estão ligadas. O estudo comparativo de modelos preditivos para ϵ de Tataurov *et al.*¹³⁰ fornece uma planilha contendo o algoritmo para o cálculo do coeficiente ϵ . Utilizando uma cubeta com caminho óptico de 1,0 cm a concentração pode então ser calculada como na equação (5.8).

$$C = \frac{A_{\lambda_{max}}}{l \cdot \epsilon} = \frac{A_{\lambda_{max}}}{1,0[\text{cm}] \cdot \epsilon [\text{mol}^{-1} \text{L cm}^{-1}]} = \frac{A_{\lambda_{max}}}{\epsilon} [\text{mol L}^{-1}] \quad (5.8)$$

Os valores do comprimento de onda máximo e do coeficiente de absorção molar das sequências de DNA utilizada no desenvolvimento dos biossensores deste trabalho foram calculados com base no *Nearest-neighbor model* e estão relacionados na **Tabela 5.6**.

Tabela 5.6 - Valores do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e do coeficiente de absorção molar (ϵ) das sequências de DNA utilizadas no desenvolvimento dos biossensores com base no modelo *Nearest-neighbor model*.¹³⁰

Código da sequência de DNA	λ_{max} (nm) (predito pelo modelo)	ϵ (mol ⁻¹ L cm ⁻¹)
<i>Zcap</i> - sequência de DNA de captura para o vírus da zika	257,1	241.832
<i>Zamp</i> - sequência de DNA alvo do vírus da zika	261,3	900.313
<i>Dcap</i> - sequência de DNA de captura para o vírus da dengue	256,4	232.552
<i>Damp</i> - sequência de DNA alvo do vírus da dengue	259,7	937.400

Fonte: Elaborada pelo autor.

O modelo é tão preciso que as curvas preditas para os espectros de UV das sequências de DNA sintético coincidiram com muita proximidade com o espectro coletado em uma amostra, como ilustra a **Figura 5.12**.

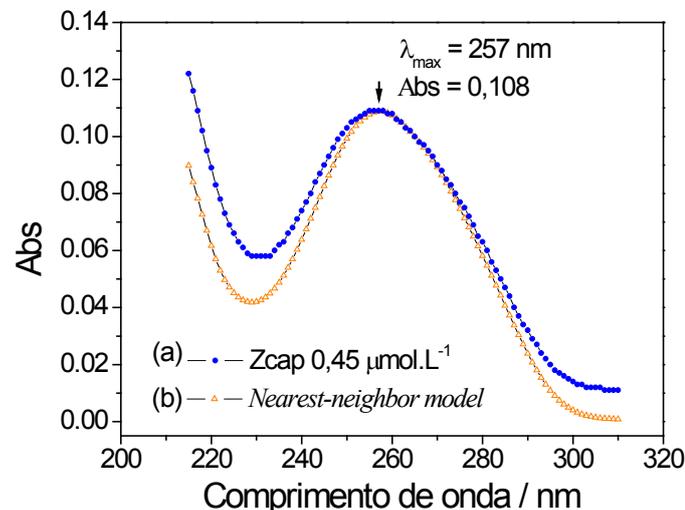


Figura 5.12 - Espectros de ultravioleta da sequência de captura do vírus da zika (*Zcap*): (a) espectro de uma amostra contendo a sequência *Zcap* coletada para cálculo da concentração (●); (b) espectro previsto no modelo *Nearest-neighbor model* (Δ).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A região que se desloca para maiores valores de absorbância na curva de círculos azuis é próxima ao comprimento de onda de 230 nm indicativo da concentração de sais na amostra. Nesse caso, como a solução contendo *Zcap* foi suspensa em tampão TE houve a elevação nesse comprimento de onda.

O procedimento de verificação das concentrações de DNA por UV foi aplicado em todas as amostras antes dos experimentos de imobilização e hibridização nos biossensores, não só para assegurar o valor exato da concentração, mas para avaliar possíveis contaminações ou excesso de sais.

Tomando como exemplo o espectro *Zcap* da **Figura 5.12** foram calculadas as relações entre absorvâncias para análise de pureza. A relação A260/A280 indica presença de proteínas, e quando a razão resulta em valores próximo a 1,8 em pH 8,5 é um indicativo de DNA puro. Se a relação for sensivelmente mais baixa pode indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes na amostra, que absorvem fortemente perto de 280 nm. A relação A260/A230 indica a presença de sais, e os valores esperados estão normalmente entre 2,0 a 2,2 em pH 8,5. Se a razão for sensivelmente menor, pode indicar o excesso de sal ou a presença de outros componentes que absorvem em 230 nm, como tampão EDTA, reagente Trizol ou guanidina. Entretanto, já foi verificado por Wilfinger et al.¹¹⁶ que em pH mais ácido ambas as razões podem sofrer redução de até 0,3 pontos. Considerando a curva de decréscimo das razões apresentada no trabalho citado, foi estimado um decréscimo de 0,2 pontos para as razões das absorvâncias em pH 7,4, como utilizado na solução *Zcap*. Portanto, como relacionado na **Tabela 5.7**, ajustando os valores esperados para ambas as razões, constatou-se que as soluções ficaram dentro dos padrões de pureza recomendados. Caso fossem encontradas alterações nos padrões de pureza seria necessária a dessalinização ou purificações adicionais.

Tabela 5.7 - Análise do padrão de pureza da solução contendo DNA de captura do vírus da zika. As razões entre as absorvâncias A260/A230 e A260/A280 foram obtidas no gráfico da Figura 5.12.

Sequência	A230	A260	A280	Presença de sais A260/A230 (ideal 1,8 - 2,0)	Presença de proteínas A260/A280 (ideal ~ 1,6)
<i>Zcap</i> (0,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$)	0,058	0,107	0,063	1,84	1,70

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.6 Visualização de sequências de DNA por AFM

A visualização de DNA imobilizado na superfície do eletrodo por técnicas como microscopia eletrônica é de difícil avaliação devido à natureza das biomoléculas que se degradam com as altas energias do feixe de elétrons. Uma opção para verificar essa

imobilização é utilizar a microscopia de força atômica. Entretanto, não se obteve neste trabalho imagens satisfatórias diretamente no eletrodo Au-PET, devido à dimensão nanométrica das sequências e a rugosidade da superfície dos eletrodos. Para visualizar as sequências de maneira alternativa utilizou-se um substrato de mica, no qual foi depositada uma gota com volume de 30 μL contendo a solução de DNA das sequências de captura do vírus da dengue (*Dcap*), na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A **Figura 5.13** mostra as imagens de topografia medidas por AFM do substrato de mica e das sequências *Dcap* sobre mica.

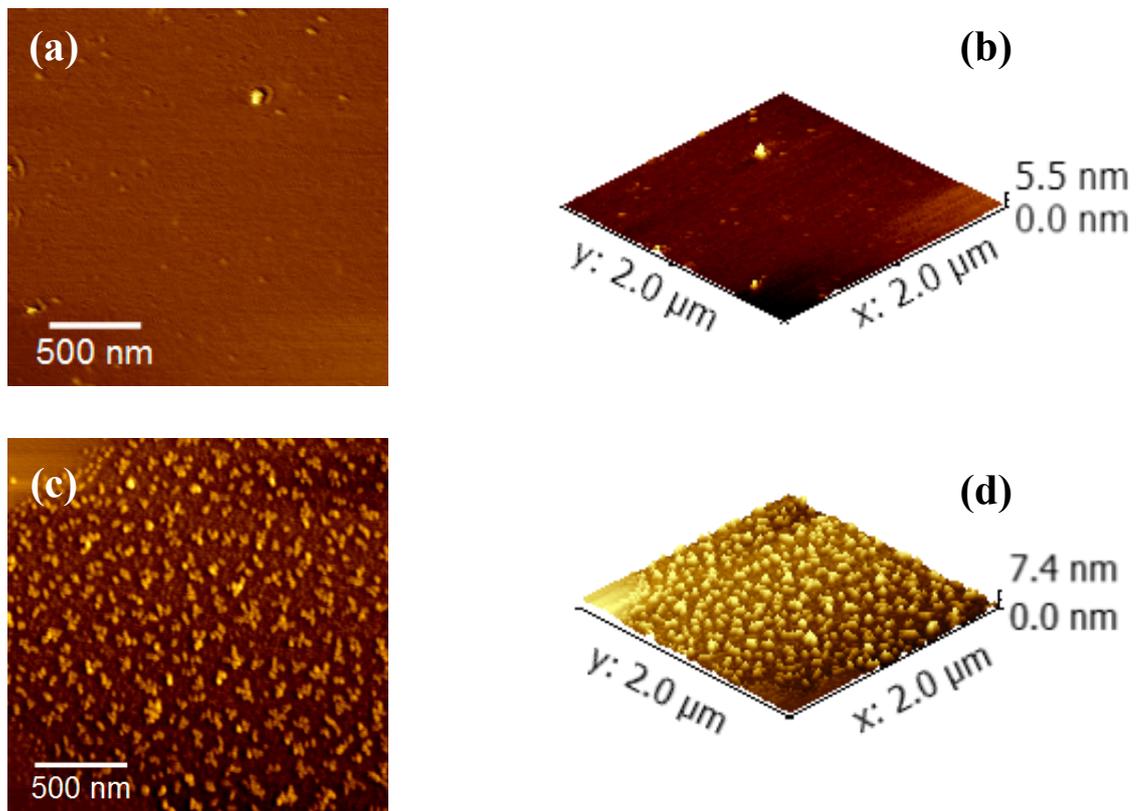


Figura 5.13 – Imagens de topografia por microscopia de força atômica das sequências de captura *Dcap* depositadas sobre mica: **(a)** mica vazia; **(b)** mica vazia em 3D; **(c)** *Dcap* depositado sobre mica; **(d)** *Dcap* depositado sobre mica em 3D. Imagens tratadas no *software Gwyddion* versão 2.42.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a fabricação, caracterização dos eletrodos evaporados de Au-PET e o projeto de sequências de DNA, foram construídos três genossensores para detecção de sequências virais que identificam os vírus da zika e da dengue. Como sugerido nas seções iniciais, os biossensores desenvolvidos neste trabalho tem como objetivo detectar produtos da reação em cadeia da polimerase (PCR) provenientes de amostras reais. Até o momento da redação deste

trabalho foram realizadas as otimizações e caracterizações dos biossensores com sequências de DNA sintético, que demonstraram condições favoráveis para detecção de produtos da PCR, cujos resultados serão apresentados nos próximos capítulos 6 e 7.

6 BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE DNA DE ZIKA E DENGUE EM CÉLULA ELETROQUÍMICA

6.1 Introdução

Os dois primeiros biossensores, descritos neste capítulo, utilizaram os eletrodos Au-PET de trilha única funcionando como eletrodo de trabalho em uma célula eletroquímica de três eletrodos e foram usados para detecção de sequências de DNA que identificam a zika e a dengue. Visto que o sistema de três eletrodos em uma célula é bem conhecido e estável, utilizou-se esta configuração para estudar diversos parâmetros de otimização nos biossensores como: temperatura, tempos de imobilização da sonda de captura, bem como a reação de hibridização com as sequências alvo.

6.2 Descrição da configuração experimental

Nos dois primeiros biossensores o eletrodo de uma trilha (Au-PET), área de $0,20 \text{ cm}^2$, foi utilizado como eletrodo de trabalho, a Pt em espiral (área de $0,20 \text{ cm}^2$) como contraeletrodo e como referência um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$). Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas a 25°C em uma célula de vidro Pyrex de compartimento único com volume de 15 mL. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato *Autolab* PGSTAT 12, controlado pelo software GPES 4.9 para as medidas de voltametria e pelo FRA 4.9 para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica. A **Figura 6.1** ilustra a configuração utilizada para os experimentos nos dois primeiros biossensores em célula eletroquímica.



Figura 6.1 - Configuração experimental para os biossensores na célula eletroquímica: (a) célula eletroquímica com volume de 15 mL; (b) eletrodo Au-PET de uma trilha como eletrodo de trabalho, contraeletrodo de Pt em espiral e eletrodo de referência Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As etapas de imobilização da sequência de captura, hibridização e medidas eletroquímicas foram realizadas com delimitação da área eletroativa. Para os processos com temperatura controlada foi utilizada uma câmara térmica por fluxo de ar (*Termo-Shake*) com termostato e controle de tempo, como ilustra a **Figura 6.2a**. Recipientes contendo água ultrapura, **Figura 6.2b**, foram colocados dentro da câmara para manter a atmosfera úmida e evitar a evaporação das soluções durante os períodos de imobilização e hibridização.



Figura 6.2 - (a) Câmara térmica por fluxo de ar (*Termo-Shake*) com termostato e controle de tempo para o processo de imobilização e hibridização da sequências. (b) Soluções com DNA depositadas nos eletrodos e recipientes contendo água ultrapura destinados a manter a atmosfera úmida e evitar a evaporação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.1 Imobilização de sequências de captura nos eletrodos

Antes da imobilização das sequências de captura os eletrodo foram eletroquimicamente polidos por voltametria cíclica em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, primeiramente com potencial entre 0 e 1,8 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de varredura de 500 mVs^{-1} (30 ciclos), e em seguida, entre 0 e 1,6 V (vs Ag /AgCl), a uma velocidade de 100 mVs^{-1} (10 ciclos). Para imobilização, $30 \mu\text{L}$ de solução contendo a sequência de captura do vírus na concentração de $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ foi depositada na área circular reativa do eletrodo. As amostras permaneceram fechadas em câmara térmica pelo tempo e temperatura definidos em cada experimento. Após a imobilização, os eletrodos foram lavados em água ultrapura para remoção de sequências que não ancoraram na superfície do ouro por ligações covalentes. As medidas eletroquímicas foram realizadas na temperatura de 25°C após a secagem dos eletrodos em fluxo de N_2 .

6.2.2 Reação de hibridização das sequências no biossensor

Para hibridização, foram depositados na área circular reativa do eletrodo 30 μL de solução contendo a sequência alvo complementar do vírus (*Zamp ou Damp*) em uma faixa de concentrações preparadas em tampão (PB 0,05 mol L^{-1} + NaCl 0,2 mol L^{-1} pH 7,4). Antes da hibridização a solução com essa sequência alvo (*Zamp ou Damp*) foi aquecida a 95°C por cinco minutos e resfriada rapidamente em banho de gelo. A reação de hibridização ocorreu em câmara fechada por 1,5 horas à 25°C. Após a hibridização os eletrodos foram lavados em água ultrapura para remoção de sequências que não hibridizaram com as sequências complementares. As medidas eletroquímicas foram realizadas na temperatura de 25°C após a secagem dos eletrodos em N_2 .

6.3 Biossensor para detecção de zika na célula eletroquímica

6.3.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica e circuito equivalente

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) consiste na aplicação de um potencial com variação de frequências e na medida da impedância. Por esse método o sistema eletroquímico é modelado como um conjunto composto de capacitor, indutor e resistor cuja mudança de resposta em função da frequência revela os mecanismos eletroquímicos envolvidos. O circuito equivalente proposto por Randles,⁸¹ esquematizado na **Figura 6.3a**, representa muito bem os mecanismos que ocorrem em um biossensor eletroquímico de DNA do tipo *label-free*,⁸⁴ como utilizado nos eletrodos Au-PET. Este circuito é composto por uma resistência ôhmica devida ao eletrólito (R_{Ω}), a impedância de Warburg (R_w), resultante da difusão de íons do eletrólito para a interface do eletrodo e a capacitância da dupla camada (C_{dc}). A resistência de transferência de carga (R_{ct}) pode ser considerada quando o eletrólito contém espécies redox como o par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

O gráfico mais usual para o estudo dos sistemas eletroquímicos utilizando EIS é denominado gráfico de Nyquist que relaciona as componentes imaginária (Z'') e real (Z') da impedância, representado na **Figura 6.3b**. O valor de R_{ct} é determinado pelo diâmetro do semicírculo formado no diagrama de Nyquist, obtido dos valores das componentes da impedância.

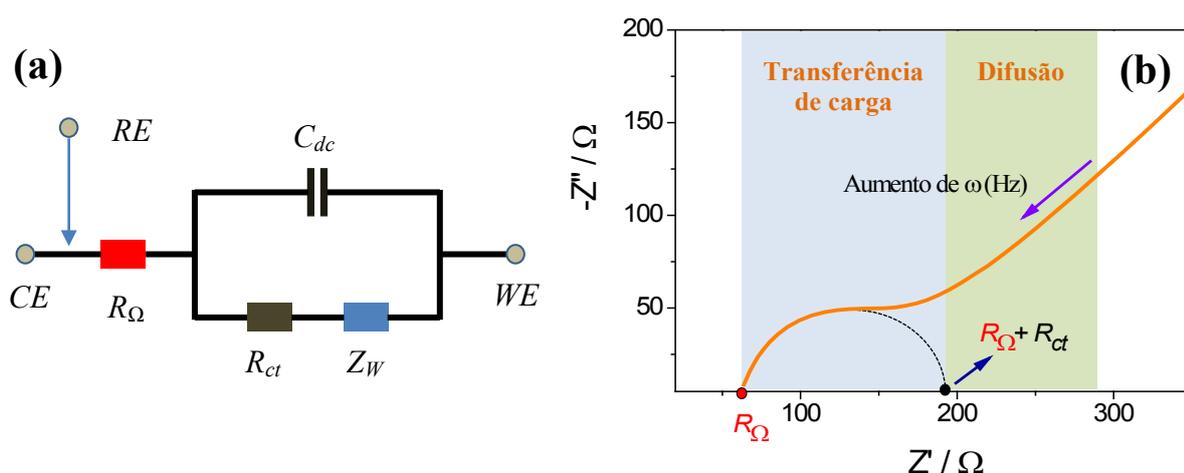


Figura 6.3 - (a) Circuito equivalente proposto para o sistema Au-PET com imobilização de DNA de captura. Sendo, *RE*: eletrodo de referência, *CE*: contraeletrodo, *WE*: eletrodo de trabalho, R_{Ω} : resistência do eletrólito, R_{ct} : resistência de transferência de carga, Z_w : impedância de Warburg e C_{dc} : capacitância da dupla camada; (b) Diagrama de Nyquist típico da impedância complexa (Z'') em função da impedância real (Z'). R_{ct} determinada pelo diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O diagrama de Nyquist exibe duas regiões importantes para as reações na superfície do eletrodo sólido, ilustradas na **Figura 6.3b**. O semicírculo obtido pela modulação de altas frequências descreve os processos de transferência de elétrons, enquanto a região linear, em baixas frequências contém informação sobre o transporte de massa das espécies redox na interface eletrólito e eletrodo. O modelo de Randles é o mais adequado para modelar os biossensores de DNA quando os gráficos de Nyquist na EIS apresentam semicírculos únicos como o exemplo da **Figura 6.3b**. Além disso, estudos⁸¹ mostram que o parâmetro R_{ct} é sensível aos eventos de ligação biomolecular em eletrodos modificados com DNA. Portanto, foi adotado como principal parâmetro de investigação na técnica EIS a R_{ct} que foi usada para avaliar as etapas de limpeza, imobilização da sequência de captura (Z_{cap}) e hibridizações da sequência complementar (Z_{amp}) e não complementares (D_{amp}).

A **Figura 6.4** mostra o diagrama de Nyquist típico dessas três etapas no biossensor Au-PET funcionalizado com sequências de DNA sintético correspondente ao vírus da zika. A curva correspondente ao eletrodo sem nenhuma funcionalização (Au-PET) limpo foi desenhada em linha contínua preta (a), a etapa de imobilização representada por círculos abertos (b), e a hibridização de Z_{cap} com Z_{amp} por círculos cheios (c). A resistência do eletrólito para esta medida foi de ($R_{\Omega}=40 \pm 2$) Ω . Nesse exemplo ilustrativo da **Figura 6.4** o eletrodo Au-PET limpo apresentou uma $R_{ct}=(260 \pm 12)$ Ω , após a imobilização da sequência de captura (Z_{cap}) a $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$, durante 6 horas a 45°C , a resistência de transferência de carga teve um aumento de mais de sete vezes ($R_{ct}=1850 \pm 86$) Ω e após a hibridização com

sequência complementar (Z_{amp}) a 38 nmol L^{-1} houve o decréscimo da resistência de transferência de carga ($R_{ct}=570 \pm 8 \text{ } \Omega$), valor duas vezes maior do que a impedância inicial do eletrodo limpo.

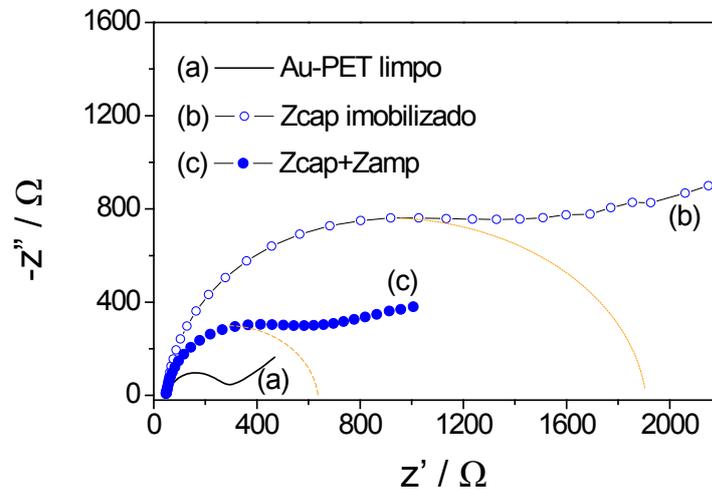


Figura 6.4 - Diagrama de Nyquist representando o comportamento da impedância durante as três etapas de construção do biossensor para zika: **(a)** eletrodo limpo, curva em linha sólida preta; **(b)** imobilização da sequência de captura (Z_{cap}), pontos abertos (\circ) e **(c)** hibridização, círculos cheios (\bullet). Imobilização de $0,40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de Z_{cap} durante 6 horas a 45°C e concentração de Z_{amp} de 38 nmol L^{-1} . EIS tomada nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A hipótese para o decréscimo da resistência de transferência de cargas após a hibridização pode ser atribuída à nova conformação da estrutura secundária da dupla-fita. Gebala e Schuhmann¹³¹ interpretaram o comportamento da diminuição da R_{ct} e atribuem a mudança da conformação à polarização da interface do eletrodo durante as medidas de impedância. Tipicamente a EIS para detecção de DNA é medida na presença do par redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ negativamente carregado. A taxa de transferência do marcador redox, a qual determinará o valor da R_{ct} , não só é influenciada pela acumulação de cargas negativas adicionais, mas também pelo bloqueio físico da superfície do eletrodo causado pela dobradura do ssDNA. Essa dobradura ocorre devido à atração eletrostática entre a superfície polarizada positivamente e os grupos fosfato da cadeia, carregados negativamente. A ação do campo elétrico imposto durante as medidas de EIS pode atrair para a superfície do eletrodo regiões das sequências de ssDNA de captura (Z_{cap}) carregadas negativamente. Após a hibridização, as duplas-fitas de DNA formadas adquirem maior rigidez ao dobramento causado pela atração eletrostática e dependendo da fração da superfície liberada após a hibridização mesmo um decréscimo de R_{ct} pode ser observado.

A hipótese de decréscimo da R_{ct} também se apoia em um estudo realizado por Elshafey *et al.*¹³² no qual um biossensor impedimétrico de DNA utilizou a anatoxina (ATX), uma neurotoxina encontrada em cianobactérias, para alterar a conformação da sequência. Nesse caso, a ATX associa com a sequência livre induzindo um empacotamento globular na extremidade livre que, em consequência, abre sítios para transferência de carga. O efeito é então usado para quantificar a concentração de ATX na amostra. O estudo apresenta os resultados baseados em medidas eletroquímicas de CV, EIS e DPV.

Para conferir maior rigor à interpretação das mudanças na estrutura secundária da sequência de DNA nos biossensores que apresentem esse comportamento é sugerida a simulação computacional utilizando como parâmetros: a sequência de bases, a temperatura, a força iônica do meio, a concentração das biomoléculas imobilizadas e hibridizadas, o campo elétrico exercido nos eletrodos, dentre outros fatores. Até a redação deste trabalho não foi encontrado na literatura um estudo que explorasse essas questões, que ainda se encontram em aberto para o entendimento e interpretação da hipótese do decréscimo da R_{ct} após a hibridização. Vale comentar que são encontrados inúmeros trabalhos na literatura sobre biossensores de DNA que reportam o aumento progressivo de R_{ct} nas duas etapas, imobilização e hibridização. Principalmente quando a sequência alvo possui funcionalização com algum tipo de marcador, nesses casos, o efeito de bloqueio à transferência de cargas na superfície prevalece sobre os efeitos da conformação da estrutura secundária do DNA.

No biossensor para zika a imobilização das sequências de captura foi realizada, sem a utilização de intercalantes moleculares como o mercaptohexanol (MCH). Essa estratégia teve como objetivo simplificar as etapas de construção do biossensor e já foi apresentada na literatura como no biossensor proposto por Carpini *et al.*¹³³ que utilizou SAMs de tiol-DNA na presença e ausência do espaçador MCH. Nesse estudo a curva de calibração para os dois casos mostra crescimento semelhante da corrente, medida por DPV, dependente da concentração da sequência alvo. No estudo de Carpini foram apresentadas as curva analíticas, corrente *versus* concentração de DNA do biossensor, sem a utilização do MCH, que mostraram diferenças médias de 6 μA , a menos, quando comparada com as medidas no biossensor tiol-DNA+MCH. O trabalho mostra também que a configuração mais simples com tiol-DNA apresenta resultados confiáveis para concentrações acima de 10 nmol L^{-1} na detecção da sequência alvo. No mesmo trabalho uma curva de calibração para concentrações entre 0,12 e 1230 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mostra que o biossensor entra em saturação a partir de 200 nmol L^{-1} da sequência alvo. O que sugere uma janela analítica de concentração entre 10 e 200 nmol L^{-1} para esse tipo de SAMs somente com tiol-DNA.

No biossensor para zika, observou-se qualitativamente durante os experimentos que o efeito de queda na impedância tem relação com a eficiência de imobilização covalente das sequências alvo, dado não quantificado, pois nas imobilizações que utilizaram soluções de captura armazenadas por mais de duas semanas o efeito da redução de R_{ct} na hibridização foi menor do que o resultado apresentado na **Figura 6.4**. A eficiência da imobilização diminui porque a redução da ligação S-S nos oligonucleotídeos não é permanente e com o passar do tempo ocorre novamente a religação entre as sequências. Reconhecendo esse efeito passou-se a realizar a imobilização no mesmo dia do processo de redução por ditioneitol.

As medidas de voltametria cíclica para as etapas do biossensor de detecção da zika, **Figura 6.5**, tomadas no mesmo eletrodo utilizado para as medidas de EIS da **Figura 6.4**, exibiram um pico de corrente anódico de 308 μA no eletrodo limpo, após a imobilização de *Zcap* caiu para 44 μA e depois da hibridização voltou a subir para o valor de 241 μA . Este comportamento está condizente com os resultados das medidas de EIS, o que confirma o efeito de maior bloqueio da transferência de cargas na imobilização e a liberação parcial após o evento da hibridização.

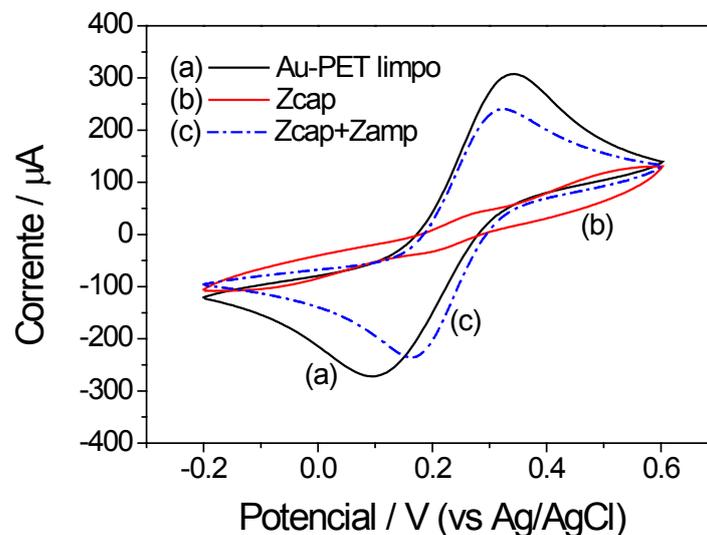


Figura 6.5 - Voltametria cíclica das etapas de construção do biossensor para sequências de zika: **(a)** eletrodo limpo, curva em linha preta; **(b)** imobilização da sequência de captura (*Zcap*), curva em vermelho e **(c)** hibridização, curva azul pontilhada. Imobilização de $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *Zcap* durante 6 horas a 45°C e concentrações de *Zamp* de 38 nmol L^{-1} . Velocidade de varredura de 100 mV/s e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A construção de biossensores de DNA requer a otimização de diversos parâmetros, como concentração, tempo e temperatura de imobilização das sondas, uso de intercalantes moleculares, dentre outros. Os ensaios de todos os fatores aumentam dramaticamente o número de experimentos a ponto de tornar inviável sua execução. Nos biossensores

desenvolvidos neste trabalho foram utilizados para ensaios de otimização três parâmetros: tempo de imobilização, temperatura de imobilização e concentração da sequência de captura. Os demais parâmetros foram escolhidos com base na literatura.

Nesse sentido, Bettazzi *et al.*⁹⁹ reportaram um biossensor para detecção de sequências de produtos da PCR em que foram testados diversos parâmetros para a imobilização e hibridização. Para produtos da PCR relativamente longos (>100 *bp*) a melhor posição de ligação da sequência de captura com a sequências alvo foi verificada no terminal 3'. Nesse mesmo trabalho a concentração da sequência de captura foi testada na faixa de 0,01 a 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o melhor resultado ocorreu para concentrações em 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este efeito ocorre porque eletrodos com baixa densidade de sequências de captura apresentam um limitado número de sítios de biorreconhecimento, enquanto uma alta densidade pode causar interferência estérica e eletrostática entre as sequências de captura e as sequências alvo. O tempo de hibridização foi verificado em um intervalo de 5 a 60 min, e o estudo de Bettazzi indicou que a partir de 30 minutos se obtém os melhores valores de sinal. Para períodos entre 30 e 60 min, os valores ficaram em um mesmo patamar, não sofrendo queda ou elevação nos sinais medidos por DPV. Outros trabalhos na literatura relatam tempos de hibridização de 90 minutos.¹³⁴ Então, foi escolhido o tempo de 90 minutos para as reações de hibridização dos biossensores para zika.

A força iônica das soluções para imobilização tem um efeito significativo na cobertura da superfície, com aumento da taxa de quimiossorção para altas concentrações de sal. Autores postulam¹³⁵ que a repulsão eletrostática entre as fitas de DNA vizinhas é minimizada em condição de altas concentrações iônicas. O que justifica as altas concentrações salinas utilizadas nos estudos de genossensores. Giallo *et al.*¹³⁶ compararam o efeito da solução tampão na hibridização e constataram que tampões de citrato de sódio salino, largamente descritos na literatura não apresentam vantagem evidente em relação ao tampão PB para as reações de hibridização.

6.3.2 Tempo de imobilização das sondas de captura *Zcap*

Os parâmetros de otimização da etapa de imobilização no biossensor para zika foram monitorados pelas diferenças na R_{ct} entre a etapa final e inicial (ΔR_{ct}). Esta relação é necessária para comparação de dados de diferentes eletrodos uma vez que a R_{ct} do eletrodo limpo e imobilizado pode diferir entre eletrodos e o valor absoluto de R_{ct} não é válido a título de comparação entre eletrodos. Portanto, a utilização do valor relativo de ΔR_{ct} é necessário

para maior consistência entre triplicatas. O efeito do tempo de imobilização das sequências de captura (Z_{cap}) foi avaliado pela EIS em um intervalo de 1 a 16 horas, **Figura 6.6**.

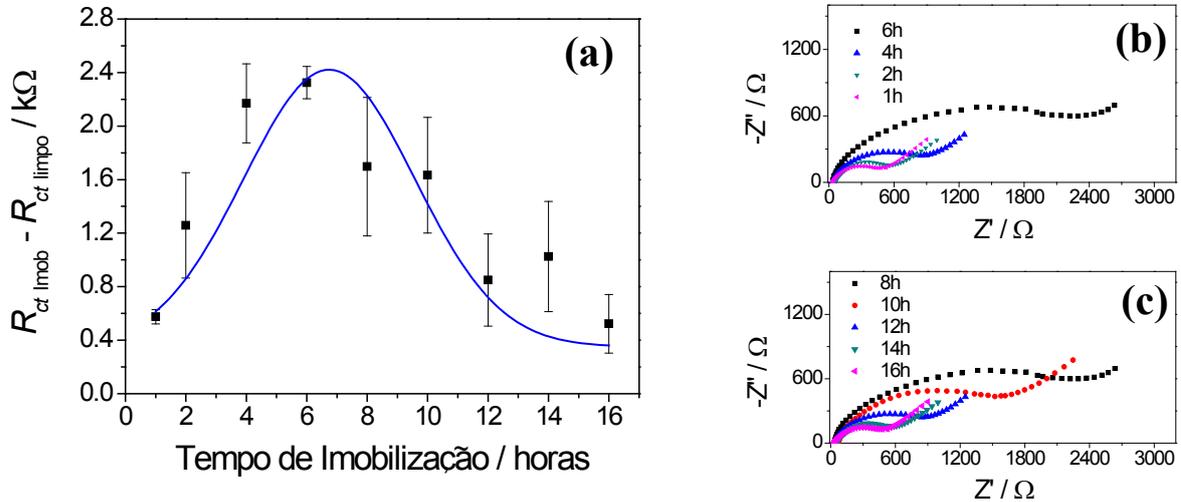


Figura 6.6 - Efeito do tempo de imobilização das sequências de captura: **(a)** diferenças entre as resistências de transferência de carga no eletrodo com Z_{cap} imobilizado e no eletrodo limpo ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ Imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$). Função de melhor ajuste aos pontos de ΔR_{ct} em azul: $R^2=0,930$, gaussiana versão da área. EIS tomada em três eletrodos ($n=3$) nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ em PB 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4; **(b)** e **(c)** diagramas de Nyquist após a imobilização de Z_{cap} nos tempos indicados em **(a)**.

Fonte: Elaborada pelo autor

A incubação para essa imobilização foi realizada a 25°C na concentração de Z_{cap} em 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O efeito do tempo foi quantificado pela diferença entre a resistência de transferência de carga no biossensor com Z_{cap} imobilizado e limpo ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ Imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$). O ΔR_{ct} aumentou até o ponto máximo em 6 horas e caiu a partir deste pico até o último tempo medido de 16 horas, sugerindo que o melhor período de incubação para imobilização dessa sequência de captura é de 6 horas.

A função de melhor ajuste para os pontos da curva, $R^2=0,930$, foi obtida utilizando o software *Origin 8.0*. A linha de ajuste da **Figura 6.6** corresponde à função gaussiana versão da área (do inglês, *Area version of Gaussian Function*), cuja equação representativa é expressa em (6.1).

$$y = y_0 + \frac{A}{\sigma \sqrt{\pi/2}} \cdot e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{\sigma^2}} \quad (6.1)$$

onde: y é a variável dependente (ΔR_{ct}); x a variável independente (tempo); y_0 o valor da linha de base; x_c o ponto de máximo; σ o desvio padrão da gaussiana; A a área sobre a curva. Os

ajustes dos pontos nas demais figuras dos capítulos 6 e 7 foram realizados seguindo o mesmo procedimento. Para concisão do texto serão apresentados nos próximos resultados somente os valores de R^2 e os nomes das respectivas funções de ajuste.

6.3.3 Temperatura de imobilização das sondas de captura *Zcap*

O efeito da temperatura na imobilização de *Zcap* também foi avaliado por EIS nas temperaturas de 4, 25, 35, 45 e 55°C, tomando como parâmetro, novamente, as diferenças entre as resistências de transferência de carga. O tempo de incubação adotado foi de 6 horas, definido anteriormente como melhor período de imobilização, na concentração de *Zcap* em 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A **Figura 6.7a** mostra a dependência da transferência de carga com a temperatura nos eletrodos imobilizados com *Zcap*.

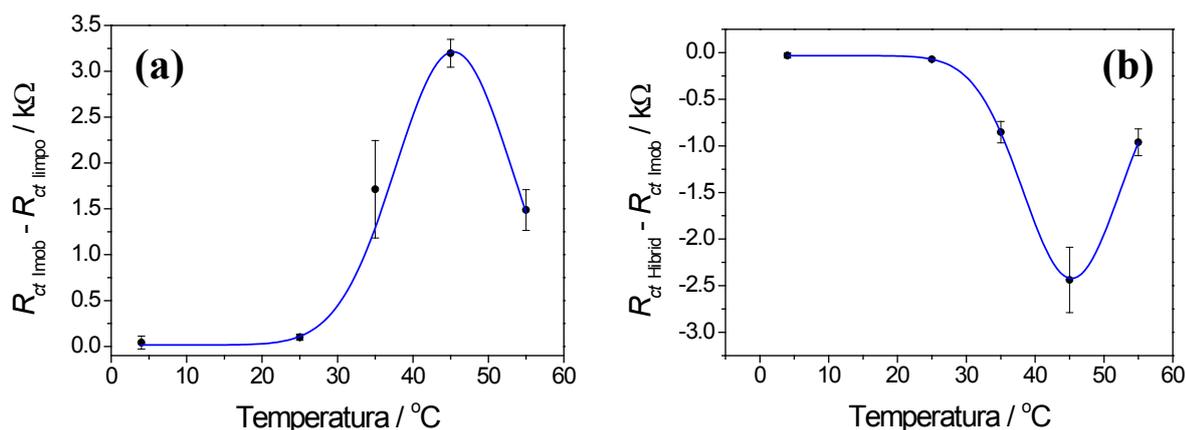


Figura 6.7 - Efeito da temperatura na imobilização das seqüências de captura (*Zcap*): **(a)** tomado como diferenças entre as resistências de transferência de carga no eletrodo com *Zcap* imobilizado e no eletrodo limpo ($\Delta R_{ct} = R_{ct}^{Imob} - R_{ct}^{limpo}$). **(b)** diferenças entre as resistências de carga hibridizado e imobilizado ($\Delta R_{ct}^H = R_{ct}^{Hibrid} - R_{ct}^{Imob}$). Hibridização realizada a 25°C durante 1,5 horas, *Zamp* em 0,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$. EIS tomada em três eletrodos ($n=3$) nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV. Eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L^{-1} em PB 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Função de ajuste: *Amplitude version of Gaussian peak function*, (a) $R^2 = 0,992$ e (b) $R^2 = 0,999$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na imobilização dependente da temperatura o ΔR_{ct} começa a subir a partir de 25°C ($\Delta R_{ct} \sim 100\Omega$), chega ao ponto máximo em 45°C ($\Delta R_{ct} \sim 3,2 \text{ k}\Omega$) e decai até 55°C, último ponto medido. A diferença entre as transferências de carga no eletrodo hibridizado com a seqüência complementar (*Zamp*) e o eletrodo imobilizado ($\Delta R_{ct}^H = R_{ct}^{Hibrid} - R_{ct}^{Imob}$), mostrado na **Figura 6.7b** confirma o comportamento de decréscimo da R_{ct} após a hibridização. Ao serem usados os mesmos eletrodos imobilizados com *Zcap* nas diferentes temperaturas, e

hibridizá-los com *Zamp*, o perfil do ΔR_{ct}^H teve o mesmo comportamento gaussiano, mas no sentido inverso da imobilização, o que mostra que de fato, para diferentes temperaturas, houve mudança na densidade de imobilização das sequências *Zcap*. A incubação para hibridização foi realizada a 25°C durante 1,5 horas com concentração *Zamp* de 0,68 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

6.3.4 Concentrações de imobilização das sondas de captura *Zcap*

As concentrações das sequências de captura imobilizadas no eletrodo podem influenciar o processo de imobilização, devido ao efeito repulsivo entre as cadeias do DNA carregadas negativamente. Para valores altos da concentração a repulsão passa a ser preponderante sobre a ligação covalente na superfície e a eficiência da imobilização é reduzida. A **Figura 6.8** mostra um crescimento na ΔR_{ct} com a concentração.

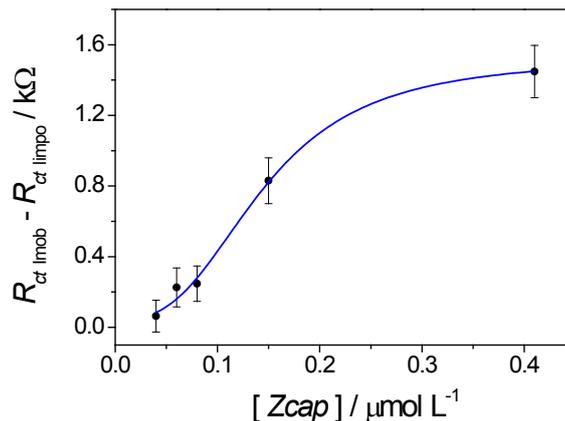


Figura 6.8 - Efeito da concentração das sequências de captura *Zcap* imobilizada no eletrodo. Tomado como as diferenças entre as resistências de transferência de carga no eletrodo imobilizado e no eletrodo limpo ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ Imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$). Imobilização a 25°C durante 6 horas e EIS tomada em três eletrodos ($n=3$) nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L^{-1} em PB 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Função de ajuste: *Logistic*, $R^2 = 0,973$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para se obter uma concentração de melhor resposta de imobilização foram avaliadas concentrações de *Zcap* entre 0,04 e 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$, faixa tomada com base na literatura.^{99-100,137-138} Novamente foi usado como parâmetro de avaliação a diferença entre as resistências de transferência de carga no eletrodo imobilizado e limpo ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ Imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$). A concentração de 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi adotada como concentração para imobilização de *Zcap*, devido ao tipo de SAMs escolhido (tiol-DNA).

6.3.5 Hibridização de DNA complementar (*Zamp*) e não complementar (*Damp*)

A **Figura 6.9** mostra o comportamento da resistência de transferência de carga para hibridização com DNA complementar *Zamp* ($\Delta R_{ct}^H = R_{ct}^{Hibrid} - R_{ct}^{Imob}$), nas concentrações de 12, 25, 38, 68, 100, 150, 228, 308 e 340 nmol L^{-1} . As sequências de captura *Zcap* foram imobilizadas nos melhores parâmetros definidos nos experimentos de otimização (45°C por 6h a $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os pontos tomados em três eletrodos distintos mostram o decréscimo da R_{ct} diretamente proporcional ao aumento da concentração de *Zamp* nessa faixa estudada. Como teste de seletividade, as sequências não complementares (*Damp*), nas concentrações de 51 e 130 nmol L^{-1} , foram colocadas para hibridizar nos eletrodos funcionalizados com *Zcap*, sob as mesmas condições das sequências complementares.

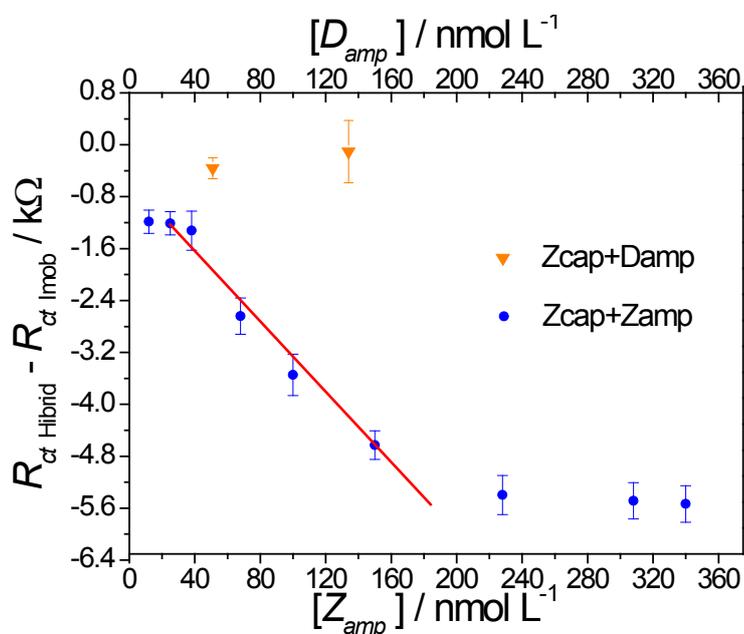


Figura 6.9 - Comportamento da resistência de transferência de carga ($\Delta R_{ct}^H = R_{ct}^{Hibrid} - R_{ct}^{Imob}$) *Zcap* imobilizado, hibridização com *Zamp* (●) concentrações de 12, 25, 38, 68, 100, 150, 228, 308 e 340 nmol L^{-1} e hibridização com *Damp* (▼) nas concentrações de 51 e 130 nmol L^{-1} . Imobilização de $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência de captura (*Zcap*) durante 6 horas a 45°C . EIS tomada em três eletrodos ($n=3$) nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os gráficos de Nyquist comparativos das hibridizações complementares (*Zcap* + *Zamp*) são mostrados na **Figura 6.10a**, enquanto as hibridizações não complementares (*Zcap* + *Damp*) na **Figura 6.10b**.

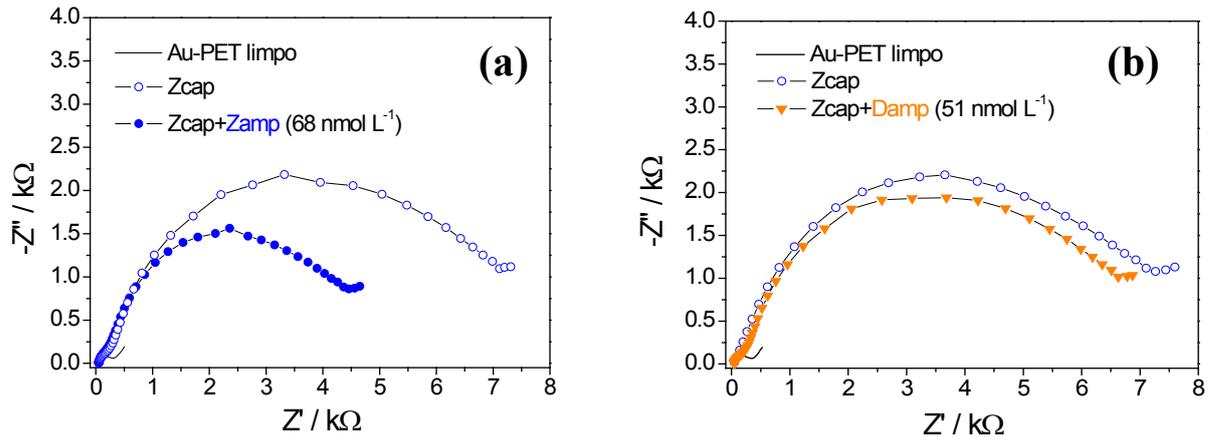


Figura 6.10 – Gráfico de Nyquist comparativo para as hibridizações: **(a)** seqüências de captura *Zcap* hibridizada com seqüência complementar *Zamp* (●) concentração 68 nmol L⁻¹ e **(b)** seqüência de captura *Zcap* hibridizada com seqüência não complementar *Damp* (▼) na concentração de 51 nmol L⁻¹. Imobilização de 0,40 μmol L⁻¹ de *Zcap* durante 6 horas a 45°C. EIS tomada nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em PB 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A **Figura 6.10a**, mostra o decrescimento da resistência de transferência de carga após a hibridização complementar [$\Delta R_{ct}^H = R_{ct \text{ Hibrid}} - R_{ct \text{ Imob}} = (-2,62 \pm 0,28) \text{ k}\Omega$]. A hibridização não complementar de *Zcap* com *Damp*, **Figura 6.10b**, resultou em um pequeno decrescimento [$\Delta R_{ct}^H = R_{ct \text{ Hibrid}} - R_{ct \text{ Imob}} = (-0,25 \pm 0,16) \text{ k}\Omega$], dez vezes menor do que a hibridização com a seqüência complementar. O que mostra a seletividade do biossensor pelas seqüências complementares de zika.

Com base nos dados da ΔR_{ct}^H mostrados na **Figura 6.9**, o limite de detecção inferior (LOD) do biossensor Au-PET para detecção de seqüências de zika foi calculado primeiramente pela regra da IUPAC, relação (6.2):

$$LOD_{IUPAC} = \frac{3 \times SD}{b} \quad (6.2)$$

Sendo *b* a inclinação da reta de melhor ajuste aplicada à região linear da curva ΔR_{ct}^H versus *C* de *Zcap*; *SD* = 69,4 kΩ o desvio padrão do branco ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ Imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$), medido em oito eletrodos. O coeficiente de correlação na região linear da **Figura 6.9**, foi de $R^2 = 0,966$ com inclinação $b = -21,1 \pm 1,9$. Assim, o limite de detecção calculado com base na normativa da IUPAC para o biossensor foi: $LOD_{IUPAC} = (9,86 \pm 0,89) \text{ nmol L}^{-1}$.

Em termos gerais, o limite de detecção de um analito pode ser descrito como aquela concentração a qual fornece um sinal instrumental significativamente diferente do sinal de branco, ou medida na ausência do analito. Segundo Miller e Miller,¹³⁹ ainda não existe uma completa concordância entre pesquisadores, editores, profissionais e organizações

regulamentadoras sobre o critério ideal para o cálculo do limite de detecção. Entretanto, esses autores ponderam que existe uma tendência crescente para definir o limite de detecção como sendo a concentração do analito que fornece um sinal igual ao sinal do branco mais três vezes o desvio padrão do branco, como expressa a equação (6.3):

$$LOD_{Miller} = Y_{branco} + 3.SD \quad (6.3)$$

Para a curva analítica da **Figura 6.9**: $Y_{branco} = 111,6 \text{ k}\Omega$ a diferença entre as resistências de transferência de carga no eletrodo imobilizado e no eletrodo limpo ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$); $SD = 69,4 \text{ k}\Omega$ o desvio padrão do branco, medidos em oito eletrodos. O coeficiente de correlação na região linear da curva foi de $R^2 = 0,966$ com coeficiente de inclinação $b = -21,1 \pm 1,9$. Assim, o limite de detecção calculado como indicado em Miller e Miller¹³⁹ foi: $LOD_{Miller} = (71,7 \pm 6,2) \text{ nmol L}^{-1}$.

Como mostrado, o cálculo pelos dois critérios resulta em limites de detecção de valores diferentes. No biossensor para zika os resultados dos dois critérios não diferem significativamente, pois os limites estão na ordem de grandeza $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ para a concentração. Contudo, é importante considerar o critério adotado para a análise comparativa, sendo indicado explicitar o método empregado no cálculo do limite de detecção, dado relevante que em alguns trabalhos é suprimido.

A **Tabela 6.1** compara o valor obtido para o biossensor Au-PET com outros sistemas semelhantes reportados na literatura. Uma vez que os trabalhos não citam explicitamente o critério para o cálculo do LOD consideramos, a título de comparação, foi utilizado o valor do limite de detecção do biossensor para zika obtido pelo critério da IUPAC. As três referências comparadas com o presente trabalho são representativas dos genossensores baseados em eletrodos de ouro e que utilizam a técnica de EIS para detecção.

Tabela 6.1 - Limites de detecção (LOD) de biossensores eletroquímicos de DNA para sistemas de detecção *label-free* encontrados na literatura. EIS: espectroscopia de impedância eletroquímica.

Técnica de análise	Eletrodo	LOD (mol L ⁻¹)	Referência
EIS	Ouro barra	$1 \cdot 10^{-11}$	Patolsky ¹³⁴
EIS	Epóxi ouro	$1 \cdot 10^{-10}$	Zhang ¹⁴⁰
EIS	Ouro barra	$4 \cdot 10^{-11}$	Zheng ¹⁴¹
EIS	Au-PET	$9,8 \cdot 10^{-9}$	este trabalho

Fonte: Elaborada pelo autor.

O primeiro estudo, um dos pioneiros nesse tipo de biossensor, foi apresentado em 2001 por Patolsky, Lichtenstein e Willner.¹³⁴ A eficiência da EIS foi comprovada, pois a detecção das hibridizações também foi realizada com balança de cristal de quartzo. O sistema foi usado para identificar uma única mutação responsável pela doença de *Tay-Sachs*, que é uma enfermidade genética recessiva, cujos sintomas aparecem já nos primeiros anos de vida. Construído em um eletrodo de Au tipo barra esse biossensor era composto da sequência de captura e uma enzima catalizadora que foi a responsável pelo limite de detecção duas ordens de grandeza abaixo de nmol L^{-1} .

Em 2010 Zhang *et al.*¹⁴⁰ apresentaram um genossensor eletroquímico para detecção de sequências do HIV (do inglês, *human immunodeficiency virus*). O dispositivo foi fabricado com a técnica de impressão sobre um substrato de resina epóxi. Era composto de seis eletrodos de Au e respectivos eletrodos de referência de Pt, também impressos. Simultaneamente, o HIV 1 e 2 podiam ser detectados através de voltametria de onda quadrada e também por EIS. Apenas uma gota de 100 μL da amostra foi usada em cada análise. Usando a afinidade do azul de metileno com as sequências simples foi possível chegar ao limite de detecção de 0,1 nmol L^{-1} .

Mais recentemente, em 2013, Zheng e colaboradores¹⁴¹ apresentaram um genossensor somente composto pelo eletrodo de ouro do tipo barra com a sequência de captura imobilizada. Também para detecção de HIV, a sequência complementar foi composta por uma dupla sequência e a hibridização ocorreu com a formação de triplex de DNA. Devido à adição duas vezes maior de sequências alvo no evento da hibridização um aumento considerável na impedância foi obtido. Em consequência, o limite de detecção foi duas ordens de grandeza abaixo de nmol L^{-1} . O biossensor apresentou um comportamento logarítmico do aumento de R_{ct} em função da concentração, indicando uma saturação para detecção das sequências alvo.

Em síntese, para sistemas semelhantes ao apresentado no biossensor para zika, ou seja, composto de eletrodo de ouro, otimização da imobilização da captura e detecção por EIS, os limites de detecção ficam em torno de $10^{-1} \text{ nmol L}^{-1}$ quando se utiliza enzimas ou outro composto para aumentar o nível de sinal mensurável. O biossensor Au-PET apresentou limite de detecção comparável aos estudos da literatura uma vez que utilizou a detecção *label-free* sem nenhum composto ou enzima para intensificar o sinal.

6.4 Biossensor para detecção de dengue na célula eletroquímica

6.4.1 Descrição da configuração experimental

A configuração dos experimentos para esse biossensor seguiu a mesma configuração utilizada para o biossensor para detecção do vírus da zika. Também foi utilizada a EIS e o parâmetro R_{ct} para avaliar a otimização da imobilização e as medidas referentes à hibridização, que serão relatados a seguir.

6.4.2 Tempo de imobilização das sondas de captura *Dcap*

Para monitorar a relação entre o tempo de imobilização e a variação da impedância eletroquímica no biossensor por EIS, ilustrado na **Figura 6.11**, foi estudada a janela de tempo entre 2 e 8 horas. O tempo de maior eficiência de imobilização ocorreu em quatro horas, medida por ($\Delta R_{ct} = R_{ct \text{ Imob}} - R_{ct \text{ limpo}}$).

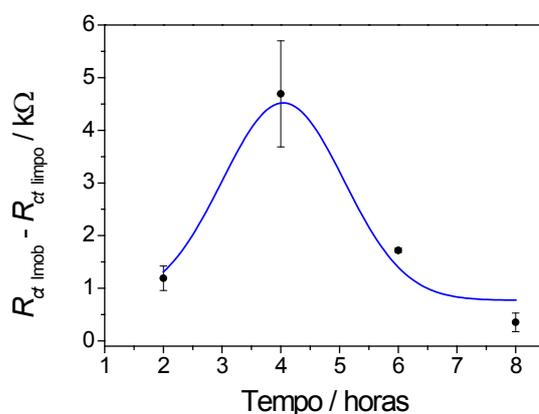


Figura 6.11 - Relação entre o tempo de imobilização e a variação da resistência de transferência de carga. *Dcap* $0,16 \mu\text{mol L}^{-1}$ imobilizado por 4h a 25°C . EIS tomada nas frequências de 30 a $0,1 \text{ kHz}$, amplitude AC de 5 mV em eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Função de ajuste: *Area version of Gaussian Function*, $R^2 = 0,898$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.3 Temperatura de imobilização das sondas de captura *Dcap*

A **Figura 6.12** ilustra o comportamento da imobilização da sonda de captura e hibridização da sequência alvo sob o efeito da temperatura. A imobilização foi realizada nas temperaturas de $4, 25, 35, 45$ e 55°C por 4,5 horas e hibridização a 45°C por 1 h.

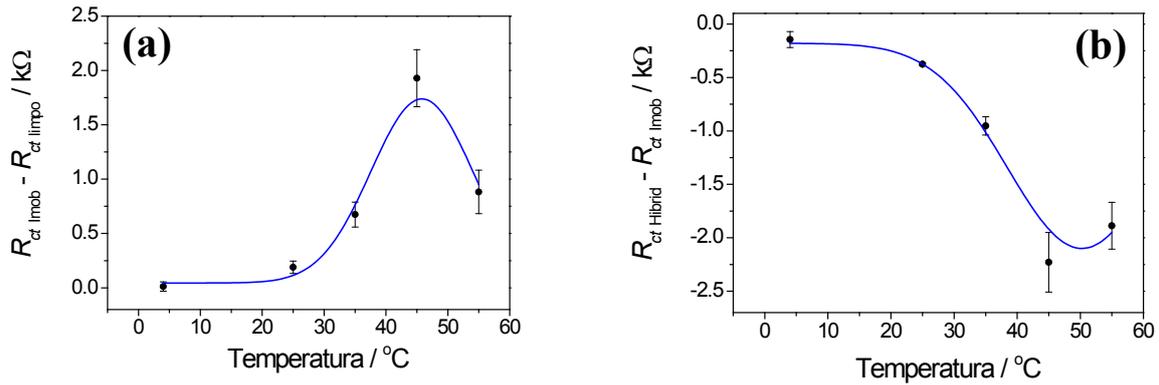


Figura 6.12 - Efeito da temperatura na imobilização e hibridização: **(a)** dependência da R_{ct} com a temperatura na imobilização, D_{cap} $0,16 \mu\text{mol L}^{-1}$; **(b)** dependência da R_{ct} na hibridização da sequência alvo, D_{amp} $0,20 \mu\text{mol L}^{-1}$ por 1h a $45^{\circ}C$. EIS tomada nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Função de ajuste: *Amplitude version of Gaussian peak function*, (a) $R^2 = 0,842$ e (b) $R^2 = 0,944$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.4 Concentrações de imobilização das sondas de captura D_{cap}

A concentração da sonda de captura foi verificada para valores entre $0,10$ a $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ imobilizada durante 5 horas a $25^{\circ}C$. O comportamento da R_{ct} pelas medidas de EIS revela um crescimento linear para essas concentrações, não ocorrendo a saturação nessa faixa estudada, como ilustra a **Figura 6.13**.

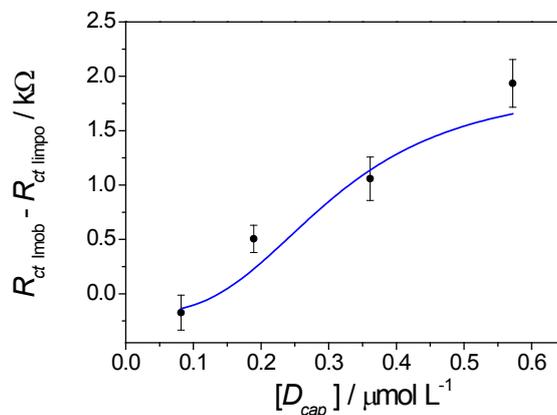


Figura 6.13 - Relação entre a concentração da sonda de captura e os valores de R_{ct} : concentrações estudadas entre $0,10$ a $0,60 \mu\text{mol L}^{-1}$ imobilizadas durante 5 horas a $25^{\circ}C$. EIS tomada nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Função de ajuste: *Logistic*, $R^2 = 0,898$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.4.5 Hibridização de DNA complementar (D_{amp}) e não complementar (Z_{amp})

Os dados para quatro concentrações de sequência complementar, como ilustra a curva de calibração da **Figura 6.14**, mostram um decrescimento linear da R_{ct} em função da

concentração da sequência alvo (*Damp*). Como explicado anteriormente no biossensor para zika, o decréscimo da R_{ct} está relacionado com o estiramento das sequências de captura ao hibridizarem com a sequência alvo, o que aumenta a taxa de transferência de carga. Como controle, neste biossensor para detectar sequências do vírus da dengue, a sequência não complementar *Zamp* na concentração de 200 nmol L^{-1} foi colocada para hibridizar com a sequência de captura *Dcap*.

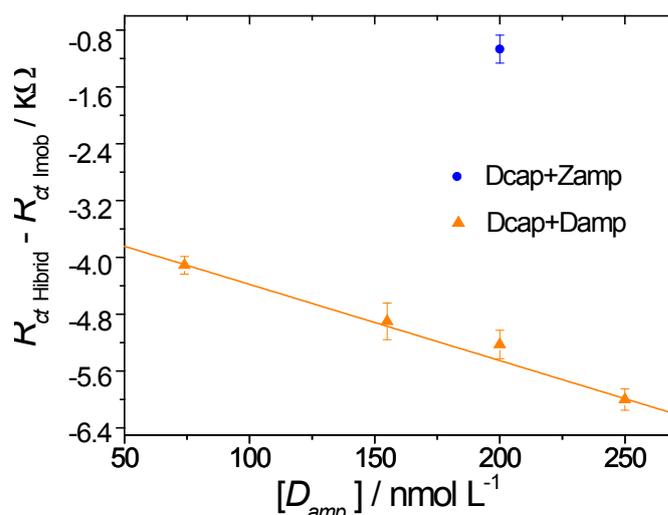


Figura 6.14 - Comportamento da resistência de transferência de carga ($\Delta R_{ct}^H = R_{ct}^{\text{Hibrid}} - R_{ct}^{\text{Imob}}$). Imobilização de $0,36 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência de captura (*Dcap*) durante 5 horas a 45°C . Hibridização com *Damp* (\blacktriangle) nas concentrações de 74, 155, 200 e 250 nmol L^{-1} e hibridização com *Zamp* (\bullet) na concentração de 200 nmol L^{-1} . EIS tomada em três eletrodos ($n=3$) nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Função de ajuste: *linear*, $R^2 = 0,998$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o cálculo do limite de detecção o desvio do branco calculado para cinco eletrodos limpos foi $SD = 56,8$ e o coeficiente de correlação na reta da **Figura 6.14**, foi de $R^2 = 0,998$ com inclinação $b = -10,7 \pm 1,1$. Assim o limite de detecção calculado, em módulo, no biossensor para dengue foi: $\text{LOD} = (15,9 \pm 1,6) \text{ nmol L}^{-1}$.

7 BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE ZIKA EM ELETRODO DE TRÊS CONTATOS (Au3-PET)

7.1 Caracterização eletroquímica do eletrodo de três contatos Au3-PET

7.1.1 Cálculo da área eletroativa do eletrodo Au3-PET na célula eletroquímica

A área eletroativa do eletrodo de três contatos (Au3-PET) foi determinada em uma célula eletroquímica, utilizando como referência um eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$) e como contraeletrodo uma espiral de Pt. Para o eletrodo de trabalho foi utilizada somente a trilha central do eletrodo Au3-PET, as outras duas tiveram os contatos isolados. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas a 25°C em uma célula de vidro Pyrex de compartimento único com volume de 15 mL. O procedimento de cálculo foi idêntico ao aplicado para determinar a área eletroativa do eletrodo Au-PET de trilha única. O voltamograma tomado no último ciclo da limpeza ácida em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ é apresentado na **Figura 7.1**.

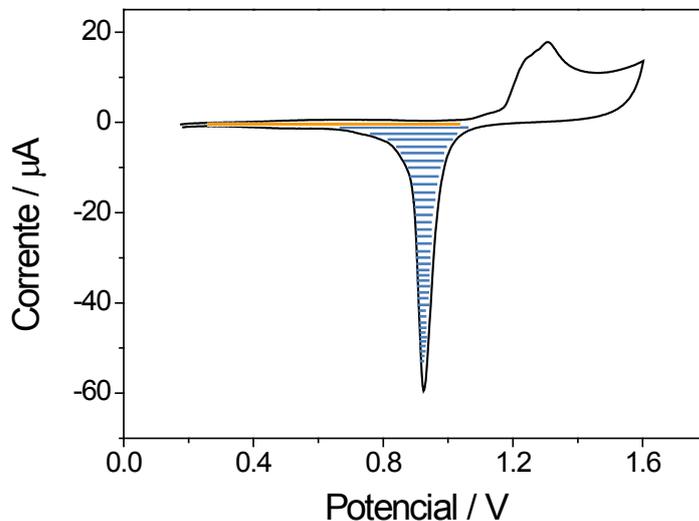


Figura 7.1 - Voltametria cíclica para o cálculo da área eletroativa dos eletrodos Au3-PET em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Fonte: Elaborada pelo autor.

O fator de rugosidade (f_R) foi então calculado pela relação entre a área eletroativa (A_{ea}) e a área geométrica (A_{gm}), como indicado na equação (7.1).

$$f_R = \frac{A_{ea}}{A_{gm}} = \frac{1}{A_{gm}} \cdot \frac{Q_m - Q_{dl}}{390 \mu [\text{C cm}^{-2}]} \quad (7.1)$$

No caso do eletrodo Au3-PET o valor médio de $Q_m - Q_{dc}$ foi de $(46,5 \pm 4,6) \mu\text{C}$, em três de eletrodos distintos. A área geométrica do eletrodo central Au3-PET ($r = 0,11 \text{ cm}$) foi calculada em $0,038 \text{ cm}^2$. Utilizou-se para os cálculos do f_R o valor de $390 \mu\text{C cm}^{-2}$ para constante experimental $e \cdot d_{as}$.¹²¹ e os valores das cargas Q_m e Q_{dc} , obtidos da integração do pico de redução do óxido de ouro e da dupla camada capacitiva, áreas hachuradas em azul e laranja, respectivamente na **Figura 7.1**. O f_R médio calculado na equação (7.2) resultou em:

$$f_R = \frac{1}{0,038 [\text{cm}^2]} \cdot \frac{46,5 \mu[\text{C}]}{390 \mu [\text{C cm}^{-2}]} = (3,13 \pm 0,31) \quad (7.2)$$

Portanto, dentro da margem de erro, bem próximo ao valor calculado para o eletrodo de uma trilha ($2,93 \pm 0,41$).

7.1.2 Voltametria cíclica do eletrodo Au3-PET no sistema de gota

Para as caracterizações fora da célula eletroquímica o eletrodo Au3-PET foi conectado ao potenciostato/galvanostato *Autolab* através de bornes de três contatos, como ilustra a **Figura 7.2**. As medidas de voltametria foram realizadas em uma gota de $60 \mu\text{L}$ na região de reação, sendo que o contato central funcionou como eletrodo de trabalho e os dois eletrodos laterais funcionaram como eletrodos de referência e contraeletrodo.

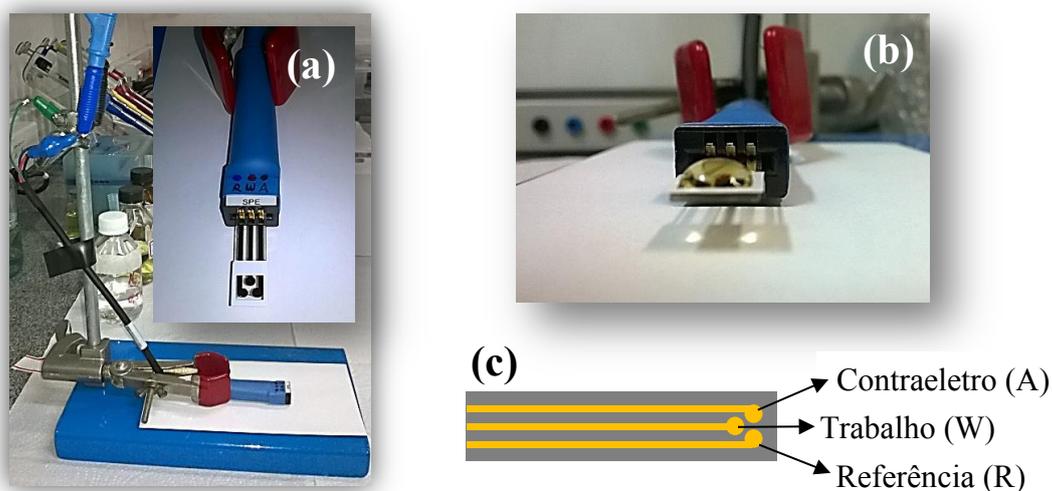


Figura 7.2 - (a) Eletrodo Au3-PET conectado ao potenciostato/galvanostato *Autolab* para medidas de voltametria cíclica e demais medidas do biossensor; (b) gota de $60 \mu\text{L}$ do eletrólito; (c) contato central, eletrodo de trabalho e contatos laterais como eletrodos de referência e contraeletrodo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os voltamogramas cíclicos dos eletrodos evaporados Au3-PET com velocidades de varredura de 10 a 400 mV s^{-1} , mostrados na **Figura 7.3a**, revelam uma menor reversibilidade quando comparados ao eletrodo Au-PET funcionando dentro da célula eletroquímica. A **Figura 7.3b** mostra que a densidade de corrente anódica (J_{pa}) depende linearmente da raiz quadrada da velocidade de varredura. Os parâmetros de reversibilidade, em 100 mV s^{-1} , foram: $\Delta E_p=(97,0 \pm 10,0)$ V e $|I_{pa}/I_{pc}|=(1,04 \pm 0,20)$.

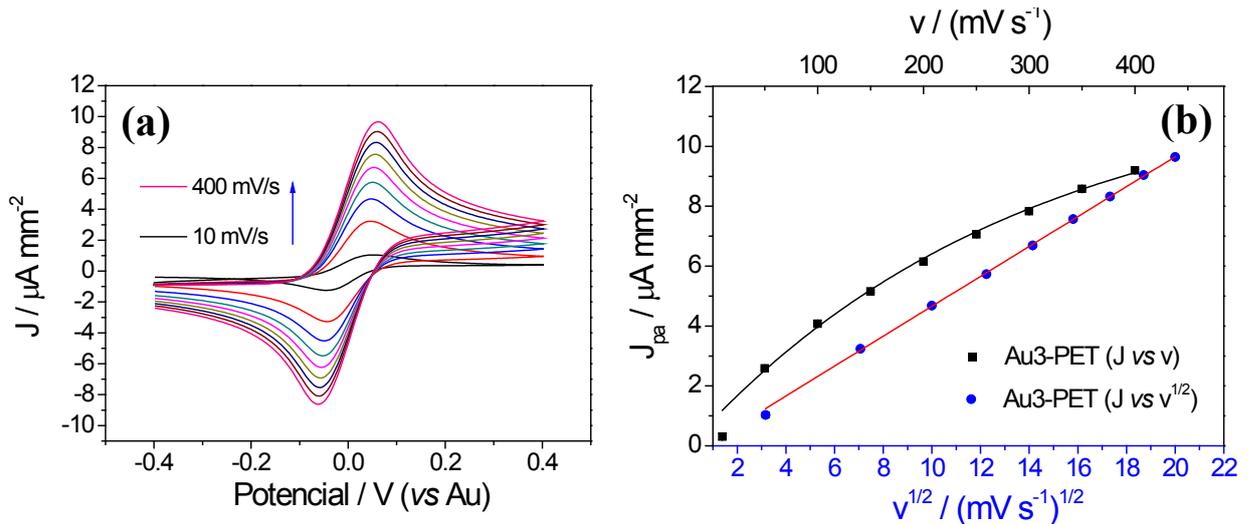


Figura 7.3 - (a) Voltamogramas do eletrodo Au3-PET com a velocidade de varredura de 10 a 400 mV s^{-1} . (b) picos de densidade de corrente anódica (J_{pa}) correspondentes às velocidades de varredura e à raiz quadrada das velocidades de varredura. Eletrólito $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 1,0 mmol L^{-1} em KCl 1,0 mmol L^{-1} pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

7.1.3 Imobilização de sequências de captura nos eletrodos

No eletrodo Au3-Pet foi construído o terceiro biossensor para detectar o DNA da zika, cujas caracterizações eletroquímicas foram realizadas no eletrodo de três trilhas fora da célula eletroquímica com soluções em volumes de 60 μL gotejadas na área de reação. Antes da imobilização das sequências, os eletrodos Au3-PET foram eletroquimicamente polidos por voltametria cíclica em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} , primeiramente com potencial entre 0 e 1,8 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de varredura de 500 mV s^{-1} (30 ciclos), e em seguida, entre 0 e 1,6 V (vs Ag/AgCl), a uma velocidade de 100 mV s^{-1} (10 ciclos). Este polimento eletroquímico foi realizado dentro da célula utilizando como referência um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L^{-1}) e como contraeletrodo uma espiral de Pt. como o eletrodo de trabalho foram utilizados os três contatos do eletrodo Au3-PET conectados em conjunto. Para imobilização, 5 μL de solução contendo a sequência de captura do vírus (*Zcap*) 0,40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em PBS 0,17 mol L^{-1} foi depositada na área circular reativa do eletrodo central. As amostras

permaneceram em câmara fechada por 5 h na temperatura de 45°C. Após a imobilização os eletrodos foram lavados em água ultrapura para remoção de sequências que não ancoraram na superfície do ouro por ligações covalentes. As medidas eletroquímicas foram realizadas na temperatura de 25°C após a secagem dos eletrodos em fluxo de N₂.

7.1.4 Reação de hibridização das sequências no biossensor

Para hibridização, 5 µL de solução contendo a sequência complementar do vírus (*Zamp*) e não complementar (*Dcap*), concentrações variadas em tampão (PB 0,05 mol L⁻¹ + NaCl 0,2 mol L⁻¹ pH 7,4), foram depositadas na área circular reativa do contato central do eletrodo. Antes da hibridização a solução do DNA alvo foi aquecida a 95°C por cinco minutos e resfriada rapidamente em banho de gelo. A reação de hibridização ocorreu em câmara fechada por 1,5 horas à 25°C. Após a hibridização os eletrodos foram lavados em água ultrapura, secos em N₂, e as medidas eletroquímicas realizadas na temperatura de 25°C em gota de 60 µL.

7.2 Hibridização de DNA complementar (*Zamp*) e não complementar (*Damp*)

A **Figura 7.4** mostra o diagrama de Nyquist das três etapas no biossensor Au₃-PET funcionalizado com sequências de captura do vírus da zika (*Zcap*).

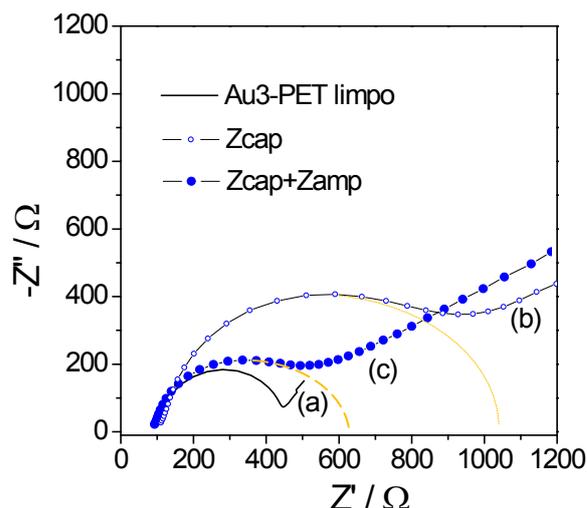


Figura 7.4 - Diagrama de Nyquist representando o comportamento da impedância durante as três etapas de construção do biossensor Au₃-PET: (a) eletrodo limpo, linha sólida preta; (b) imobilização da sequência de captura (*Zcap*), círculos abertos (○) e (c) hibridização com *Zamp*, círculos azuis cheios (●). Medidas de EIS realizadas em gota de 60 µL com frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV. Eletrólito de suporte [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em PB 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A curva correspondente ao eletrodo sem nenhuma funcionalização (Au3-PET) limpo foi desenhada em linha contínua preta **(a)**, a etapa de imobilização representada por círculos abertos **(b)** e da hibridização por círculos cheios **(c)**. No resultado da **Figura 7.4** o eletrodo Au3-PET limpo apresentou uma $R_{ct}=(367 \pm 15) \Omega$, após a imobilização de $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ da sequência de captura ($Zcap$) a resistência de transferência de carga teve um aumento de duas vezes ($R_{ct}=970 \pm 28) \Omega$ e após a hibridização com 130 nmol L^{-1} da sequência complementar ($Zamp$) houve o decréscimo ($R_{ct}=590 \pm 22) \Omega$, mas ficando maior do que a impedância inicial do eletrodo limpo. A resistência do eletrólito foi de ($R_{\Omega}=99 \pm 4) \Omega$ e o comportamento da R_{ct} foi o mesmo para as demais concentrações das sequências complementares estudadas neste sistema do eletrodo Au3-PET.

As medidas de voltametria cíclica para as etapas do biossensor Au3-PET para detecção de sequências da zika no sistema de gota confirmam o comportamento observado na EIS para as três etapas: eletrodo limpo, imobilização e hibridização com sequência complementar, voltamograma mostrado na **Figura 7.5**. O pico de corrente inicial de $58,7 \mu\text{A}$ no eletrodo limpo diminuiu para $11,8 \mu\text{A}$ após a imobilização de $Zcap$ e depois da hibridização com $Zamp$, na concentração de 130 nmol L^{-1} , voltou a subir para $36,8 \mu\text{A}$.

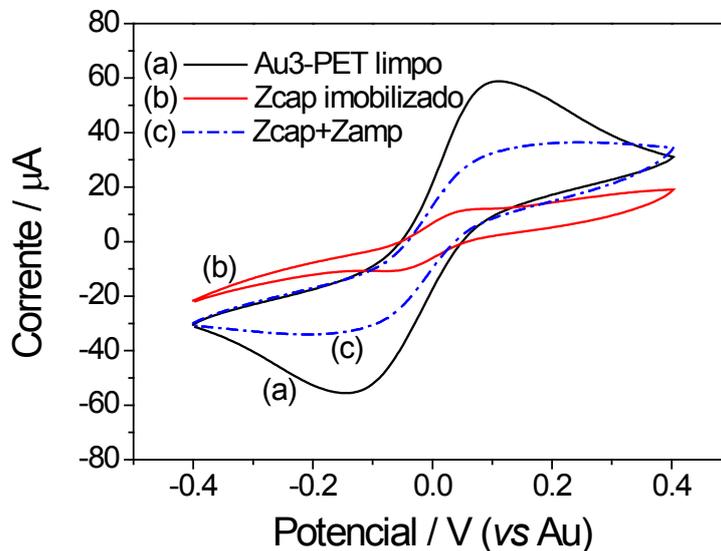


Figura 7.5 – Voltametria cíclica das etapas de construção do biossensor Au-3PET no sistema de gota: **(a)** eletrodo limpo, curva em linha preta; **(b)** imobilização da sequência de captura ($Zcap$), curva em vermelho e **(c)** hibridização, curva azul pontilhada. Imobilização de $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de $Zcap$ durante 6 horas a 45°C e concentrações de $Zamp$ de 130 nmol L^{-1} . Voltamograma realizado em uma gota de $60 \mu\text{L}$ sobre o eletrodo impresso com velocidade de varredura de 100 mV/s e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outra técnica usada com frequência para caracterização de biossensores de DNA é a voltametria de pulso diferencial (do inglês, *differential pulse voltammetry* - DPV). A DPV utiliza uma rampa linear voltamétrica composta de uma série regular de pulsos de potencial. Consequentemente, a corrente é medida imediatamente antes de cada mudança de potencial. Desse modo, o efeito da corrente de carga é minimizado e possibilita maior sensibilidade nas medidas quando comparada com a voltametria cíclica. A sequência de pulsos de potencial, com duração aproximada de 50 ms, é aplicada no eletrodo de trabalho. Logo após, a aplicação do pulso, a corrente de carga decai exponencialmente para valores desprezíveis, enquanto a corrente faradaica decai mais lentamente. Assim, uma discriminação entre a corrente de carga é obtida e os resultados no voltamograma consistem em picos de corrente, cuja altura é diretamente proporcional ao analito. A DPV permite a quantificação conveniente¹⁴² de concentrações até 10^{-8} mol L⁻¹. A **Figura 7.6** mostra o voltamograma por DPV das três etapas do biossensor para detecção de zika construído no eletrodo Au3-PET. Os dados relativos à curva analítica utilizando a DPV serão apresentados em trabalho posterior.

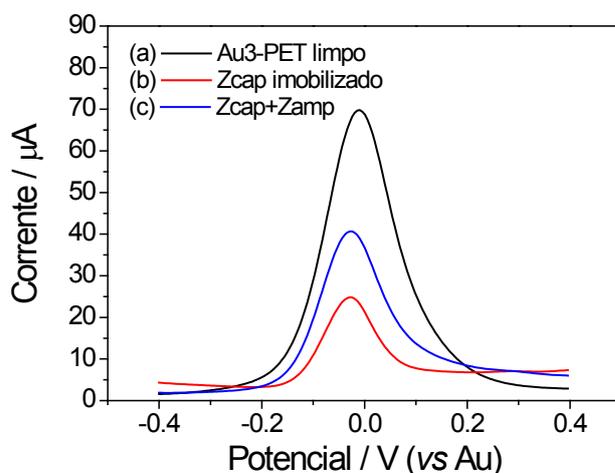


Figura 7.6 – Medidas de voltametria de pulso diferencial (DPV) das etapas de construção do biossensor Au-3PET no sistema de gota: **(a)** eletrodo limpo, curva em linha preta (–); **(b)** imobilização da sequência de captura (*Zcap*), curva vermelha (–) e **(c)** hibridização, curva azul (–). Imobilização de $0,40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de *Zcap* durante 6 horas a 45°C e concentrações de *Zamp* de 130 nmol L^{-1} . DPV realizada em uma gota de $60 \mu\text{L}$ sobre o eletrodo com velocidade de varredura de 100 mV/s e eletrólito de suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em PB $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No ensaio de seletividade, o biossensor com sequências de captura *Zcap* foi colocado para hibridizar com sequências complementares (*Zamp*), nas concentrações de 25, 38, 63, 130, 228, 308 e 340 nmol L^{-1} e não complementar (*Damp*) na concentração de 130 nmol L^{-1} . Destaca-se na curva de calibração, **Figura 7.7a**, a concentração de 130 nmol L^{-1} onde ocorre a

distinção entre os valores de ΔR_{ct}^H nas hibridizações complementares ($Zcap+Zamp$), círculos azuis e não complementares ($Zcap-Damp$), triangulo laranja. A **Figura 7.7b** mostra os diagramas de Nyquist após a hibridização complementar, nas concentrações incluídas na região linear da curva de calibração.

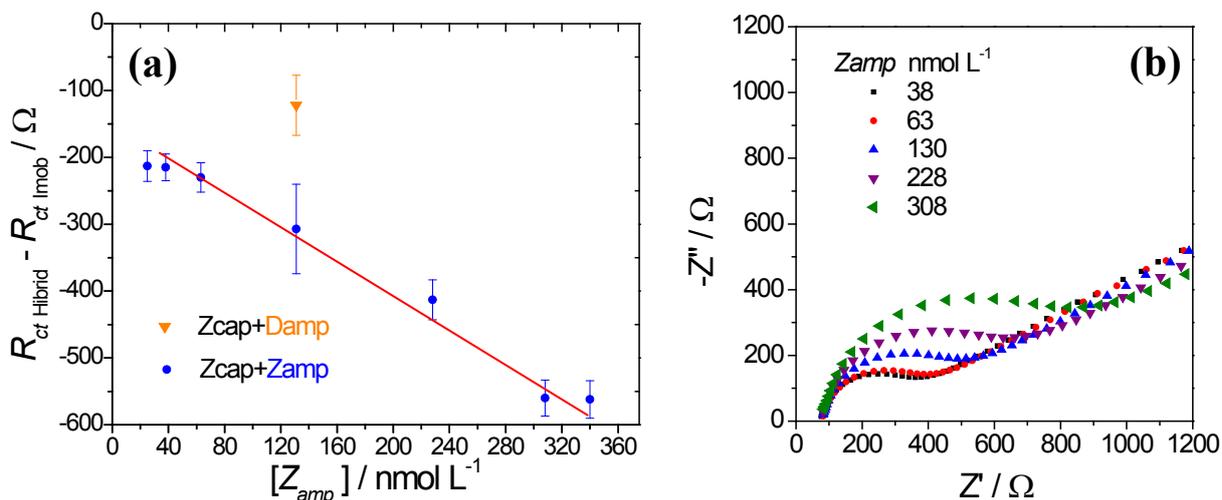


Figura 7.7 – Curva analítica da resistência de transferência de carga ($\Delta R_{ct}^H = R_{ct}^{Hibrid} - R_{ct}^{Imob}$): **(a)** Imobilização de $0,40 \mu mol L^{-1}$ da sequência de captura ($Zcap$) durante 5 horas a $45^\circ C$. Hibridização com $Zamp$ (●) nas concentrações de 25, 38, 63, 130, 228, 308 e $340 nmol L^{-1}$ e hibridização com $Damp$ (▼) na concentração de $130 nmol L^{-1}$. EIS realizada em uma gota de $60 \mu L$, em três eletrodos ($n=3$), nas frequências de 30 a $0,1 kHz$, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ $5,0 mmol L^{-1}$ em PB $0,1 mol L^{-1}$ pH 7,4; **(b)** diagramas de Nyquist após a hibridização de $Zcap+Zamp$ em cinco concentrações incluídas na região linear em (a).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No sistema de detecção em gota no eletrodo Au3-PET o limite de detecção foi calculado utilizando o desvio do branco de sete eletrodos limpos $SD = 9,86$ e inclinação da reta de melhor ajuste da **Figura 7.7**, $b = -1,18 \pm 0,08$ e $R^2 = 0,986$. O que resultou no limite de detecção pelo método da IUPAC: $LOD_{IUPAC} = (25,0 \pm 1,7) nmol L^{-1}$.

Os gráficos de Nyquist comparativos das hibridizações de $Zcap$ com $Zamp$ e $Damp$, ambos na concentração de $130 nmol L^{-1}$, são mostrados na **Figura 7.8**. No gráfico de Nyquist, a curva em linha sólida representa o eletrodo imobilizado com $Zcap$ ($R_{ct} = 970 \pm 28$) Ω que após a hibridização com $Zamp$ apresentou o decréscimo da resistência de transferência de carga para ($R_{ct} = 490 \pm 22$) Ω o que representa uma diferença para o eletrodo imobilizado de $\Delta R_{ct}^H = (-480 \pm 50)$ Ω . A resistência do eletrólito nesse caso foi de ($R_Q = 120 \pm 5$) Ω . A hibridização com $Damp$ ($R_{ct} = 860 \pm 17$) Ω , na mesma concentração de $130 nmol L^{-1}$, resultou em um $\Delta R_{ct}^H = (-110 \pm 45)$ Ω . Esse pequeno decréscimo na hibridização não complementar pode ser atribuído a sequências de $Damp$ que permaneceram ligadas eletrostaticamente no

eletrodo mesmo após a lavagem. Entretanto, a diferença de R_{ct} para os dois caso é suficiente para garantir a seletividade do biossensor para detecção de seqüências que identificam a zika.

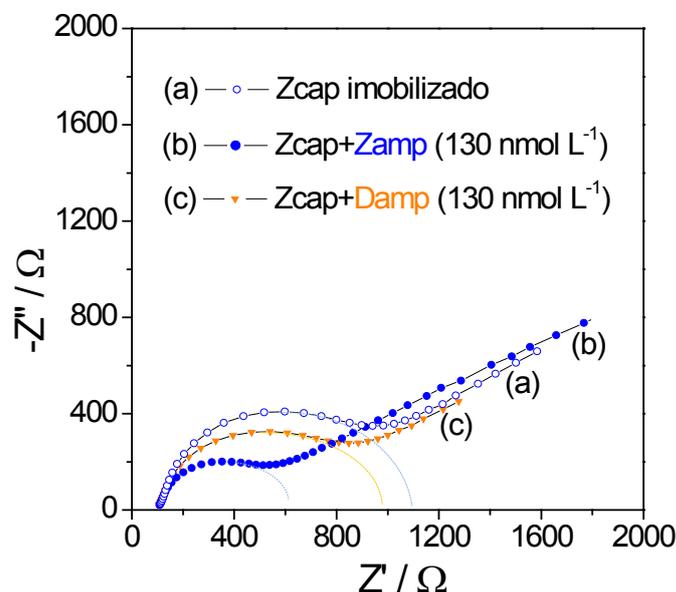


Figura 7.8 – Gráfico de Nyquist comparativo para as hibridizações: (a) seqüências de captura Z_{cap} imobilizada no eletrodo (○); (b) Z_{cap} hibridizada com seqüência complementar Z_{amp} (●) na concentração de 130 nmol L⁻¹ e (c) Z_{cap} hibridizada com seqüência não complementar D_{amp} (▼) na concentração de 130 nmol L⁻¹. Imobilização de 0,40 μmol L⁻¹ de Z_{cap} durante 6 horas a 45°C. EIS tomada nas frequências de 30 a 0,1 kHz, amplitude AC de 5 mV e eletrólito de suporte [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 5,0 mmol L⁻¹ em PB 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A reprodutibilidade do biossensor de DNA no eletrodo Au3-PET foi estimada na concentração da seqüência alvo de 130 nmol L⁻¹, dados da curva de calibração da **Figura 7.7**. O desvio relativo entre eletrodos independentes ($n=5$) foi de 17% e para medidas em um mesmo eletrodo de 5% ($n=5$). Estes resultados indicam que a reprodutibilidade dos biossensores permite a diferenciação entre a seqüência complementar (Z_{amp}) e a seqüência não complementar (D_{amp}). Em síntese, o biossensor de DNA para detecção em gota no eletrodo Au3-PET é adequado para detecção confiável da seqüência alvo de interesse para concentrações acima de 54 nmol L⁻¹. O biossensor apresentou reprodutibilidade suficiente para identificar a seqüência de interesse do vírus e, portanto, são promissores para utilização como dispositivo de diagnóstico molecular em doenças infecciosas como a zika e dengue.

8 CONCLUSÕES

O surgimento da epidemia de zika no Brasil em 2015 deixou o mundo em estado de alerta porque trouxe agravantes como a microcefalia e transmissão sexual não observados anteriormente em outros *Flavivirus*. A coexistência de infecções por zika e dengue evidenciou a necessidade do desenvolvimento de métodos mais eficientes de diagnóstico de baixo custo e que possam identificar e diferenciar essas duas doenças.

Este trabalho reportou a construção de uma plataforma para detecção de sequências de DNA dos vírus da zika e da dengue. Foram fabricados eletrodos descartáveis pelo método de evaporação térmica de ouro sobre um substrato de politereftalato de etileno. O custo unitário dos eletrodos foi duas vezes menor do que o custo de eletrodos comerciais do mesmo tipo. A análise morfológica por microscopia de força atômica mostrou que a superfície condutiva possui rugosidade próxima a outras superfícies como a do silício, característica favorável para formação de monocamadas auto-organizadas. Análises por energia dispersiva de raios X confirmaram a formação de um filme metálico homogêneo, composto exclusivamente de ouro. As caracterizações eletroquímicas avaliadas por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica revelaram uma taxa de transferência de carga no eletrodo muito próxima ao eletrodo de ouro barra comercial.

Nos eletrodos evaporados descartáveis foram construídos dois tipos de biossensores para detecção de sequências que identificam os vírus da zika e dengue. As otimizações de parâmetros de imobilização e hibridização foram realizadas com DNA sintético e possibilitaram encontrar um ponto de operação de melhor desempenho dos biossensores. A detecção da reação de hibridização entre as sequências de captura, imobilizadas covalentemente na superfície do ouro, e as sequências alvo foi realizada sem a necessidade de nenhuma marcação (*label-free*).

No primeiro biossensor, a resposta impedimétrica foi avaliada por espectroscopia de impedância eletroquímica e resultou em um limite de detecção de $(9,86 \pm 0,89)$ nmol L⁻¹ para o vírus da zika, valor comparável aos encontrados na literatura para sistemas biossensores

similares. A detecção de sequências do vírus da dengue usadas como negativas mostrou que o biossensor possui seletividade à sequência alvo. A faixa de concentrações entre 12 e 340 nmol L⁻¹ utilizadas para se obter a curva de calibração situa em uma concentração adequada para análise de sequências amplificadas por técnicas como a polimerase da cadeia reversa.

O segundo tipo de biossensor foi construído em eletrodo evaporado contendo três contatos e as medidas de detecção foram realizadas no sistema de gota na superfície do eletrodo. A detecção de sequência alvo complementar ao vírus da zika, medida por resposta impedimétrica, apresentou limite de detecção de $(25,0 \pm 1,7)$ nmol L⁻¹, curva de calibração avaliada na faixa de concentrações entre 25 e 340 nmol L⁻¹. O teste negativo com sequência não complementar mostrou seletividade para identificar sequências virais da zika. A análise no sistema de gota, com o limite de detecção obtido, representa um avanço na utilização do biossensor de DNA como dispositivo destinado ao diagnóstico, porque pode eliminar a célula eletroquímica do sistema de medida.

O tempo para o resultado da análise nos biossensores construídos ficou próximo de sessenta minutos. Esse período é pelo menos quatro vezes menor do que o tempo requerido na análise por eletroforese em gel. Além disso, a análise consiste na aplicação da amostra no eletrodo e no processamento de leitura de sinal por instrumentação eletrônica, metodologia que simplifica o processo de detecção por eletroforese, utilizado como método padrão na técnica da polimerase da cadeia reversa.

A plataforma biossensora desenvolvida neste trabalho mostrou propriedades relevantes uma vez que a detecção foi obtida por medida direta da hibridização, sem a necessidade de marcação de DNA ou a utilização de reagentes. Os eletrodos descartáveis possuem custo reduzido o que possibilita a aplicação em larga escala, como em situações de epidemias. Os dispositivos podem proporcionar uma vantagem competitiva sobre os protocolos de detecção convencional, pois, podem combinar maior rapidez e redução dos custos na análise molecular. Os resultados indicam que as plataformas biossensoras desenvolvidas neste trabalho são promissoras para integração com a tecnologia PCR destinada ao diagnóstico de pacientes com infecções virais como a zika e dengue.

9 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS

Como perspectivas, algumas etapas podem ser realizadas para integrar os biossensores desenvolvidos com a tecnologia PCR. A etapa imediata que se segue é a análise na plataforma biossensora de produtos da PCR originados de amostras reais. As amostras de pacientes com infecção confirmada pelos vírus da zika e dengue devem ser preparadas utilizando-se os protocolos usuais até a etapa de amplificação pela PCR. Para a análise do produto da PCR alguns parâmetros devem ser avaliados, e os sugeridos inicialmente são: o número de ciclos de amplificação necessários para atingir concentrações mínimas de detecção; a necessidade de purificações adicionais do produto; a temperatura e os tempos de hibridização no biossensor.

Os resultados dos biossensores desenvolvidos neste trabalho foram confiáveis, entretanto, o desempenho do dispositivo com amostras reais poderá diferir daquele obtido utilizando DNA sintético. Os protocolos adotados no biossensor com DNA sintético podem ser extrapolados para amostras reais desde que se incluam medidas de controle que possam eliminar o sinal causado por interferentes presentes nos produtos da PCR. Nos ensaios com amostras reais também deverão ser analisadas amostras de pacientes não infectados.

A fase de testes dos biossensores com os produtos da PCR poderá ser facilitada através da parceria com instituições que possuam bancos de amostra de pacientes, já que a manipulação desses vírus requer laboratórios com nível de biossegurança 2. Para esse objetivo, pode ser utilizado potenciostato/galvanostato portátil para leitura de sinal.

Outra possibilidade a ser explorada na plataforma biossensora é a detecção diferencial das duas doenças em uma mesma amostra. Para essa proposta as sequências de captura da zika e dengue deverão ser imobilizadas em um mesmo biossensor. A detecção simultânea poderá ser avaliada através das técnicas de espectroscopia de impedância e voltametria de pulso diferencial em um potenciostato/galvanostato multiplex. Preferencialmente, na detecção diferencial, deverá ser explorada a amplificação PCR duplex das sequências virais.

A última sugestão consiste no projeto e montagem de um equipamento eletrônico portátil de leitura de sinal dos biossensores. A conjugação dos eletrodos descartáveis com a eletrônica dedicada poderá viabilizar a integração do biossensor com os equipamentos PCR existentes, desde que seja confirmado o desempenho satisfatório na análise de amostras reais.

REFERÊNCIAS

- 1 PETERSEN, L. R. *et al.* Zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552-1553, 2016.
- 2 FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika virus in the Americas - yet another arbovirus threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.
- 3 BHATT, S. *et al.* The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504-507, 2013.
- 4 MUSSO, D. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology**, v. 68, p. 53-55, 2015.
- 5 HAUG, C. J.; KIENY, M. P.; MURGUE, B. The Zika challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 19, p. 1801-1803, 2016.
- 6 JANEGITZ, B. C.; CANCINO, J.; ZUCOLOTTI, V. Disposable biosensors for clinical diagnosis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 378-389, 2014.
- 7 LABUDA, J. *et al.* Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 82, n. 5, p. 1161-1186, 2010.
- 8 VICTORA, C. G. *et al.* Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621-624, 2016.
- 9 DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.
- 10 VENTURA, C. V. *et al.* Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 1, 2016.
- 11 GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **British Medical Journal**, v. 352, p. 1, 2016.
- 12 MACNAMARA, F. N. Zika virus - a report on 3 cases of human infection during an epidemic of Jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139-145, 1954.
- 13 CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 1085-1086, 2014.
- 14 ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569-572, 2015.
- 15 CARDOSO, C. W. *et al.* Outbreak of exanthematous illness associated with zika, chikungunya, and dengue viruses, Salvador, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274-2276, 2015.

- 16 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Zika virus microcephaly and guillain-barré syndrome**. 2016. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204633/1/zikasitrep_17Mar2016.pdf>. Acesso em: 30 out. 2016.
- 17 LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232-1238, 2008.
- 18 _____. Phylogeny of Zika virus in Western hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 933-935, 2016.
- 19 HADDOW, A. D. et al. Genetic characterization of zika virus strains: geographic expansion of the asian lineage. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
- 20 DIALLO, D. et al. Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **Plos One**, v. 9, n. 10, 2014.
- 21 GRARD, G. et al. Zika virus in Gabon (Central Africa) - 2007: a new threat from aedes albopictus? **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.
- 22 JOUANNIC, J. M. et al. Zika virus infection in French Polynesia. **Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1051-1052, 2016.
- 23 MELO, A. S. O. et al. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 47, n. 1, p. 6-7, 2016.
- 24 PETERSEN, E. E. et al. Update: interim guidance for health care providers caring for women of reproductive age with possible zika virus exposure - United States, 2016. **Mmwr - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 12, p. 315-322, 2016.
- 25 LAZEAR, H. M.; DIAMOND, M. S. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. **Journal of Virology**, v. 90, n. 10, p. 4864-4875, 2016.
- 26 D'ORTENZIO, E. et al. Evidence of sexual transmission of zika virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2195-2198, 2016.
- 27 FOY, B. D. et al. Probable non-vector-borne transmission of zika virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880-882, 2011.
- 28 ANEZ, G.; RIOS, M. Dengue in the United States of America: a worsening scenario? **Biomed Research International**, v. 2013, n. 678645, 2013. doi: 10.1155/2013/678645.
- 29 CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. **Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125-2132, 2016.
- 30 RASMUSSEN, S. A. et al. Zika virus and birth defects - reviewing the evidence for causality. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 20, p. 1981-1987, 2016.
- 31 WOODS, C. G.; PARKER, A. Investigating microcephaly. **Archives of Disease in Childhood**, v. 98, n. 9, p. 707-713, 2013.

- 32 FLEMING-DUTRA, K. E. et al. Update: interim guidelines for health care providers caring for infants and children with possible zika virus infection - United States, february 2016. **Mmwr-Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 7, p. 182-187, 2016.
- 33 CDC. **Major Birth defects data from population-based birth defects surveillance programs in the United States, 2006-2010.** Disponível em: <http://www.nbdpn.org/docs/DataDirectory2013_NBDPN_AR.pdf>. Acesso em: 28 jun. 2016.
- 34 ALCANTARA, D.; O'DRISCOLL, M. Congenital microcephaly. **American Journal of Medical Genetics Part C-seminars in medical genetics**, v. 166, n. 2, p. 124-139, 2014.
- 35 SCHULER-FACCINI, L. et al. Possible Association between zika virus infection and microcephaly - Brazil, 2015. **Mmwr - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, 2016.
- 36 MLAKAR, J. et al. Zika virus associated with microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016.
- 37 DRIGGERS, R. W. et al. Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 22, p. 2142-2150, 2016.
- 38 OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 9, p. 4-6, 2014.
- 39 THOMAS, D. L. et al. Local transmission of zika virus - Puerto Rico, November 23, 2015-January 28, 2016. **Mmwr - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 6, p. 154-158, 2016.
- 40 BROUET, N. et al. Zika virus as a cause of neurologic disorders. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1506-1509, 2016.
- 41 JOHANSSON, M. A. et al. Zika and the risk of microcephaly. **New England Journal of Medicine**, v. 375, 2016.
- 42 CARTEAUX, G. et al. Zika virus associated with meningoencephalitis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1595-1597, 2016.
- 43 AHLFORS, K.; IVARSSON, S. A.; HARRIS, S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. review of prospective studies available in the literature. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 31, n. 5, p. 443-457, 1999.
- 44 PASS, R. F. et al. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 2, p. 216-220, 2006.
- 45 BRASIL, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro — preliminary report. **New England Journal of Medicine**, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa1602412>>. Acesso em: 30 out. 2016.

- 46 MEANEY-DELMAN, D. et al. Zika Virus infection among US pregnant travelers - August 2015-February 2016. **Mmwr - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 8, p. 211-214, 2016.
- 47 OLIVEIRA, W. K. et al. Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed zika virus transmission during the first trimester of pregnancy - Brazil, 2015. **Mmwr - Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 9, 2016.
- 48 BUSCH, M. P. et al. Virus and antibody dynamics in acute West Nile virus infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 7, p. 984-993, 2008.
- 49 MORENS, D. M.; BURKE, D. S.; HALSTEAD, S. B. The wages of original antigenic sin. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 1023-1024, 2010.
- 50 JOHNSON, B. W. et al. West Nile virus infection and serologic response among persons previously vaccinated against yellow and Japanese encephalitis viruses. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 2, p. 137-145, 2005.
- 51 MOHAMMED, H. et al. Prevalence of anti-dengue immunoglobulin G antibodies among American red cross blood donors in Puerto Rico, 2006. **Transfusion**, v. 52, n. 8, p. 1652-1656, 2012.
- 52 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Testes de laboratório para a infecção pelo vírus Zika: orientações provisórias**, 23 de Março de 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/information-in-portuguese/en//>>. Acesso em: 20 mar. 2017.
- 53 ROEHRIG, J. T.; HOMBACH, J.; BARRETT, A. D. T. Guidelines for plaque-reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses. **Viral Immunology**, v. 21, n. 2, p. 123-132, 2008.
- 54 MUKHERJEE, S. et al. Mechanism and significance of cell type-dependent neutralization of flaviviruses. **Journal of Virology**, v. 88, n. 13, p. 7210-7220, 2014.
- 55 BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da Saúde. **Exames laboratoriais**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/exames-laboratoriais>>. Acesso em 20 mar. 2017.
- 56 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Orientação para testes de laboratório dos EUA para infecções pelo zika vírus**. 2016. Disponível em: <<https://portugues.cdc.gov/zika/laboratories/lab-guidance.html>>. Acesso em 20 mar. 2017.
- 57 GOURINAT, A. C. et al. Detection of zika virus in urine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 84-86, 2015.
- 58 LENHART, A. et al. Insecticide-treated bednets to control dengue vectors: preliminary evidence from a controlled trial in Haiti. **Tropical Medicine & International Health**, v. 13, n. 1, p. 56-67, 2008.
- 59 BANKS, S. D. et al. Insecticide-treated clothes for the control of vector-borne diseases: a review on effectiveness and safety. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, p. 14-25, 2014.

- 60 CHE-MENDOZA, A. et al. Long-lasting insecticide-treated house screens and targeted treatment of productive breeding-sites for dengue vector control in Acapulco, Mexico. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 2, p. 106-115, 2015.
- 61 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases** – a roadmap for implementation. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/NTD_RoadMap_2012_Fullversion.pdf>. Acesso em: 30 out. 2016.
- 62 BRADY, O. J. et al. Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, 2012.
- 63 PEELING, R. W. et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. **Nature Reviews Microbiology**, p. S30-S37, 2010.
- 64 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020**. Geneva: WHO Press, 2012. 43 p.
- 65 SIMMONS, C. P. et al. Current concepts dengue. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 15, p. 1423-1432, 2012.
- 66 GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, p. S7-S16, 2010. doi: 10.1038/nrmicro2460.
- 67 ACCURASCIENCE. **Bioinformatics services to biomedical researchers in academic institutions**. Johnston, IA – US. Disponível em: < <http://www accurascience.com>>. Acesso em: 01 jun. 2016.
- 68 MCPHERSON, M.; MELLER, S. **PCR: the basics**. New York: Taylor & Francis, 2006. 305 p.
- 69 DIEFFEMBACH, C. W. D., GABRIELA S. **PCR primer: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. 520 p.
- 70 GRIFFIN, H. G.; GRIFFIN, A. M. **PCR technology: current innovations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 370 p.
- 71 WANG, J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-1892, 15 2006.
- 72 SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA biosensors and microarrays. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 1, p. 109-139, 2008.
- 73 OZSOZ, M. **Electrochemical DNA biosensors**. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2012. 531 p.
- 74 KLEO, K. et al. Detection of vaccinia virus DNA by quartz crystal microbalance. **Analytical Biochemistry**, v. 418, n. 2, p. 260-266, 2011.
- 75 NÖLL, G. et al. A reusable sensor for the label-free detection of specific oligonucleotides by surface plasmon fluorescence spectroscopy. **Advanced Healthcare Mater**, v. 3, n. 1, p. 42-46, 2014.

76 AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; RAHIGHI, R. Toward single-DNA electrochemical biosensing by graphene nanowalls. **ACS Nano**, v. 6, n. 4, p. 2904-2916, 2012.

77 WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. In: PALECEK, E.; SCHELLER, F.; WANG, J. (Ed.). **Electrochemistry of nucleic acids and proteins: towards electrochemical sensors for genomics and proteomics**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p.175-194.

78 OLIVEIRA JUNIOR, O. N. et al. Nanomaterials for diagnosis: challenges and applications in smart devices based on molecular recognition. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 17, p. 14745-66, 2014.

79 WATTERSON, J.; PIUNNO, P. A. E.; KRULL, U. J. Practical physical aspects of interfacial nucleic acid oligomer hybridisation for biosensor design. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, n. 1, p. 115-127, 2002.

80 TARLOV, M. J.; STEEL, A. B. **Biomolecular films: design, function, and applications**. New York: Marcel Dekker, 2003.

81 PAN, S. L.; ROTHBERG, L. Chemical control of electrode functionalization for detection of DNA hybridization by electrochemical impedance spectroscopy. **Langmuir**, v. 21, n. 3, p. 1022-1027, 2005.

82 LI, C. Z.; LIU, Y. L.; LUONG, J. H. T. Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 2, p. 478-485, 2005.

83 INGEBRANDT, S. et al. Label-free detection of single nucleotide polymorphisms utilizing the differential transfer function of field-effect transistors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 12, p. 2834-2840, 2007.

84 CHANG, B. Y.; PARK, S.-M. Electrochemical impedance spectroscopy. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 207-228, 2010.

85 GEBALA, M.; SCHUHMANN, W. Understanding properties of electrified interfaces as a prerequisite for label-free DNA hybridization detection. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 14, n. 43, p. 14933-14942, 2012.

86 LISDAT, F.; SCHAEFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 5, p. 1555-1567, 2008.

87 PARK, J. Y. et al. Label-free detection of DNA molecules on the dendron based self-assembled monolayer by electrochemical impedance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 619, n. 1, p. 37-42, 2008.

88 KEIGHLEY, S. D. et al. Optimization of DNA immobilization on gold electrodes for label-free detection by electrochemical impedance spectroscopy. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 8, p. 1291-1297, 2008.

89 WITTE, C.; LISDAT, F. Direct detection of DNA and DNA-Ligand interaction by impedance spectroscopy. **Electroanalysis**, v. 23, n. 2, p. 339-346, 2011.

90 CHEN, C. P. et al. Label-free dual sensing of DNA molecules using GaN nanowires. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 1, p. 36-42, 2009.

- 91 DANIELS, J. S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: opportunities and challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239-1257, 2007.
- 92 TALEAT, Z.; KHOSHROO, A.; MAZLOUM-ARDAKANI, M. Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008-2013). **Microchimica Acta**, v. 181, n. 9-10, p. 865-891, 2014.
- 93 AFONSO, A. S. et al. Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. **Talanta**, v. 146, p. 381-387, 2016. doi: 10.1016/j.talanta.2015.09.002.
- 94 GOLAN, Y.; MARGULIS, L.; RUBINSTEIN, I. Vacuum-deposited gold-films. factors affecting the film morphology. **Surface Science**, v. 264, n. 3, p. 312-325, 1992.
- 95 GARCÍA-GONZÁLEZ, R. et al. Electrochemical characterization of diferente screen-printed gold electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 8, p. 3242–3249, 2008.
- 96 FANJUL-BOLADO, P. et al. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 10, p. 635–642, 2008.
- 97 VERICAT, C. et al. Self- assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well- known system. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 1805-1834, 2010. doi: 10.1039/B907301A.
- 98 GARCIA, M. B. G.; ABEDUL, M. T. F.; GARCIA, A. C. Screen-printed enzyme-free electrochemical sensors for clinical and food analysis. In: ALEGRET, S.; MERKOÇI, A. (Ed.). **Electrochemical sensors analysis**. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 603-637.
- 99 BETTAZZIA, F. et al. Disposable electrochemical DNA-array for PCR amplified detection of hazelnut allergens in foodstuffs. **Analytica Chimica Acta**, v. 614, n. 1, p. 93-102, 2008.
- 100 PAPADOPOULOU, E. et al. Using surface-enhanced raman spectroscopy and electrochemically driven melting to discriminate yersinia pestis from y. pseudotuberculosis based on single nucleotide polymorphisms within unpurified polymerase chain reaction amplicons. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 3, p. 1605-1611, 2015.
- 101 MASCINI, M. et al. Identification of mammalian species using genosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 2, p. 163-169, 2005.
- 102 OZKAN-ARIKSOYSAL, D. et al. Design of electrochemical biosensor systems for the detection of specific DNA sequences in PCR-amplified nucleic acids related to the catechol-O-methyltransferase val1 08/158Met polymorphism based on intrinsic guanine signal. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 588-595, 2008.
- 103 ULIANA, C. V. et al. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of hepatitis C virus using fractional factorial designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 4, p. 782-787, 2008.
- 104 ROCHA, C. G.; FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Label-free impedimetric immunosensor for detection of the textileazo dye Disperse Red 1 in treated water. **Sensors and Actuators B: chemical**, v. 236, p. 52-59, 2016.

- 105 LAI, R. Y. et al. Rapid, sequence-specific detection of unpurified PCR amplicons via a reusable, electrochemical sensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4017-4021, 2006.
- 106 FARABULLINI, F. et al. Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1544-1549, 2007.
- 107 YAN, Y. R. et al. Direct ultrasensitive electrochemical biosensing of pathogenic DNA using homogeneous target-initiated transcription amplification. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.
- 108 ROCHE DIAGNOSTICS CORPORATION. **Tira de teste de biossensor eletroquímico aperfeiçoada**. BR n. PI 9815122-3, 02 dez. 1998, 20 set. 2011.
- 109 José Luiz de Lima Filho et al. **Biossensor eletroquímico para detecção de ácidos nucléicos**. BR n. PI 1102719-3, 03 jun. 2011, 18 fev. 2014.
- 110 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. FAPEMIG - Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas gerais. **Genossensor eletroquímico para diagnóstico da meningite meningocócica**. BR n. PI 102013031310-6, 10 nov. 2015.
- 111 AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH. Xiaojun Chen; Zhiqiang Gao; Hong Xie. **Nucleic Acid biosensor**. WO 2010117341, 08 Apr. 2010, 14 Oct. 2010.
- 112 Jeo-young Shin et al. **FET-type biosensor with surface modification**. US 20060205013, 20 Jan. 2006, 14 Sept. 2006.
- 113 THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY. Nader Pourmand; Miloslav Karhanek; Ronald W. Davis. **Charge perturbation detection method for DNA and other molecules**. US20120283107, 29 Mar. 2012, 08 Nov. 2012.
- 114 Samir M. Iqbal et al. **Nano-scale biosensors**. US 20100201381, 08 Feb. 2010, 12 Aug. 2010.
- 115 AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH. Masafumi Inouque; Timothy Barkham. **Gene sequences for the detection of chikungunya and dengue fever**. WO 2010030243, 11 Sept 2009, 18 Mar. 2010.
- 116 WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **Biotechniques**, v. 22, n. 3, p. 478-481, 1997.
- 117 WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v. 13, n. 12, p. 983-988, 2001.
- 118 SANTOS, M. E. R.; TOLEDO, P. T. M.; LOTUFO, R. A. (Org.). **Transferência de tecnologia: estratégias para estruturação e gestão de núcleos de inovação tecnológica**. Campinas: Komedi, 2009.
- 119 GUIMARÃES, Y. B. T. et al. Valoração de patentes: o caso do núcleo de inovação tecnológica de uma instituição de pesquisa brasileira. **Exacta-EP**, v. 12, n. 2, p. 161-172, 2014.

120 BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. Métodos de impedância. In: BRETT, A. M. O. **Electroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, 1996. cap. 11, p. 472.

121 TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface-area measurements in electrochemistry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 327, n. 1-2, p. 353-376, 1992.

122 AGERSTEIN-KOZLOWSKA, H. et al. Elementary steps of electrochemical oxidation of single-crystal planes of Au-I. Chemical basis of processes involving geometry of anions and the electrode surfaces. **Electrochimica Acta**, v. 31, n. 8, p. 1051-1061, 1986.

123 BRUCKENSTEIN, S.; SHAY, M. An in situ weighing study of the mechanism for the formation of the adsorbed oxygen monolayer at a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 188, n. 1-2, p. 131-136, 1985.

124 BARD A. J.; FAULKNER L. R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2nd ed. New York: John Wiley, 2001. 850 p.

125 BENITES, T. A. et al. Effects of surface roughness on properties of passivation of self-assembled organic monolayers. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533-1537, 2014.

126 RODRIGUEZ, J. M. D.; MELIAN, J. A. H.; PENA, J. P. Determination of the real surface area of Pt electrodes by hydrogen adsorption using cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, v. 77, n. 9, p. 1195-1197, 2000.

127 GEBALA, M. et al. A biotinylated intercalator for selective post-labeling of double-stranded DNA as a basis for high-sensitive DNA assays. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 5, p. 684-688, 2010.

128 FIGUEIREDO, A. et al. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. **Scientific Reports**, v. 5, p. 7865, 2015. doi: 10.1038/srep07865.

129 KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, n. 1, p. 27-40, 1998.

130 TATAUROV, A. V.; YOU, Y.; OWCZARZY, R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. **Biophysical Chemistry**, v. 133, n. 1-3, p. 66-70, 2008.

131 GEBALA, M.; SCHUHMANN, W. Controlled orientation of DNA in a binary SAM as a key for the successful determination of DNA hybridization by means of electrochemical impedance spectroscopy. **Chemphyschem**, v. 11, n. 13, p. 2887-2895, 2010.

132 ELSHAFEY, R.; SIAJ, M.; ZOUROB, M. DNA aptamers selection and characterization for development of label-free impedimetric aptasensor for neurotoxin anatoxin-a. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 68, p. 295-302, 2015.

133 CARPINI, G. et al. Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 2, p. 167-175, 2004.

- 134 PATOLSKY, F.; LICHTENSTEIN, A.; WILLNER, I. Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 253-257, 2001.
- 135 LUCARELLI, F. et al. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 6, p. 515-530, 2004.
- 136 DEL GIALLO, M. L. et al. Steric factors controlling the surface hybridization of PCR amplified sequences. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 6324-6330, 2005.
- 137 BONANNI, A.; PIVIDORI, M. I.; VALLE, M. del. DNA polymorphism sensitive impedimetric detection on gold-nanoislands modified electrodes. **Talanta**, v. 136, p. 95-101, 2015. Doi: 10.1016/j.talanta.2015.01.004
- 138 HUANG, H. et al. An ultrasensitive electrochemical DNA biosensor based on graphene/Au nanorod/polythionine for huma papillomavirus DNA detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 68, p. 442-446, 2015. doi: 10.1016/j.bios.2015.01.039.
- 139 MILLER, J. N.; MILLER J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6th ed. Harlow: Pearson Education Limited, 2010. 297 p.
- 140 ZHANG, D. et al. Label-free electrochemical DNA biosensor array for simultaneous detection of the HIV-1 and HIV-2 oligonucleotides incorporating different hairpin-DNA probes and redox indicator. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1088-1094, 2010.
- 141 ZHENG, H. Y. et al. Label-free electrochemical impedance biosensor for sequence-specific recognition of double-stranded DNA. **Analytical Methods**, v. 5, n. 19, p. 5005-5009, 2013.
- 142 WANG, J. **Analytical electrochemistry**. New York: VCH Publishers, Inc, 1994. 198 p.

Anexo A - Genoma do vírus da zika: região da proteína NS5

Identificação no *GenBank*: NC_012532.1.

Sequência que gera o produto da PCR (cDNA) em negrito e marcada em cor cinza.

ORGANISM: Zika virus; Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viruses, noDNA; Flaviviridae; Flavivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 10794)

Kuno,G. and Chang,G.-J.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol.* 152 (4), 687-696 (2007)

(NS5: bases 7655 - 10363)

```

7621 (5') .....ggaggt gggacgggag agactctggg
7681 agagaagtgg aaagctcgtc tgaatcagat gtcggccctg gagttctact cttataaaaa
7741 gtcaggatc actgaagtgt gtagagagga ggctcgccgt gccctcaagg atggagtggc
7801 cacaggagga catgccgtat cccggggaag tgcaaaagatc agatggttgg aggagagagg
7861 atatctcagc ccctatggga aggttgttga cctcggatgt ggcagagggg gctggagcta
7921 ttatgccgcc accatccgca aagtgcagga ggtgagagga tacacaaagg gaggtcccgg
7981 tcatgaagaa ccatgctgg tgcaaaagcta tgggtggaac atagttcgtc tcaagagtgg
8041 agtggacgtc ttccacatgg cgctgagcc gtgtgacct ctgctgtgtg acataggtga
8101 gtcacatct agtctgaag tggaagagac acgaacactc agagtgtct ctatggtggg
8161 ggactggctt gaaaaagac caggggcctt ctgtataaag gtgctgtgcc catacaccag
8221 cactatgatg gaaacctgg agcgactgca acgtaggcat gggggaggat tagtcagagt
8281 gcattgtgt cgcaactcca cacatgagat gtactgggtc tctggggcaa agagcaacat
8341 cataaaaagt gtgccacca caagtacgct cctcctggga cgcatggatg gcccaggag
8401 gccagtgaat tatgaggagg atgtgaacct cggctcgggt acacgagctg tggcaagctg
8461 tctgaggct cctaactga aatcatcgg caggcgcatt gagagaatcc gcaatgaaca
8521 tgcagaaca tggttcttg atgaaaacca ccatacagg acatggcctt accatgggag
8581 ctacgaagcc cccacgcaag gatcagcgtc ttccctcgtg aacgggggtg ttgactcct
8641 gtcaaagcct tgggacgtgg tgaactggagt tacaggaata gccatgactg acaccacacc
8701 atacggccaa caaagagtct tcaaagaaaa agtggacacc aggggtccag atcccaaga
8761 aggcactcgc caggtaatga acatagctc ttctggctg tggaaaggagc tggggaacg
8821 caagcggcca cgcgtctgca ccaaagaaga gttatcaac aaggtgcgca gcaatgcagc
8881 actgggagca atatttgaag aggaaaaaga atggaagacg gctgtggaag ctgtgaatga
8941 tccaaggttt tgggcctag tggatagga gagagaacac cacctgagag gagagtgtca
9001 cagctgtgtg tacaacatga tgggaaaaag agaaaagaag caaggagagt tgggaaagc
9061 aaaaggtagc cgcgccatct ggtacatgtg gttgggagcc agattcttgg agtttgaagc
9121 cttggattc ttgaacgagg accattggat gggaaagaaa aactcaggag gtggagtcca
9181 agggttagga ttgcaaacag ttgatacat tctagaagaa atgaatcggg caccaggagg
9241 aaagatgtac gcagatgaca ctgctggctg ggacaccgc attagtaagt ttgatctgga
9301 gaatgaagct ctgattacca accaaatgga ggaagggcac agaactctgg cgttggcctt
9361 gattaatac acataccaaa acaaatggtt gaaggttctc agaccagctg aaggaggaaa
9421 aacagttatg gacatcattt caagacaaga ccagagaggg agtggacaag ttgtcactta
9481 tctctcaac acattacca acttgggtgt gcagcttacc cggacatgg aagctgagga
9541 agtgttagag atgcaagact fatggttgtt gaggaagcca gaaaaagtga ccagatggtt
9601 gcagagcaat ggatgggata gactcaaacg aatggcggtc agtggagatg actgctgtt
9661 gaagccaatc gatgataggt ttgcacatgc cctcaggtt tgaatgaca tgggaaaagt
9721 taggaaagac acacaggagt ggaaacctc gactggatgg agcaattggg aagaagtccc
9781 gttctgtccc caccactca acaagctgta cctcaaggat gggagatcca ttgtgtccc
9841 ttgccgccac caagatgaac tgattggccg agctcgcgtc tcaccagggg caggatggag
9901 catccgggag actgctgtc ttgcaaaatc atatgcgag atgtggcagc tctttattt
9961 ccacagaaga gacctcgac tgatggctaa tgccatttgc tggctgtgc cagttgactg
10021 ggtaccaact gggagaacca cctgtcaat ccatggaag ggagaatgga tgaccactga
10081 ggacatgctc atggtgtgga atagagtgtg gattgaggag aacgaccata tggaggacaa
10141 gactcctgta acaaaatgga cagacattcc ctatctagga aaaagggagg acttatggtg
10201 tggatccctt atagggcaca gaccccgac cacttgggtt gaaaacatca aagacacagt
10261 caacatggtg cgcaggatca taggtgatga agaaaagtac atggactatc tatccacca
10321 agtccgctac ttgggtgagg aagggtccac acccgagtg ttg ..... (3')

```


Anexo B - Genoma do vírus da dengue: região da proteína NS5

Identificação no *GenBank*: NC_001477.1.

Sequência que gera o produto da PCR (cDNA) em negrito e marcada em cor cinza.

ORGANISM Dengue virus 1; Viruses; ssRNA viruses; ssRNA positive-strand viroses; no DNA stage; Flaviviridae; Flavivirus; Dengue virus group.

REFERENCE 1 (bases 1 to 10179)

Puri,B., Nelson,W.M., Henschal,E.A., Hoke,C.H., Eckels,K.H., Dubois,D.R., Porter,K.R. and Hayes,C.G. Molecular analysis of dengue virus attenuation after serial passage in primary dog kidney cells. *J. Gen. Virol.* 78 (PT 9), 2287-2291 (1997).

(NS5: bases 7575 - 10273)

```

7561 (5') .....gattat agaggtggat agatctgaag ccaagaggg gttaaaaga
7621 ggagaaacga ctaaacacgc agtgtcgaga ggaacggcca aactgaggtg gtttggag
7681 aggaacctg tgaaccaga agggaaagtc atagacctc gtttggag aggtggctgg
7741 tcatattat gcgctggct gaagaaagtc acagaagtga aaggatacac gaaaggagga
7801 cctggacatg aggaaccaat ccaatggca acctatggat ggaacctagt aaagctatac
7861 tccgggaaag atgtattct tacaccacct gagaaatgtg acacctctt gtgtgatatt
7921 ggtgagtcct ctccgaacce aactatagaa gaaggaagaa cgttacgtgt tctaaagatg
7981 gtggaacct ggctcagagg aaaccaattt tgcataaaaa ttctaaatcc ctatatgccg
8041 agtgtgtag aaacttga gcaaatgcaa agaaaacatg gaggaatgct agtgcgaaat
8101 ccactctca gaaactcac tcatgaaatg tactgggtt catgtggaac aggaacatt
8161 gtgtcagcag taaacatgac atctagaatg ctgctaaatc gattcacaat ggctcacagg
8221 aagccaacat atgaaagaga cgtggactta ggcgctggaa caagacatgt ggcagtagaa
8281 ccagaggtgg ccaacctaga tatcattggc cagaggatag agaataaaa aaatgaac
8341 aaatcaacat ggcattatga tgaggacaat ccatacaaaa catgggccta tcatggatca
8401 tatgaggtca agccatcagg atcagcctca tccatggta atggtgtggt gagactgcta
8461 accaaacat gggatgcat tccatggtc acacaatag ccatgactga caccacacc
8521 tttggacaac agaggggtt taaagagaaa gttgacacgc gtacacaaa agcgaaacga
8581 ggacacagcac aaattatgga ggtgacagcc aggtggttat ggggtttct ctctagaac
8641 aaaaaacca gaactgcac aagagaggag ttcacaagaa aagtcaggtc aaacgcagct
8701 attggagcag tttctgtga tgaatcaaa tggaaactcag caaaagaggc agtggaaatg
8761 gaacggttct gggacctgtg gcacagagag agggagcttc ataaacaagg aaatgtgcc
8821 acgtgtgtct acaacatgat gggaaagaga gagaaaaat taggagagtt cggaaaggca
8881 aaaggaagtc gcgcaatag gtacatgtgg ttgggagcgc gctttttaga gtttgaagcc
8941 cttgtttca tgaatgaaga tcaactggtc agcagagaga atcactcag tggagtggaa
9001 ggagaaggac tccacaact tggatacata ctacagagaca tatcaaatg tccaggggga
9061 aatattgatg agatgacac agccgatgg gacacaagaa taacagagga tgatctcag
9121 aatgagccca aaactactga catcatgaa cctgaacatg ccatttggc cactgcaatc
9181 ttaagctaa ctaacaaaa caagtagta aggtgacaga gaccagcgaa aaatggaaac
9241 gtatggatg tcatatccag acgtgaccag agaggaagtg gacaggttg aacctatggc
9301 taaacacct tcaacaacat ggaggccca ctaataagac aaatggagtc tgagggaaac
9361 ttttaccca gcgaattgga aaccccaat ctagecgaag gagtctcga ctggttgaag
9421 aaacatggca ccgagaggct gaaaagaatg gcaatcagtg gagatgactg tgtgtgaaa
9481 ccaatcagtg acagattgc aacagcctta acagcttga atgacatggg aaagtaaga
9541 aaagacatac cgcaatggga acctcaaaa ggatggaatg attggcaaca agtgccttfc
9601 tgttcacacc atttccacca gctgattatg aaggatggga gggagatag ggtgccatgc
9661 cgcaaccaag atgaactgt aggtagggcc agagtatcac aagcgcggg atggagctg
9721 agagaaactg catgcctagg caagtcata gcacaatgt ggcagctgat gtactccac
9781 aggagagact tgagattagc ggtaaatgct atctgttcag ccgttccagt tgattgggtc
9841 ccaaccagcc gcaccactg gtcgatccat gccaccatc aatggatgac aacagaagac
9901 atgtgtcag tgtggaatag ggttggata gagaaaacc catgagatgga ggacaagact
9961 catgtgtcca gttgggaaga cgttcatac ctaggaaaaa gggagatca atggtgtggt
10021 tcctaatag gcttaacagc acgagccacc tgggccacca acatacaagt ggccataaac
10081 caagttagaa ggctcattg gaatgagaat tatctagact tcatgacatc aatgaagaga
10141 cacctgggcc accaacatac aagtggccat aaaccaagtg agaaggctca ttgggaatga
10201 gaattatcta gacttcatga catcaatgaa gagattcaaa aacgagagtg atccgaagg
10261 ggcactctg taa ..... (3')

```