



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICO E PIEZELÉTRICO DE DNA PARA
DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS**

JORGE JOSÉ DE BRITO SILVA

Recife-2004

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICO E PIEZELÉTRICO DE DNA PARA
DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS**

Autor: Jorge José de Brito Silva

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique de Magalhães e
Melo**

Recife-2004

JORGE JOSÉ DE BRITO SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSORES
ELETROQUÍMICO E PIEZELÉTRICO DE DNA PARA
DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Eduardo Henrique de Magalhães Melo

Recife-2004

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICO E PIEZELÉTRICO DE DNA PARA
DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS**

JORGE JOSÉ DE BRITO SILVA

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Henrique de Magalhães Melo (UFPE)

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (UFPE)

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto (UFRPE)

Prof^a Dr^a Maria de Mascena Diniz Maia (UFRPE)

Prof^a Dr^a Rosa Amália Fireman Dutra (UPE)

A minha família, meus pais,
minha esposa Cristiane, meus
filhos, Luca e Sofia, e a minha
querida amiga e colaboradora
Rosa Amália F. Dutra.

Desde o início da minha convivência nesta Universidade e exatamente no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, a muitos tenho que agradecer.

Agradecer a amizade, o companheirismo, o carinho e a paciência.

Dedico especiais agradecimentos aos professores: Eduardo Henrique Magalhães Melo, pelo seu aceite em me orientar. Ao professor José Luiz de Lima Filho, pela amizade antes de tudo, o que há de mais importante na vida, pelas idéias geniais e que por muitas vezes se transvestiram do absurdo, tornaram-se alavancas para novas e promissoras pesquisas. A professora Rosa Amália, companheira incansável e sempre feliz, autêntica, nata orientadora, devo toda a minha gratidão por sua paciência e inestimável colaboração. A professora Silvia Helena Serrano do Instituto de Química da Universidade de São Paulo-USP, pelas maravilhosas recomendações, que me levaram a iniciar um trabalho cauteloso e eficiente. A professora Ana Maria Brett da Universidade de Coimbra-Portugal, que por via e-mail e também em nosso único encontro pessoal, me tranqüilizou e forneceu fantásticas contribuições. Ao professor Valberes do Departamento de Química Análítica da UFRPE, pelas idéias e incentivos. A professora Norma Lucena do Instituto de pesquisa Aggeu Magalhães, com a sua enorme colaboração, nos fornecendo material genético e novas idéias de trabalho. Ao professor Elder do Departamento de Física da UFPE pela sua colaboração e a professora Sueli do Departamento de Antibióticos, pela sua gentil contribuição nas sugestões de correção da tese.

Agradecimentos sinceros, aos meus companheiros do dia a dia, tanto de laboratório, quando do próprio LIKA: ao meu amigo Moisés, Verinha, Dona Celestina, Oscar, Ilma, Conceição, Carlão, Paulina, Carmelita, Kilma, Cleide, Paulo, Agamenon, Alexandre Libânio, Alexandro Albertine, Fátima Diniz, Sr. Otaviano, Célia Castro, Ana Porto, Maria de Mascena (Mana), Professaras Maria da Paz e Elizabeth Chaves, Vanda, Keila, Rosângela Frade, Kali, Erika, Renata, Daiane, Brunaska e enfim a todos que se tornou minha família nesses dias de LIKA.

Agradecimentos de inestimável colaboração aos nossos queridos alunos de Iniciação Científica, Renata Borge, Cassia Arantes (a Bahiana), Fabrícia, Marcelo Ataíde, Luciano, Fernando Vital, Adenor e Rodrigo, Ricardo (Tico), Carlos André.

A coordenação do doutorado em Ciências Biológicas, em especial agradecimento a nossa querida Adenilda por sua competência na posição de secretária da coordenação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, pela bolsa concedida.

A todos enfim que com certeza esqueci nesse momento, e acima de tudo, ao Criador de tudo e de todos, a Vida.

Sumário

Lista de Figuras.....	i
Lista de tabela.....	vi
Lista de Abreviatura.....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1- INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Dengue.....	01
1.2 Tuberculose.....	02
1.3 Leucemias.....	03
1.4 Biossensor.....	07
1.5 Transdutores.....	07
1.5.1 Transdutores Eletroquímicos.....	08
1.5.1.1 Amperométricos.....	09
1.5.1.2 Potenciométricos.....	10
1.5.1.3 Condutimétricos.....	11
1.5.2 Transdutores Eletromagnéticos.....	11
1.5.2.1 Transdutores Acústicos.....	12
1.5.2.2 Cristal piezelétrico de quartzo.....	14
1.5.2.3 Microbalança de Cristal de Quartzo (MCQ).....	18
1.5.2.4 Transdutores Ópticos.....	18
1.5.3 Transdutores Térmicos.....	19
1.6 Biossensores de DNA.....	20
1.6.1 Hibridização do Ácido Nucleico.....	21
1.6.2 Transdutores de DNA.....	21
1.6.2.1 Transdutores piezelétrico de DNA.....	21

1.6.2.2 Transdutores Ópticos de DNA.....	22
1.6.2.3 Transdutores Eletroquímicos de DNA.....	23
1.6.2.3.1 Comportamento Eletroquímico do DNA.....	24
1.7 Técnicas de Imobilização de Oligonucleotídeos purificados em Superfície Sólidas.....	25
1.7.1 Adsorção.....	25
1.7.1.1 Adsorção Eletroquímica.....	26
1.7.1.2 Adsorção Física em Eletrodos de Carbono.....	27
1.7.1.3 Adsorção sobre Polímeros Condutores.....	27
1.7.1.4 Adsorção em Eletrodo de Ouro.....	27
1.7.2 Imobilização de DNA por Complexação.....	28
1.7.3 Imobilização de DNA via Ligações Covalentes.....	29
1.7.4 Imobilização de DNA em Eletrodo de Carbono Composto.....	30
1.7.5 Imobilização de DNA em pasta de carbono.....	31
1.8 Objetivos.....	32
2.0 ARTIGOS.....	33
Artigo 1.....	34
Artigo 2.....	41
Artigo 3.....	62
3.0 CONCLUSÕES.....	79
4.0 REFERÊNCIAS.....	80

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

- Figura 1** – Um modelo bidimensional de um cristal piezelétrico: (A) Os centros das cargas positivas e negativas no cristal coincidem; (B) Quando o cristal é comprimido, os íons movem-se como indicado, causando a separação dos centros das cargas positivas e negativas. Esta separação gera um momento dipolar resultante no cristal e um movimento de carga, que é uma corrente. Quando a pressão no cristal cessa, a corrente movimenta-se na direção oposta; (C) Se uma voltagem com a polaridade indicada é aplicada, os átomos movem-se como indicado, e o resultado é uma expansão do cristal; (D) se uma voltagem oposta for aplicada, os átomos movem-se como indicado, e o resultado é uma compressão do cristal.....13
- Figura 2** – Vista superior e lateral de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambos os lados.....15
- Figura 3** – Cristal piezelétricos de Quartzo.....16
- Figura 4** – Nodo da onda acústica passando pelo centro do disco e a deformação causada pelo cisalhamento.....17
- Figura 5** – Mecanismo de oxidação para guanina e adenina.....24

Figura 6 - Imobilização de DNA por adsorção eletroquímica. (A) Adsorção da sonda de DNA em um transdutor eletroquímico aplicando um potencial positivo. (B) Hibridização entre a sonda e a seqüência alvo, mantendo-se o mesmo potencial (Fonte: Pividori <i>et al.</i> , 2000).....	26
Figura 7 - Imobilização de DNA por ligação covalente em superfície de ouro através de uma sonda marcada com um grupamento tiol (SH) (Fonte: Pividori <i>et al.</i> , 2000).....	28
Figura 8 - Imobilização de DNA envolvendo a complexação avidina-biotina. (A) Adsorção de avidina na superfície do eletrodo de grafite. (B) Complexação entre a avidina e a sonda de DNA biotinilada (Fonte: Pividori <i>et al.</i> , 2000).....	29
Figura 9 - Ligações covalentes de DNA em diferentes tipos de superfícies transdutoras. (A) Imobilização de ss-DNA em eletrodos de carbono vítreo, usando o método da carbodiimida. (B) Imobilização de DNA na superfície do eletrodo de platina modificado por uma camada de mercaptosilano, via grupos aminos das bases (Fonte: Pividori <i>et al.</i> , 2000).....	30

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Electrode designer.....	36
Figura 2 – Cyclic voltammetry of graphite polymercaptan electrode (GPE), ranging from –0.8 V to + 1.6V (vs. Ag/AgCl).....	37
Figure 3 – Voltammetric curve from – 0,38V up + 1.4V (vs. Ag/AgCl) at 100mV.s ⁻¹ sweep rate of ss-DNA/GPE.....	37
Figure 4 – Voltammetric curve from – 0.3V up to + 1.48V (vs. AG/AgCl) at 100 mV.s ⁻¹ sweep rate of ss-DNA/GPE at the hybridisation procedure.....	38
Figure 5 – Voltammetric curve from – 0.5V up to + 1.7V (vs. Ag/AgCl) at 100mV ⁻¹ sweep rate ss-DNA/GPE.....	38
Figure 6 – The hybridization reaction was detected by using the cyclic voltammetry curve from – 1.0V up to + 1.7V at 100mV.s ⁻¹ (vs. Ag/AgCl).....	39
Figure 7 – Cyclic voltammetry curve from 1.0V up to + 1.5V at 100mV.s ⁻¹ (vs. Ag/AgCl) after two voltammetric curves.....	39

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Struture of chitin and chitosan.....	44
Figura 2 – Schematic design of the system.....	46
Figura 3 – Representation of frequency shift observed in the chitosan film preparation (1) clean electrode, (2-3) chitosan solution spread, (4) after first washing, (5-7) after second to fourth washing.....	48
Figura 4 – Effect of chitosan concentration solution on QCM electrode surface.....	49
Figura 5 – Signal transduction using NaOH on the chitosan film. The control experiment shows the chitosan film without NaOH.....	50
Figura 6 – Effects of the ss-DNA concentration on the DNA chitosan immobilization.....	51
Figura 7 – Hybridization profile of DNA at 4 °C and 26 °C.....	52

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Desenho esquemático do sistema QCM.....68

Figura 2 – Ensaio experimental típico mostrando as medidas de frequência correspondente às etapas de imobilização e hibridização....71

Figura 3 – Alteração de frequência resultante nas etapas de imobilização de ss-DNA e hibridização com RNA homólogo.....72

Figura 4 – Respostas de frequências referentes à hibridização com ss-DNA de *E. coli* (70% homólogo).....73

LISTA DE TABELA

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Resultados comparativos das variações de frequências referentes aos estudos de hibridização com RNA homólogo e RNA não homólogo.....	70
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

bpy – 2,2'- bipyridila

CV – Cyclic Voltammometry

cDNA – DNA complementar

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DNA – Deoxyribonucleic acid

ds-DNA - double stranded DNA

E_f – Potencial final

ELISA IgG – Enzyme Linked Immunosorbent Assay of Immunoglobulin G capture.

E_{max} – Potencial máximo

E_{min} - Potencial mínimo

FDC – Febre Dengue Clássica

FET – Field Effect Transistor

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

HEMOPE – Instituto de Hemoderivados de Pernambuco

Hz – Hertz

I_f – Corrente faradaica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

ISE – Ion – Selective Electrode

ISFET – Ion-Selective Field Effect Transistor

LMC – Leucemia Mielocítica Crônica

LSV – Linear Sweep Voltammetry

MAC-ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay of IgM capture.

MCQ – Microbalança de Cristal de Quartzo

NIST – National Institute of Standard and Technology

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial Hidrogeniônico

Ph – Philadelphia chromosome

phen – 1,10-phenantronin

ppy – polypirrol

QCM – Quartz Crystal Microbalance

RNA – Ribonucleic acid

RT-PCR – Reverse Transcriptase followed by the Polymerase Chain Reaction.

SCE – Saturated Calomel Electrode

SPR - Surface Plasmon Resonance

ss-DNA – single stranded DNA

t – tempo

t_1 – tempo inicial 1

RESUMO

In the world, investments for the development of new diagnoses methods of genetic and infectious diseases are becoming very often. DNA biosensors (Genosensors) appear as a new alternative efficient, good sensibility and lower cost. In this work the development of news alternatives supports for nucleic acids immobilization was reached with success. The composition of graphite with an hardener based of polymercaptans resulted in a rigid support, very easy to manipulate faster hardening in room temperature and DNA chemistry affinity. This support showed very good result of immobilization and sensibility. At the same time, a new methodology of DNA probe hybridization with its own complementary stranded was showed, without chemical indicators or electrochemical methods. A thin layer of chitosan film was prepared chemically based with NaOH and was used to modify gold electrode from quartz crystal microbalance (QCM). This film showed good performance for nucleic acid immobilization, with better stability of immobilization in comparison with nucleic acid directly immobilized onto electrode surface (QCM). Piezoelectric biosensor was developed for nucleic acid for leukemia detection. This device showed good performance without electrode modification. A new methodology of hybridization via dry-adsorption in different temperature conditions showed excellent performance at 60°C. The LMC biosensor exhibited excellent specificity, when hybridization assay with different RNA's and ss-cDNA (*E.coli*) sequences was executed. The LMC biosensor (QCM) is a satisfactory tool to LMC diagnose.

ABSTRACT

In the world, investments for the development of new diagnoses methods of genetic and infectious diseases are becoming very often. DNA biosensors (Genosensors) appear as a new alternative efficient, good sensibility and lower cost. In this work the development of news alternatives supports for nucleic acids immobilization was reached with success. The composition of graphite with an hardener based of polymercaptans resulted in a rigid support, very easy to manipulate faster hardening in room temperature and DNA chemistry affinity. This support showed very good result of immobilization and sensibility. At the same time, a new methodology of DNA probe hybridization with its own complementary stranded was showed, without chemical indicators or electrochemical methods. A thin layer of chitosan film was prepared chemically based with NaOH and was used to modify gold electrode from quartz crystal microbalance (QCM). This film showed good performance for nucleic acid immobilization, with better stability of immobilization in comparison with nucleic acid directly immobilized onto electrode surface (QCM). Piezoelectric biosensor was developed for nucleic acid for leukemia detection. This device showed good performance without electrode modification. A new methodology of hybridization via dry-adsorption in different temperature conditions showed excellent performance at 60°C. The LMC biosensor exhibited excellent specificity, when hybridization assay with different RNA's and ss-cDNA (*E.coli*) sequences was executed. The LMC biosensor (QCM) is a satisfactory tool to LMC diagnose.

1. INTRODUÇÃO

O campo de diagnóstico molecular tem se expandido rapidamente nas últimas décadas, fortemente influenciado pelo progresso do Projeto Genoma Humano. A detecção de seqüências específicas de bases em ácidos nucleicos humanos, virais e bacterianos vem crescendo de importância no diagnóstico de doenças (Wang, 2003). Análises gênicas e o estudo da regulação genética são fundamentais no desenvolvimento do diagnóstico molecular e na descoberta de novos fármacos. Na intenção de aperfeiçoar a atenção ao paciente, laboratórios de diagnóstico molecular têm sido desafiados a desenvolver novos testes que sejam confiáveis, de baixo custo e precisos, e também otimizar os protocolos já existentes, tornando-os mais rápidos e econômicos (Lucarelli *et al.*, 2004).

1.1 DENGUE

A detecção e identificação de doenças genéticas e infecciosas, sendo estas últimas, causadas por microrganismos patogênicos e vírus, nem sempre é uma tarefa fácil e eficiente de ser executada. O quadro clínico da febre dengue clássica (FDC), por exemplo, é muito variável, iniciando com uma súbita febre (39 a 40°C) acompanhada de cefaléia, mialgia, prostração, artralgia, anorexia, astenia, dor retroorbital, náuseas, vômitos, exantema e prurido cutâneo, com uma duração de 5 a 7 dias. A febre hemorrágica da dengue (FHD) traz as mesmas características iniciais da dengue clássica, porém evolui rapidamente para manifestações hemorrágicas, hepatomegalia e trombocitopenia com hemoconcentração concomitante, podendo chegar a mais severa forma da FHD: a Síndrome de Choque da Dengue (Su *et al.*, 2003).

As principais doenças a serem consideradas no diagnóstico diferencial da dengue clássica são: gripe, rubéola, sarampo e outras infecções virais, bacterianas e exantemáticas. As doenças a serem consideradas com o diagnóstico diferencial da FHD são: leptospirose, febre amarela, malária, hepatite infecciosa e influenza. Diagnósticos laboratoriais específicos da Dengue, são designados por: pesquisa de vírus (isolamento: cultura de células C6/36, detecção de ácido nucleico: RT-PCR); detecção de anticorpos (ensaio imunoenzimático: MAC-ELISA, ELISA IgG, inibição de hemaglutinação); exame histopatológico e detecção de antígeno por

imunohistoquímica (Nogueira *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1999) [Fund. Nac. Saúde (a), 2003], consistindo a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (RCP) em ampliar a seqüência genética específica, para que uma única molécula de DNA possa ser detectada entre milhões de outras. Esta técnica é mais sensível e específica, porém envolve complexa manipulação e cuidados especiais para evitar contaminação das amostras. O vírus da dengue é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, pertencente à família *Flaviviridae*, ocorrendo como quatro sorotipos antigenicamente diferentes, conhecidos como DENGUE-1, 2, 3 e 4 (Su *et al.*, 2003).

Como exemplos claros da dificuldade para a detecção e identificação de doenças infecciosas, em Salvador-BA, durante o período de 10 de março a 02 de novembro de 1996, a vigilância sanitária registrou 326 casos de leptospirose, entretanto, antes das admissões em hospital foram diagnosticados erradamente 42% dos casos como sendo a febre dengue (Ko *et al.*, 1999). No Estado do Rio de Janeiro, durante os períodos de epidemias do dengue, dificuldades em realizar contagens rotineiras de hematócritos e plaquetas resultou na não caracterização de vários casos da dengue clássica, tipo 1 e tipo 2 e da FHD. Este fato é provavelmente responsável pelos altos índices dos casos fatais da dengue, não só no Rio de Janeiro, mas em todo Brasil. É estimado que no mundo haja mais de 2.5 bilhões de pessoas em área de risco, e mais de 60 milhões de casos e aproximadamente 30.000 mortes por ano, se tornando um dos mais sérios problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (Baeumner *et al.*, 2002) (Su *et al.*, 2003).

1.2 TUBERCULOSE

Enquadra-se também a essa situação (epidêmico e de quadro clínico variado) a tuberculose, um importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Estima-se que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados pelo *Mycobacterium tuberculosis* correspondendo a 30% da população mundial (Fund. Nac. Saúde (b), 2003). O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído de várias espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Outras espécies de micobactérias podem produzir quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessário para diagnóstico diferencial cultura e identificação das mesmas, pelos laboratórios de referência. O diagnóstico da tuberculose deverá ser fundamentado nos seguintes métodos: exame específico

(baciloscopia e cultura), radiológico, prova tuberculínica, anátomo-patológico (histológico e citológico), sorológico bioquímico e de biologia molecular.

1.3 LEUCEMIAS

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), doenças genéticas são importantes problemas de saúde internacional, como exemplo, as leucemias.

A leucemia corresponde ao câncer de uma das células do sangue. As formas mais comuns de leucemia são divididas em quatro categorias: mielocítica e linfocítica, podendo cada uma ser aguda ou crônica. Os termos mielocítica e linfocítica indicam o tipo de célula envolvida na doença. Depois de instalada, a leucemia aguda progride rapidamente, exigindo com isso que o tratamento seja iniciado logo após o diagnóstico.

As leucemias constituem um grupo de doenças com patogênese semelhante, mas de manifestações clínicas diferentes. Apresenta em comum o fato de representarem doenças neoplásicas proliferativas das células hematopoéticas ou seus precursores, incapacidade funcional destes elementos. A leucemia linfocítica aguda é a doença maligna mais comum nas crianças respondendo por cerca de um quarto de todos os cânceres da infância. A estimativa nos Estados Unidos da América é de 3.000 casos novos ao ano, dois terços deles são crianças (3,4 casos/100.000 crianças menores de 15 anos). Nos adultos, o tipo de leucemia mais freqüente é a linfocítica crônica, seguida das mielocíticas. A incidência da leucemia mielocítica crônica (LMC) é de aproximadamente 1 para $1.5/10^5$ casos e a média de idade é entre 40 e 60 anos, porém essa doença pode afetar pacientes de todas as idades (Kalaycio, 2001). A LMC é causada por uma translocação recíproca dos cromossomos 9 e 22 nas células germinativas hematopoiéticas, produzindo uma pequena anormalidade no cromossomo Philadelphia (Ph) (Kalaycio, 2001), que está presente em 90-95% dos pacientes (Mitelman *et al.*, 2001).

A leucemia aguda é originada de uma lesão adquirida no DNA da célula afetada na medula óssea. Os efeitos são crescimento exagerado e descontrolado de células chamadas blastos (células jovens) e o bloqueio da produção de células normais do sangue. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), nas décadas de 1970, 1980 e 1990 observou-se um aumento cumulativo de cerca de 20% na incidência de leucemias agudas. Estudos epidemiológicos têm investigado como

possíveis causas a maior exposição das pessoas a agentes agressores como tabagismo, campo eletromagnético e irradiação ionizante. Apenas o cigarro está comprovadamente ligado ao aumento de incidência de leucemia.

O diagnóstico de leucemia é suspeitado pelo quadro clínico (quadro 1) somado ao hemograma alterado (quadro 2) e confirmado pelo exame da medula óssea, chamado de mielograma.

QUADRO 1:

Alteração no sangue, manifestações clínicas correspondentes: Anemias, fadiga, cansaço fácil, palidez, taquicardia, diminuição das plaquetas, sangramentos, púrpuras, hematomas, petéquias, diminuição dos neutrófilos, infecções, febre, excesso de blastos infiltrando órgãos, aumento do tamanho de gânglios, fígado, baço, dores ósseas, dores articulares.

QUADRO 2:

Alterações no hemograma. Porcentagem aproximada de casos: Anemia 80%; aumento do número de leucócitos 60%; diminuição do número de leucócitos 20-25%; diminuição do número de plaquetas 80-90%; presença de blastos 90-95%.

O mielograma é feito pela aspiração por agulha da medula óssea, geralmente em punção do osso externo ou da crista ilíaca, após anestesia local. Através do material aspirado se procede ao estudo das células com contagem diferencial, avaliação da quantidade dos blastos e de testes citoquímicos (peroxidase e PAS) que permitem classificar a leucemia. Recentemente, outro exame permitiu classificar as leucemias em seus subtipos com mais precisão. Trata-se da imunofenotipagem de medula óssea. O mesmo material aspirado no mielograma, ou o sangue periférico com blastos, é submetido a imunofluorescência direta e análise por citometria de fluxo, definindo assim a linhagem dos blastos leucêmicos.

A investigação da leucemia se completa com o estudo citogenético feito pelo cariótipo com banda G. Através deste exame são analisados os cromossomos das células da medula óssea, para identificar possíveis alterações genéticas que têm

importância no prognóstico da doença e no controle do tratamento. O resultado do cariótipo geralmente demora duas semanas (Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer, 1997).

Entretanto, todas as técnicas de diagnóstico descritas, tanto para o diagnóstico das doenças infecciosas (dengue ou tuberculose) ou genética (leucemias) apresentam desvantagens por sua complexidade, demandar tempo, envolver pessoal qualificado e ser de custo relativamente alto (Zhou *et al.*, 2002).

Surge, então, a necessidade de desenvolver novas técnicas de diagnósticos, simples, rápidas e, sobretudo, de baixo custo.

Atualmente há sinais favoráveis à tecnologia do biossensor, que oferece a vantagem de ser de uso simples, não havendo a necessidade de pessoal qualificado para operá-lo, barato, fácil fabricação, pequeno tamanho, alta sensibilidade e seletividade e de rápida resposta. Podem ser usados em análise clínica, em processos de controle contínuo para a indústria e o meio ambiente (Bogdanovskaya & Tarasevich, 1996). Como ferramenta para diagnósticos clínicos, os biossensores têm sido usados para: seletivamente detectar células, vírus (Teijeiro *et al.*, 1995; Secordel *et al.*, 1996; Erdem *et al.*, 1999; Inoue *et al.*, 1999; Baeumner *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002), materiais biológicos significativos (Ivnitski *et al.*, 1999), reações bioquímicas (Cummings *et al.* 1998) e imunológicas (Scheper *et al.*, 1996; Huber *et al.*, 1999; Rowe *et al.*, 1999; Chou *et al.*, 2002), detecção específica e quantitativa de DNA (Mickelsen 1996; Wang *et al.*, 1997b; Palecek *et al.*, 1998; Pividori *et al.*, 2000; Tombelli *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001), estudo do meio ambiente (Wang *et al.*, 1997c; Marrazza *et al.*, 1999b) e na ciência forense (Pividori *et al.*, 2000). Análises de materiais genéticos têm obtido uma posição avançada nos ensaios de uma ampla variedade de doenças infecciosas. Tais informações são usadas não só para identificar doenças infecciosas, mas também, para determinar a terapia apropriada (Vo-Dinh & Cullum 2000). Sendo o biossensor, no entanto, uma ferramenta útil voltada para o referido propósito. A tecnologia do biossensor vem sendo comercialmente explorada, com um mercado efetivamente promissor, exercendo papel vital no desenvolvimento e melhoramento de diversas áreas, como por exemplo, da saúde e do meio ambiente (Paddle 1996) (Bogdanovskaya & Tarasevich 1996; Reshetilov 1996; Rosatto *et al.*, 2001; Lucarelli *et al.*, 2003), (monitoramento do colesterol e glicose, e a medição da demanda bioquímica de oxigênio-DBO), controle de processos industriais (Harwood & Pouton 1996),

aplicação na área de alimentos (Toko 1998), agricultura (Eun *et al.*, 2002) e biossegurança (Paddle 1996; Weetall 1999; Muhammad-Tahir & Alocilja 2003). Na atualidade grandes investimentos na produção de novos métodos de diagnósticos têm sido feitos nos Estados Unidos da América e na Europa. Segundo o National Institute of Standards and Technology (NIST) dos Estados Unidos da América, investimentos na ordem de Cento e quarenta e cinco milhões de dólares (US\$145.000.000,00), foram efetuados nos últimos cinco anos, para o desenvolvimento de novos equipamentos eficazes, automáticos, portáteis e de baixo custo para a detecção e diagnóstico de doenças em humanos, animais e plantas, utilizando a tecnologia de análise de DNA (Biotechnology Information Center-National Agricultural Library/USDA). No Brasil, investimentos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas vêm se tornando mais freqüentes. O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq tornou público no início do segundo semestre do corrente ano, edital voltado para projetos de pesquisa sobre a dengue, com recursos aplicados no valor de três milhões de reais (R\$ 3.000.000,00) que dentre os vários temas, se encontrava o tema de diagnósticos, solicitando o desenvolvimento de novos kits, de baixo custo e rápida análise (Edital MCT/CNPq/CT – Saúde – N^o 001/2003). Estima-se que para 2005 exista um mercado de cerca de oito bilhões de dólares (US\$ 8.000.000.000,00) com a comercialização dos biossensores.

Biossensores de DNA são uma forte promessa para um rápido, barato e simples diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas, uma proposta oportuna, interessante e atual.

1.4 BIOSSENSOR

Biossensor pode ser definido como um dispositivo capaz de fornecer informação analítica quantitativa ou qualitativa em uma determinada amostra, usando materiais biológicos (antígenos, anticorpos, enzimas, liposomas, ácidos nucleicos, células ou tecidos e organelas, entre outros) para detectar o analito correspondente (espécie química ou biológica) (Sigrist & Gao 1999). O elemento biológico é fixado (imobilizado) a um elemento de transdução, que converte o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado (Tapuhi *et al.*, 1996; Wilson & Walker 1997; Braguglia 1998; Pereira *et al.*, 2002). Este sinal pode ser resultante de alterações na concentração de prótons, liberação ou captação de gases, de íons específicos (NH_4^+ , cátions monovalentes, CN^- , I^-), calor, massa, absorvância, condutância ou transferência de elétrons (Wilson & Walker 1997; Eggenstein *et al.*, 1999). O conceito moderno de biossensor desenvolveu-se em 1962 quando Clark e colaboradores propuseram o primeiro biossensor eletroquímico à glicose usando glicose oxidase fisicamente imobilizada em uma membrana de celulose recuperada acoplada a um eletrodo de oxigênio (Zhang *et al.*, 2000).

1.5 TRANSDUTORES

A natureza do transdutor e o parâmetro de transdução dependem do tipo de evento bioanalítico relacionado com a detecção do analito (substrato) (Sethi 1994). De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, o transdutor pode ser classificado em: eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos e condutimétricos) (Harwood & Pouton 1996; Chaubey & Malhotra 2002), eletromagnéticos [acústicos ou piezelétricos (que são sensíveis às variações de massa, densidade e viscosidade) (Storri *et al.*, 1998; Skladal 2003) e ópticos (por fluorescência, luminescência e ressonância plasmática em superfície) (Sethi 1994; Collings & Caruso 1997)], e os calorimétricos (Eggins 1996; Morgan *et al.*, 1996; Chaubey & Malhotra 2002). O transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico, deve detectar apenas um reagente ou produto

específico, não respondendo a outras substâncias (espécies) presentes na amostra a ser analisada.

1.5.1 Transdutores Eletroquímicos

Os transdutores eletroquímicos são os mais freqüentemente usados em biossensores. Estão baseados no fato de que durante o processo de bio-interação, espécies eletroquímicas (elétrons) são consumidas ou geradas, produzindo um sinal eletroquímico, e o modo de transdução desse sinal torna importante o conhecimento da técnica a ser usada. Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações atuais das chamadas técnicas eletroanalíticas. Uma de suas mais importantes características relaciona-se com o fato destas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroanalíticas são adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesses nas diferentes áreas de estudo (Souza *et al.*, 2003). A técnica a ser utilizada necessita de equipamento e eletrodos apropriados, sendo o equipamento referido um potenciostato, que tem a função de controlar o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e permitir a medição da corrente que passa por este. Um potenciostato, conforme a técnica a ser utilizada, requer uma célula eletroquímica com três eletrodos. Um eletrodo de referência que é usado na medida do potencial do eletrodo de trabalho. O eletrodo de referência necessita ter um potencial que seja estável com o tempo e temperatura e que não seja alterado por pequenas perturbações do sistema, ou seja, pela passagem de uma pequena corrente. Os mais comuns eletrodos de referência usado em laboratório são os eletrodos de Calomelanos Saturados (SCE) ($\text{Hg}_2\text{Cl}_2/\text{Hg}$) e o de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl). Um eletrodo auxiliar que é geralmente um condutor inerte, por exemplo, platina ou grafite, que completa o circuito da célula. E um eletrodo de trabalho que é geralmente sólido. O eletrodo de mercúrio é o único eletrodo líquido à temperatura ambiente (com a exceção rara de eletrodos de gálio e de amálgama), e tem sido usado como eletrodo gotejante. A corrente que flui na

solução via o eletrodo de trabalho, deixa a solução via o eletrodo auxiliar. Os eletrodos são imersos em um eletrólito (solução eletricamente condutiva). O conjunto de eletrodos, solução e o recipiente que contém a solução são chamados de célula eletroquímica. Transdutores eletroquímicos são classificados em três tipos, sendo amperométricos, potenciométricos e condutimétricos.

1.5.1.1 Amperométricos

Os transdutores amperométricos medem o fluxo de corrente elétrica através de uma célula eletroquímica, submetida a um potencial constante. A corrente gerada pela reação redox do analito é diretamente proporcional à concentração do analito na superfície do eletrodo. O método amperométrico pode fornecer alta sensibilidade (10^{-7} a 10^{-8} moles/L) por análise de espécies eletroativas presentes numa amostra biológica (Chaubey & Malhotra, 2002). A maior parte dos compostos biológicos relevantes, tais como glicose, uréia, colesterol, não são eletroativos, sendo necessário criar uma combinação adequada de reações para produzir uma espécie eletroativa. Ainda mais, em muitos casos a seletividade dada por um potencial constante aplicado não é suficiente para distinguir as várias espécies eletroativas, e é requerida uma maior seletividade. Este método de detecção basicamente envolve a aplicação de um potencial constante entre um eletrodo de trabalho (Pt, Au ou C) ou um arranjo de eletrodos com seu respectivo eletrodo de referência (Ag/AgCl ou Calomelanos), o qual pode também servir de eletrodo auxiliar, caso as correntes sejam abaixo de 10^{-9} a 10^{-6} A. Sensores amperométricos têm a vantagem de serem confiáveis, baratos e altamente sensíveis, podendo ser empregados em análise clínicas, ambientais e industriais (Chaubey & Malhotra, 2002).

Há uma variação na técnica amperométrica, ou seja, a que registra vários pontos numa região escolhida do perfil de corrente-potencial, a voltametria. Este método consiste na aplicação ao eletrodo de trabalho de um potencial variando continuamente com o tempo, o que conduz à ocorrência de reações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas na solução (reações faradaicas). A sua principal utilização tem sido para diagnosticar mecanismos de reações eletroquímicas, para a identificação de espécies presentes em solução e para a análise semiquantitativa de velocidades de reações. As diferentes técnicas voltamétricas (técnica de varrimento) que são usadas são diferenciadas uma da outra primeiramente pela função do

potencial que é aplicado ao eletrodo de trabalho para dirigir a reação, e pelo material usado como eletrodo de trabalho. Voltametria de Varrimento Linear (LSV) e Voltametria Cíclica (CV) (onde a direção de varrimento é invertida para um certo potencial escolhido), são as formas da técnica de varrimento conhecida. Em voltametria de varrimento linear, o varrimento de potencial é feito apenas numa direção, parando num valor escolhido, E_f , por exemplo, para $t = t_1$. A direção do varrimento pode ser positiva ou negativa e, em princípio, a velocidade de varrimento pode ter qualquer valor. Em Voltametria Cíclica, ao atingir $t = t_1$, a direção de varrimento é invertida, e variada até E_{min} , e depois invertida e variada para E_{max} , etc.

Os parâmetros importantes são:

- O potencial inicial, E_i .
- A direção de varrimento inicial
- A velocidade de varrimento, v .
- O potencial máximo, E_{max}
- O potencial mínimo, E_{min}
- O potencial final, E_f

Uma corrente faradaica, I_f , devido à reação do eletrodo, é registrada na zona relevante de potencial onde ocorre a reação do eletrodo (Souza *et al.*, 2003).

1.5.1.2 Potenciométricos

O transdutor potenciométrico mede o potencial no eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, funcionando sob condições de equilíbrio (corrente nula). O transdutor pode ser um eletrodo íon-seletivo (ISE) que é um sensor eletroquímico baseado em um filme delgado ou membrana seletiva como elemento de reconhecimento que detecta, por exemplo, F^- , I^- , CN^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , H^+ , NH_4^+ ou gás (CO_2 , NH_3) em matrizes biológicas complexas, pela sensibilidade nas alterações de potencial no eletrodo, quando o íon se liga a uma membrana trocadora apropriada (Chaubey & Malhotra, 2002). Transdutores potenciométricos baseados em ISE têm sido comercialmente bem sucedidos em inúmeras aplicações comerciais, determinação de gases, monitoramento ambiental de poluentes como o dióxido de carbono. A diferença de potencial entre os eletrodos de referência e de trabalho é proporcional ao logaritmo da concentração da espécie ativa. O uso de eletrodos potenciométricos em análises clínicas começou no início do século

passado com o eletrodo de vidro de pH. Um desenvolvimento importante foi o aparecimento do eletrodo de potássio usando a valinomicina como transportador de carga neutro (Morgan *et al.*, 1996).

Transistores de efeito de campo (FET) também têm sido usados como biossensores. Os transistores de efeito de campo íon seletivo (ISFET) usam membranas, idênticas às que são usadas em eletrodos íon seletivo, sobre a porta do FET (Koncki *et al.*, 2000).

1.5.1.3 Condutimétricos

O transdutor condutimétrico mede a mudança na condutância entre um par de eletrodos metálicos como consequência de um componente biológico. Biossensor condutimétrico faz uso da mudança da condutância que resulta da geração do produto de uma reação enzimo-catalítica. A enzima é usualmente imobilizada na superfície do eletrodo, feitos de metais nobres (Au, Ag, Cu, Ni ou Cr), e uma interação específica com o analito leva a produção de espécies (quando um campo elétrico é aplicado) que modificam a condutância na camada enzimática. Por exemplo, quando a úrea é convertida para o seu produto iônico NH_4^+ pela enzima urease, a medida do aumento da condutância na solução é proporcional à concentração de úrea (Morgan *et al.*, 1996).

1.5.2 Transdutores Eletromagnéticos

Os transdutores eletromagnéticos estão fundamentados no fenômeno físico do eletromagnetismo (Quando uma carga elétrica encontra-se estacionária, ou estática, produz forças elétricas sobre as outras cargas situadas na mesma região do espaço, quando está em movimento, produz, além disso, efeitos magnéticos). Os efeitos elétricos e magnéticos dependem da posição e do movimento relativos das partículas carregadas. Os irmãos Curie demonstraram em 1880 que cristais de sal de Rochelle podia produzir eletricidade quando submetidos a uma pressão e direção cristalográfica. Anos após, provaram que o efeito reverso poderia ser efetuado, isto é, produção de uma deformação pela aplicação de eletricidade. Esse efeito passou a ser conhecido como Piezeletricidade (do grego *pienzen* = pressão) (Ngeh-Ngwainbi *et al.*, 1990).

1.5.2.1 Transdutores Acústicos

Transdutores acústicos ou piezelétricos são dispositivos de onda acústica, que operam no espectro de ultra-som com frequências na ordem de 10^5 a 10^6 Hz. Nesta faixa encontram-se as frequências das vibrações elásticas de certos materiais, incluindo os cristais piezelétricos naturais, tais como, cristal de quartzo (SiO_2), niobato de lítio (LiNbO_3), óxido de zinco (ZnO), arseniato de gálio (GaAs), sulfeto de cádmio (CdS), tantalato de lítio (LiTaO_3), tormalina e sal de Rochelle. Cerâmicas (fabricadas com uma mistura de chumbo, zircônio e titânio) e polímeros sintetizados (como o cloreto de polivinila e o difluorpolietileno) têm sido desenvolvidos com propriedade piezelétrica (Morgan *et al.*, 1996). O fenômeno da piezeletricidade é próprio de cristais com estrutura anisotrópica, que não tem centro de simetria. A direção do dipolo é orientada por um eixo polar, quando um cristal deste tipo é colocado em condições de estresse (comprimindo ou deformando elasticamente), o dipolo é realinhado determinando o aparecimento de um campo elétrico. Também é possível aplicar um campo elétrico sobre o material piezelétrico provocando uma deformação, e estas variações mecânicas no cristal podem seguir as variações de direção da mesma maneira que a perturbação elétrica (efeito piezelétrico reverso) (figuras 1a,b,c,d) (Varela *et al.*, 2000).

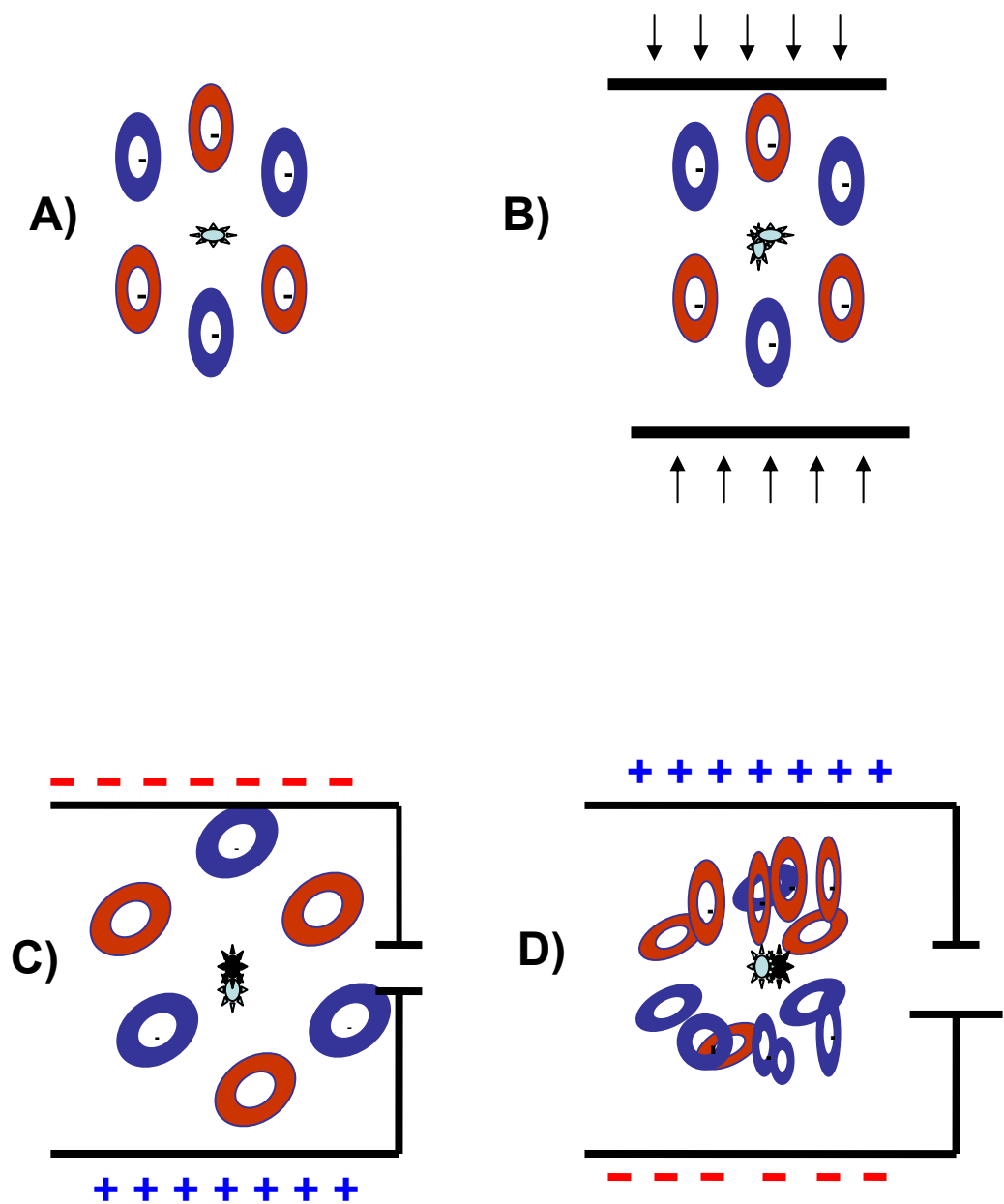


Figura 1. Um modelo bidimensional de um cristal piezelétrico é mostrado acima. (A) Os centros das cargas positivas e negativas no cristal coincidem.(B) Quando o cristal é comprimido, os íons movem-se como indicado, causando a separação dos centros das cargas positivas e negativas. Esta separação gera um momento dipolar resultante no cristal e um movimento de carga, que é uma corrente. Quando a pressão no cristal cessa, a corrente movimentam-se na direção oposta (C) Se uma voltagem com a polaridade indicada é aplicada, os átomos movem-se como

indicado, e o resultado é uma expansão do cristal. (D) Se uma voltagem oposta for aplicada, os átomos movem-se como indicado, e o resultado é uma compressão do cristal.

Portanto, uma voltagem aplicada pode deformar mecanicamente um cristal. Quando uma voltagem é aplicada através das faces opostas, os cátions movem-se para o eletrodo negativo e os ânions para o eletrodo positivo. Uma voltagem aplicada faz com que o campo elétrico comprima o cristal, e na direção oposta, expande o cristal.

1.5.2.2 Cristal Piezelétrico de Quartzo

Qualquer corpo possui uma freqüência natural de vibração. As vibrações mecânicas fazem com que as forças elásticas entrem em ação, determinando o modo como essas vibrações se realimentam e, portanto a freqüência natural com que o corpo tende a oscilar. Os cristais piezelétricos de quartzo, em consequência do fato de apresentarem uma polarização elétrica em suas faces devido a deformações, têm outras propriedades importantes consequentes. Uma dessas propriedades é a ressonância. As vibrações vão ocorrer na sua freqüência de ressonância, ou então em harmônicas. A freqüência mais baixa que um cristal pode produzir é a denominada fundamental. No caso do cristal de quartzo, as suas dimensões e também as forças elásticas que agem no seu interior (que dependem da direção de sua atuação determinada pelo corte), fazem com que ele tenda a vibrar sempre numa única freqüência quando excitado mecanicamente ou eletricamente. Na prática, é possível cortar um cristal de forma que ele vibre fisicamente a uma freqüência desejada, quando está sujeito a um potencial alternado. A grande vantagem é que esses cristais podem ser cortados com alta precisão, de forma a oscilarem a uma freqüência com um erro de apenas 10 Hz/MHz na faixa de temperatura de 0 a 50⁰C. Os distintos tipos de cristais são obtidos dependendo do ângulo de corte em relação ao eixo do monocristal. O modo como o cristal é cortado influi na maneira como ele pode vibrar e também a intensidade com que o efeito piezelétrico se manifesta. Quanto maior for a freqüência que um cristal deve produzir, menor devem ser suas dimensões. Os mais comuns para análises químicas e biológicas são os de corte AT, BT e SC, definidos de acordo com o

ângulo de corte em relação ao eixo z, como por exemplo, 35° e -45° para os cortes AT e BT, respectivamente. Os mais utilizados são os de corte AT devido ao coeficiente de dependência com a temperatura ser praticamente zero (Morgan *et al.*, 1996; Varela *et al.*, 2000). Os cristais piezelétricos de quartzo disponíveis comercialmente são geralmente de 9 ou 10 MHz. Estes são construídos pela deposição de finíssimos filmes metálicos (ouro, prata, níquel, platina, etc.) sobre ambos os lados de uma lâmina circular de quartzo (figura 2).

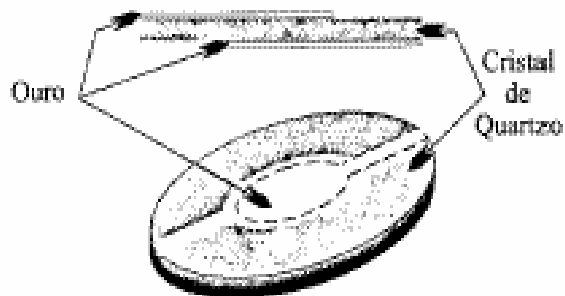


Figura 2. Vista superior e lateral de um cristal de quartzo com depósitos metálicos em ambos os lados (Fonte: Varela *et al.*, 2000).

Os eletrodos (depósito metálico) são conectados diretamente a dois pinos presos a um suporte de cerâmica, como observado na figura 3.

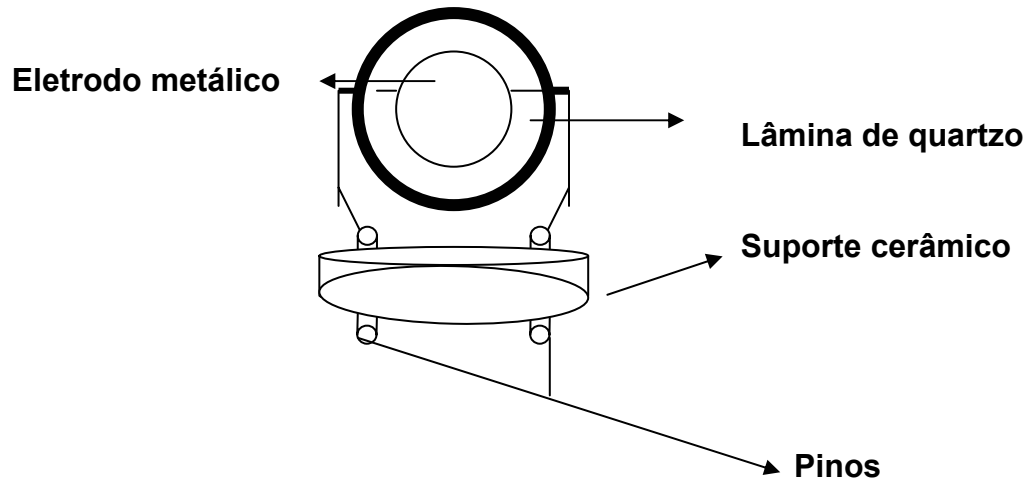


Figura 3. Cristal piezelétrico de quartzo.

A lâmina de quartzo entre os dois eletrodos que aplicam um campo elétrico oscilante, resultando numa onda estacionária dentro da lâmina (cisalhamento) (figura 4) e em oscilações mecânicas para freqüências de ressonância, geralmente na zona de 2 MHz a 20 MHz. Uma lâmina de quartzo de $320 \mu\text{m}$ oscila cerca de 5MHz. Para esta freqüência uma variação de massa de 18 ng.Cm^{-2} de um eletrodo causa uma variação de freqüência de 1 Hz (Varela *et al.*, 2000). Um cristal sozinho não pode entrar em vibração espontaneamente. A excitação que coloca um cristal em oscilação e depois mantém esta oscilação é obtida por meio de um circuito especial, o circuito oscilador. A medição da freqüência é feita através de um contador de freqüência (Towery *et al.*, 2001).

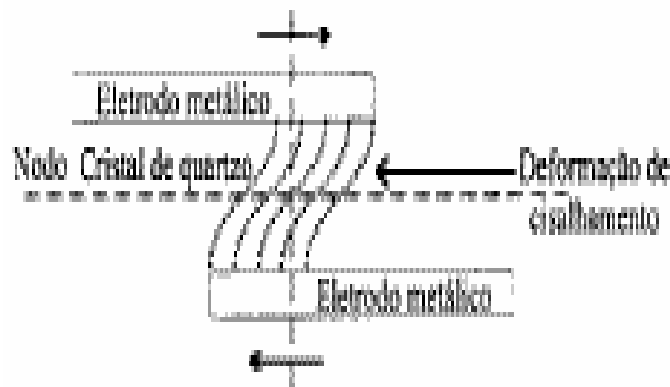


Figura 4. Nodo da onda acústica passando pelo centro do disco e a deformação causada pelo cisalhamento (Fonte: *Varela et al.*, 2000).

As variações na freqüência que correspondem a uma adição ou subtração de massa podem ser descritas utilizando a equação de Sauerbrey (*Varela et al.*, 2000):

$$\Delta F = -2.3 \times 10^6 F^2 \Delta M/A = -K\Delta M$$

onde ΔF é a variação de freqüência de ressonância em Hz, F é a freqüência fundamental do cristal, A é a área geométrica piezeletricamente ativa em Cm^2 , definida pela projeção dos filmes metálicos depositadas sobre o cristal e ΔM é o gradiente de massa depositada. E em sua forma simplificada, K é a constante que se refere à freqüência básica do cristal e a área coberta.

1.5.2.3 Microbalança de Cristal de Quartzo (MCQ)

A MCQ é extremamente sensível, capaz de medir níveis de sub-nanograma de alteração de massa (Daikhin *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001; Duman *et al.*, 2003), podendo ser associado com sistemas eletroquímicos (Eickes *et al.*, 2000; Varela *et al.*, 2000; Lassalle *et al.*, 2001). Transdutores acústicos têm a vantagem de envolver tecnologia mais simples e não necessitam de espécies eletroativas ou previamente marcadas para transdução, (Ngeh-Ngwainbi *et al.*, 1990; Storri *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 1998; Lange *et al.*, 2003). Dentre as diversas áreas de aplicação, a MCQ em biotecnologia pode ser aplicada em:

- Interações de DNA e RNA com suas fitas complementares (Larsson *et al.*, 2003; Towey *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001; Tombelli *et al.*, 2000; Caruso *et al.*, 1997)

- Reconhecimento específico de proteínas ligantes pelo receptor imobilizado, reações imunológicas (Stanley *et al.*, 2003; Storri *et al.*, 1998).

- Detecção de vírus, bactérias, células de mamíferos (Vaughan *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2002; Chou *et al.*, 2002)

- Adesão de células, liposomos e proteínas (Liu *et al.*, 2003; Rickert *et al.*, 1997)

- Biocompatibilidade de superfície (Skladal 2003; Mannelli *et al.*, 2003; Lassalle *et al.*, 2001)

- Formação e prevenção de formação de biofilmes (Varela *et al.*, 2000; Daikhin *et al.*, 2000; Nicolini *et al.*, 1997).

1.5.2.4 Transdutores Ópticos

Sistemas ópticos de detecção estão sendo usados em sensores e biossensores (Kovács *et al.* 2003), incluindo entre outros, elipsometria, espectroscopia (luminescência, fosforescência, fluorescência, raman) (Chen *et al.*, 1998), interferometria (interferometria de luz branca e interferometria modal) e Ressonância de Plasma de Superfície (SPR- Surface Plasmon Resonance)(Löfas & Johnsson 1990, Morgan *et al.*, 1996). Sensores ópticos baseados na tecnologia da onda evanescente têm sido usados para a detecção da interação DNA-DNA (Lu *et al.*, 2000, Nakamura *et al.*, 2003). A onda evanescente é uma onda eletromagnética

que é gerada quando a luz é completamente refletida dentro da superfície sensora (reflexão interna total) (Sethi 1994; Morgan *et al.*, 1996; Kleinjung *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 2001; Luppá *et al.*, 2001; Qiu *et al.*, 2003). A tecnologia do biossensor de SPR é baseada na excitação da superfície plasmática presente dentro de um filme metálico do sensor (fenômeno de superfície, que é monitorado a medida da mudança do índice de refração devido) (Silin & Plant 1997). O efeito de ressonância de plasma de superfície é uma oscilação da densidade da carga longitudinal, ao longo da interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é metal (Ag, Au, Cu, Al) e o outro um dielétrico (Carvalho *et al.*, 2003). Essa tecnologia vem sendo usada em diferentes tipos de analitos, como por exemplo, a determinação de riboflavina em leite (Caelen *et al.*, 2004), estudo da hibridização de DNA (Malicka *et al.*, 2003).

1.5.3 Transdutores Térmicos (Calorimétricos)

A maioria dos processos bioquímicos envolve a mudança da entalpia. Reações enzimáticas estão associadas com mudanças elevadas da entalpia molar em uma escala de 20-100 KJ mol⁻¹ (Morgan *et al.*, 1996) Dois tipos de técnicas têm sido desenvolvidas: (1) calorímetro adiabático, que mede a ausência de troca de calor entre a célula e o meio ambiente; (2) calorímetro de condução de calor, que envolve a medida da transferência de calor da célula para a sua vizinhança. Tais princípios têm sido aplicados para análises de compostos bioquímicos em microcalorímetro. Os compostos são imobilizados sobre a superfície ou na vizinhança de materiais sensíveis a temperatura (Transdutores calorimétricos) (Bataillard 1993). Um dos mais promissores campos de aplicação de biossensores calorimétricos é a biotecnologia, por exemplo, em áreas específicas como a fermentação e análises do meio ambiente, lactose, etanol, celobiose, penicilina e sacarose têm sido medidas por sensores calorimétricos (Danielson *et al.*, 1992).

1.6 BIOSSENSORES DE DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma das moléculas mais importante. A estrutura única complementar do DNA entre seus pares de bases adenina/timina e citosina/guanina tem sido a base para estudos genéticos nos últimos anos, contendo e transmitindo informações genéticas em todos os organismos (procariotos, eucariotos e vírus). Há 50 anos Francis Crick e James Watson concluíram que a molécula do DNA tem a estrutura de uma dupla hélice, que se enrolam. A forma de dupla hélice do DNA (double-stranded DNA ou ds-DNA), é composta de duas “fitas” que se juntam através de ligações de pontes de hidrogênio (ligações fracas), entre os seus pares de bases, que podem ser quebradas (desnaturada) por aquecimento ($\approx 100^{\circ}\text{C}$), pH elevado (≈ 10) ou no uso de solventes apróticos. A fita simples do DNA (single stranded DNA ou ss-DNA) é relativamente estável, porém revertida às condições de desnaturação, a molécula irá se anelar (renaturar) dentro se sua configuração original, esse fenômeno é conhecido como **hibridização** (Junhui *et al.*, 1997).

1.6.1 Hibridização do Ácido Nucléico

Métodos convencionais para análise da seqüência gênica específica são baseados tanto no sequenciamento direto quanto na hibridização do DNA. Por causa da sua simplicidade, a técnica da hibridização é a mais comumente usada nos diagnósticos laboratoriais do que o método de sequenciamento direto. Na hibridização do DNA, a seqüência gênica alvo é identificada por uma **sonda de DNA** que pode formar um híbrido duplo hélice com o seu ácido nucléico complementar, sendo esse reconhecimento altamente eficiente e específico na presença de uma mistura de vários ácidos nucléicos diferentes, não-complementares. Sonda de DNA também conhecida como sonda gênica, são oligonucleotídeos fita simples, marcados com materiais radioativos ou não radioativos, que têm a função de atribuir sinais de hibridização de DNA detectáveis (Yang *et al.*, 1997). Um **biossensor de DNA** ou **genossensor**, normalmente utiliza sonda de DNA imobilizada como elemento de reconhecimento específico do processo de formação de DNA-DNA, DNA-RNA e a interação entre proteínas ou moléculas reagentes ao DNA na superfície sensora.

A hibridização do DNA tem sido conduzido em uma variedade de superfícies eletroquímica, de fibra ótica, onda evanescente e sensores de onda acústica (Junhui *et al.*, 1997; Pividori *et al.*, 2000; Tombelli *et al.*, 2001).

1.6.2 TRANSDUTORES DE DNA

Os transdutores mais promissores para os biossensores de DNA são os piezelétricos (Caruso *et al.*, 1997a; Zhang *et al.*, 1998), ópticos (Kleinjung *et al.*, 1997) e eletroquímicos (Pang *et al.*, 1996; Wang 2002).

1.6.2.1 Transdutor Piezelétrico de DNA

O sensor MCQ foi utilizado para a medida da cinética de hibridização de DNA em solução (Caruso *et al.*, 1997b), estudo dos danos causados pela UV-C sobre DNA imobilizado na superfície do eletrodo do cristal de quartzo em solução (Zhang *et al.*, 1998), monitoramento direto da detecção da apolipoproteína E em conjunto com a reação em cadeia da polimerase. Recentemente MCQ tem sido aplicado na

detecção de doenças genéticas (Zhou *et al* 2001) e infecciosas (Zhou *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003).

Diferentes procedimentos para a imobilização de DNA na superfície do eletrodo do cristal de quartzo (Au, Ag, Pt, etc.) são reportadas (Lassalle *et al.*, 2001). Geralmente o DNA é imobilizado no eletrodo do cristal de quartzo por adsorção ou ligação covalente (Zhang *et al.*, 1998; Chou *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003), ligações cruzadas (Towery *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2002), e ainda por complexação Avidina-biotina (Caruso *et al.*, 1997b; Tombelli *et al.*, 2000).

Neste caso, uma seqüência de DNA é imobilizada na superfície de um cristal piezelétrico (eletrodo de quartzo piezelétrico ou microbalança de cristal de quartzo-QCM), que tem sua resposta em freqüência alterada (devido à diferença de massa) quando ocorre o reconhecimento da seqüência de DNA complementar (Skuridin *et al.*, 1996; Nicolini *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Towery *et al.*, 2001).

1.6.2.2 Transdutores Ópticos de DNA

Dois tipos de sensores ópticos baseados na tecnologia de onda evanescente têm sido usados para a detecção da interação DNA-DNA (Lu *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2003). A onda evanescente é uma onda eletromagnética que é gerada quando uma luz é completamente refletida dentro da superfície sensora (reflexão interna total). A onda evanescente penetra além da interface óptica dentro do mais baixo meio de reflexão por uma distância de comprimento de onda da superfície (normalmente 300 nm) e decai exponencialmente. Piunno *et al.*(1994) desenvolveu um dos primeiros sensores de fibra óptica para o monitoramento da hibridização do DNA. O sensor de fibra óptica é um dos mais usado, o qual está fundamentado na transmissão de luz excitada e transdução da emissão de sinal de marcador fluorescente. Nakamura *et al.* (2003) utilizou a metodologia de imobilização covalente de ss-DNA em fibra óptica (Yang *et al.*, 1997).

A espectrometria de Ressonância de Plasma de Superfície (RPS) pode ser utilizada por uma série de estudos, envolvendo cinéticas de adsorção-dessorção, interações proteína-DNA, DNA-DNA, RNA-RNA (Carvalho *et al.*, 2003).

No emprego da espectrometria de RPS como elemento de transdução dos biossensores de DNA, o ácido nucléico é imobilizado sobre a superfície do metal por adsorção direta, ou por um acoplamento indireto através de uma matriz de carboximetildextrana, ponte avidina-biotina, formando assim, uma camada hidrofílica

que aumenta a sensibilidade do RPS (Tsoi *et al.*, 2000). O método óptico da Ressonância de Plasma de Superfície (RPS) tem sido aplicado para uma detecção direta e rápida da hibridização DNA-DNA (Malicka *et al.*, 2003).

1.6.2.3 Transdutores Eletroquímicos de DNA

O Transdutor eletroquímico (eletrodo) de DNA apresenta a vantagem pela diversidade de suportes utilizados e pela facilidade de modificação dos mesmos (Lu & Ju. 2003). Podendo ser citado como suportes freqüentemente utilizados, grafite pirolítico, pasta de carbono, fibra de carbono, carbono vítreo (esses materiais são quimicamente inertes e possuem uma baixa corrente de fundo e resistividade) (Zhang *et al.*, 2000) e ouro (González-García *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2001). Após modificação com a sonda de ss-DNA ou moléculas específicas (Moser *et al.*, 1997; Pereira *et al.*, 2002), o eletrodo então produzido, é capaz de detectar eletroquimicamente a molécula complementar de DNA (Chen X *et al.*, 1998; Marrazza *et al.*, 1999a; Gooding 2002). A formação do ds-DNA é comumente detectada com o uso de um apropriado indicador eletroativo de hibridização tais como os complexos metálicos catiônicos [Co(phen)₃³⁺, Co(bpy)₃³⁺, Ru(bpy)₃²⁺, Fe(phen)₃²⁺, Fe(bpy)₃²⁺, Cu(phen)₂²⁺ e Cu(TAAB)²⁺ (TAAB- ligante tetraza macrocíclico)] (bpy = 2,2'- bipyridila; phen = 1,10-fenantonina)(Wang *et al.* 1998a; La-Scalea *et al.*, 1998; Pividori *et al.*, 2000), como também, ser constatada por meio da variação de valores de corrente ou potencial (Brabec 1983), sem o uso de um indicador redox ou mediador (Wang *et al.*, 1998b; Wang & Kawde 2001; Chaubey & Malhotra 2002; Ozsoz *et al.*, 2003), podendo ser medida por cronopotenciometria (Wang *et al.* 1997a; Tombelli *et al.* 2001), voltametria cíclica ou de varredura linear (Liu *et al.*, 1996; La-Scalea *et al.*, 1999) ou Stripping potenciometria (Wang *et al.*, 1996a).

1.6.2.3.1 Comportamento Eletroquímico do DNA

O comportamento eletroquímico do DNA e os efeitos de sua adsorção sobre diversos tipos de eletrodos (transdutores) vêm sendo pesquisados há mais de 40 anos (Palecek *et al.*, 1998; Pividori *et al.*, 2000). Pesquisas da oxidação eletroquímica de ácidos nucléicos naturais e sintéticos em meio ácido utilizando eletrodos sólidos (grafite pirolítico, grafite espectroscópico impregnado com parafina e carbono vítreo) demonstraram que só os resíduos das bases purínicas são eletroativas na condição exposta, produzindo dois picos bem definidos correspondentes a eletroxidação dos resíduos de guanina (+0,88V) e adenina (+1,15V) (Brabec 1981; Brett *et al.*, 1994; Jelen *et al.*, 1997; Thorp. 1998).

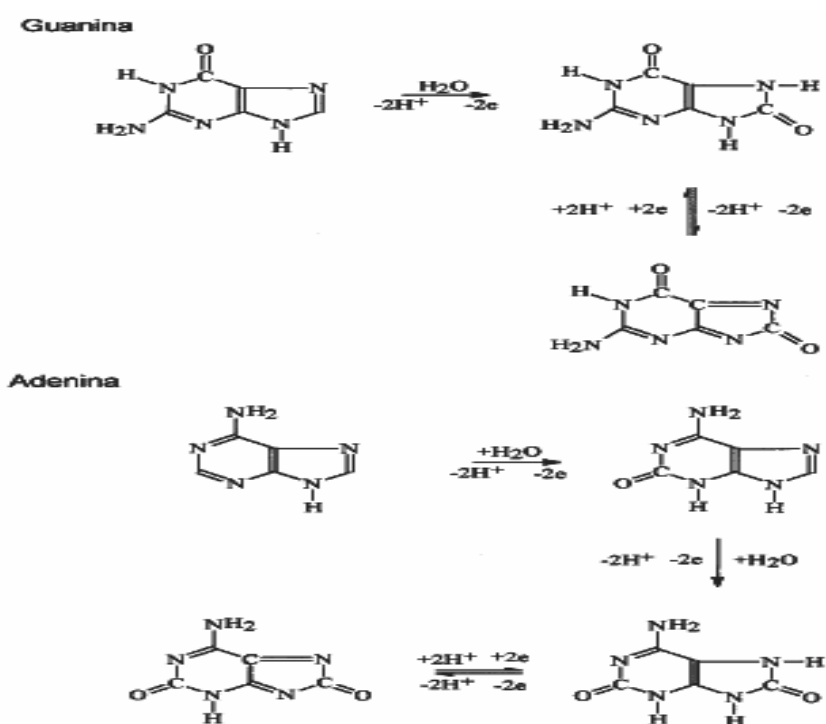


Figura 5. Mecanismo de oxidação para guanina e adenina
(Fonte: La-Scalea *et al.*, 1999).

A oxidação de guanina e adenina compreende duas etapas, ocorrendo a perda de quatro elétrons e quatro prótons, para ambos os casos a primeira etapa é determinante para a velocidade da reação (figura 5) (Brabec 1981).

Observa-se também, que quando comparado ao ss-DNA desnaturado termicamente, o ds-DNA sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação, sendo este fato decorrente dos sítios de oxidação do ds-DNA estarem protegidos, por participarem das ligações de hidrogênio da dupla hélice, e também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção na superfície do eletrodo (La-Scalea *et al.*, 1999). Entretanto, a forma de imobilização da sonda de DNA para o preparo do genosensor é a primeira etapa a ser considerada (Henke & Krull 1999).

1.7 Técnicas de Imobilização de Oligonucleotídeos Purificados em Superfícies Sólidas

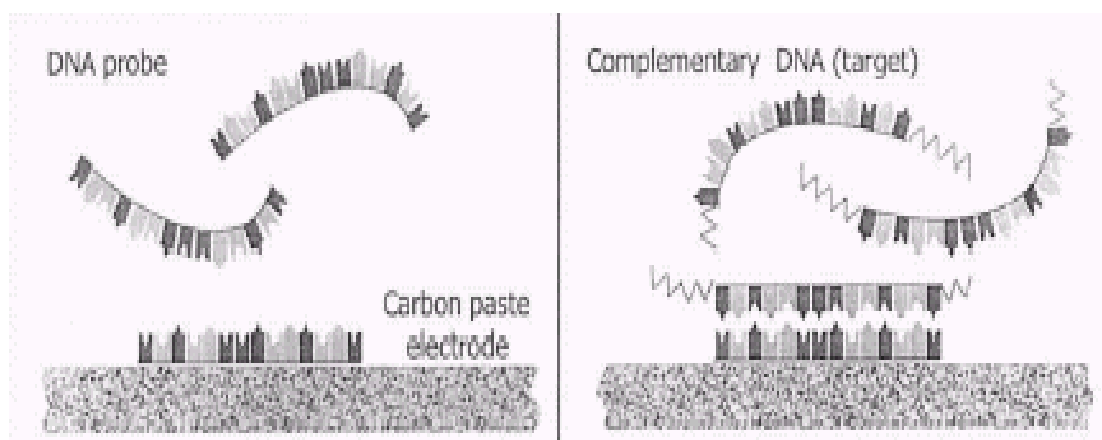
Um grande número de técnicas para imobilização de enzimas e proteínas tem sido desenvolvido (Fatibello Filho e Capelato, 1992; Sethi 1994; Rosato *et al.*, 2001; Chaubey & Malhotra, 2002; Pereira *et al.*, 2002), e muitas dessas técnicas podem ser adaptadas para imobilização de ácido nucléicos em sensores (Yang *et al.*, 1997).

1.7.1 Adsorção

A adsorção é o método mais simples de imobilização de ácido nucléicos em superfícies, uma vez que não há a necessidade do uso de reagentes ou de modificações especiais na estrutura do ácido nucléico. Os materiais reportados para esse tipo de imobilização são: nitrocelulose, membranas de nylon, poliestireno (Sukhorukov *et al.*, 1996), superfícies de óxidos metálicos (paládium ou óxido de alumínio), carbono/pasta de carbono (Pividori *et al.*, 2000). A principal desvantagem desta metodologia é que o ácido nucléico pode ser desadsorvido da superfície devido as condições de hibridização (Yang *et al.*, 1997)

1.7.1.1 Adsorção Eletroquímica

Essa técnica requer a aplicação de um determinado potencial na superfície de um eletrodo de pasta de carbono ou em um eletrodo de carbono “screen-printed” (Wang *et al.*, 1996a; Marrazza *et al.*, 1999a,b), para a imobilização de uma fita simples de DNA (ssDNA). A superfície do eletrodo de pasta de carbono é previamente tratada sendo aplicado um potencial (+1.7 ou 1.8 V) por cerca de um minuto, frente a um eletrodo de referência Ag/AgCl. Genossensor para diagnóstico de DNA de *Mycobacterium tuberculosis*, foi desenvolvido utilizando essa metodologia (Wang *et al.*, 1997). Esse tratamento aumenta a rugosidade e a hidrofiliabilidade da superfície do eletrodo de carbono. A estabilidade da sonda é melhorada devido a atração eletrostática entre a carga positiva na superfície do eletrodo e carga negativa do grupamento fosfato do termina 5' da fita do ácido nucléico. O método é simples e rápido, porém o sensor não poderá ser re-utilizado (Palecek *et al.*, 1998) (Figura 6).



A – Adsorção eletroquímica

B - Hibridização

Figura 6. Imobilização de DNA por adsorção eletroquímica. (A) Adsorção da sonda de DNA em um transdutor eletroquímico aplicando um potencial positivo.

(B) Hibridização entre a sonda e a seqüência alvo, mantendo-se o mesmo potencial (Fonte: Pividori *et al.*, 2000).

1.7.1.2 Adsorção Física em Eletrodos de Carbono

Neste método um eletrodo de carbono vítreo é mergulhado numa solução de ds-DNA e deixado até a secagem (Brett *et al.*, 1997). Similarmente, um sensor eletroquímico foi desenvolvido baseado na adsorção da sonda ss-DNA sobre a superfície de um eletrodo de carbono pirolítico (Hashimoto *et al.*, 1994). Eletrodo desenvolvido através de composto de grafite-epoxi, foi recentemente relatado como sensor de DNA (Pividori *et al.*, 2003). O sensor se demonstrou pouco sensível, provavelmente devido a ligações não específicas.

1.7.1.3 Adsorção Física sobre Polímeros Condutores

A metodologia de imobilização de ácidos nucleicos (ss-DNA ou ds-DNA) sobre polímeros condutivos tem sido reportada. Um eletrodo de carbono vítreo é modificado com um filme de polipirrol (PPy). O eletrodo de polipirrol foi preparado por voltametria cíclica, promovendo uma eletroxidação de uma solução de polipirrol. Cargas positivas na superfície do filme de polipirrol favoreceu adsorção do DNA, carregado negativamente (Li *et al.*, 1997; Lassalle *et al.*, 2001).

1.7.1.4 Adsorção em Eletrodo de Ouro

Usualmente, eletrodos de ouro são modificados via adsorção direta da ss-DNA ou ds-DNA na sua superfície (Pang & Abruña, 1998; Zhou *et al.*, 2002). Modificação da superfície do ouro utilizando grupamentos altamente reativos, como por exemplo, dissulfetos, sulfetos e grupamentos tióis vem sendo largamente usado (Figura 7) (Lucarelli *et al.*, 2004).

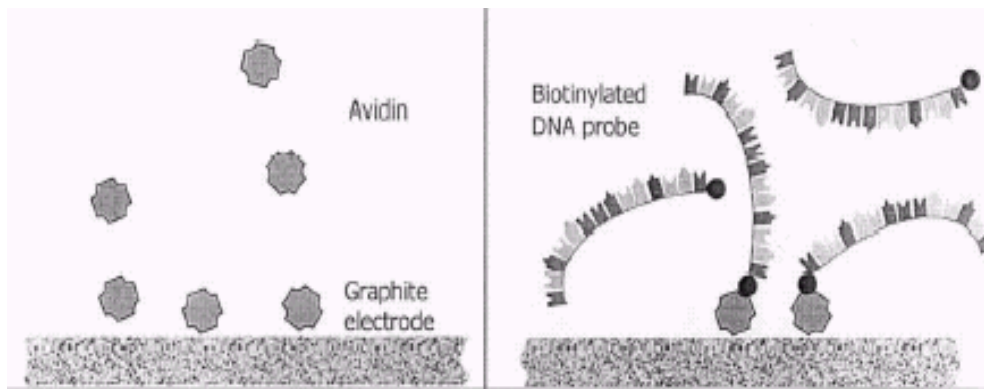


Figura 7. Imobilização de DNA por ligação covalente em superfície de ouro através de uma sonda marcada com um grupamento tiol (SH) (Fonte: Pividori *et al.*, 2000).

1.7.2 Imobilização de DNA por Complexação

A complexação de avidina ou estreptavidina-biotina tem sido amplamente usada em biossensores de DNA. A avidina e a estreptavidina são grandes proteínas tetraméricas (70 kDa) incorporadas por quatro sítios de ligações idênticos. A biotina é uma molécula pequena que se liga com grande afinidade aos sítios de ligações da avidina ou estreptavidina. E só é possível remover a ligação avidina-biotina sobre condições extremas, sendo o complexo formado quase não sendo afetado por valores extremos de pH ou temperatura, solventes orgânicos ou agentes desnaturantes (Yang *et al.*, 1997).

A avidina é primeiramente adsorvida na superfície do substrato, e então levado para solução contendo moléculas de DNA-biotinilado no terminal 5' do DNA (grupamento fosfato) (Figura 8). Estudos da imobilização e hibridização de DNA foram desenvolvidos pela complexação da superfície de ouro (MCQ) por avidina-biotina-DNA (Caruso *et al.*, 1997b; Storri *et al.*, 1998; Tombelli *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001) No entanto, a presença de grandes camadas de proteínas pode favorecer ligações não específicas, comprometendo então a sensibilidade e a seletividade de certos tipos de sensores (Pividori *et al.*, 2000; Wang. 2002).O desenvolvimento de sensores modificados por nanopartículas e seguindo de modificação por avidina-biotina-DNA foi desenvolvido por Wang J. (2003).



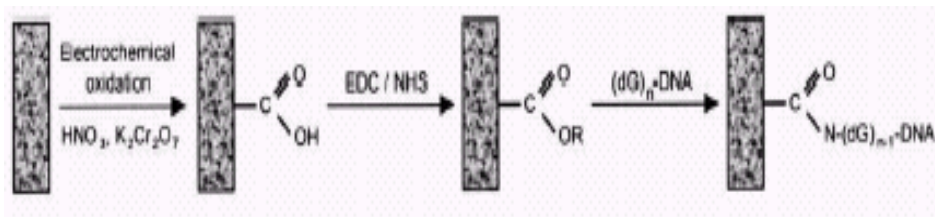
A – Adsorção de Avidina

B – Reação de complexação

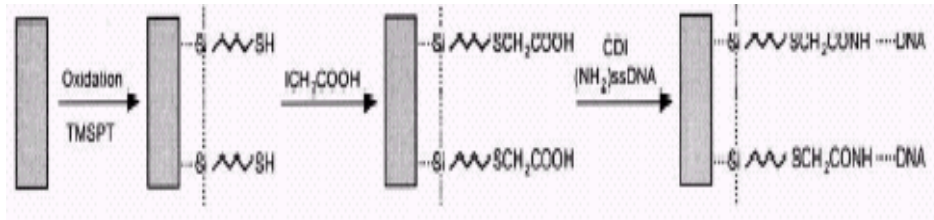
Figura 8. Imobilização de DNA envolvendo a complexação avidina-biotina. (A) Adsorção de avidina na superfície do eletrodo de grafite. (B) Complexação entre a avidina e a sonda de DNA biotinilada (Fonte: Pividori *et al.*, 2000).

1.7.3 Imobilização de DNA via Ligações Covalentes

O uso desse método leva a estabilidade da estrutura da sonda de DNA, atribuindo maior flexibilidade em relação a sua conformação, o que favorece melhores condições de hibridização com a fita complementar. Vários trabalhos têm sido descritos utilizando este método (Yang *et al.*, 1997; Pividori *et al.*, 2000; Towery *et al.*, 2001; Lucarelli *et al.*, 2004), sendo baseados na ligação de grupos reativos aos terminais hidroxílico-3' ou fosfato-5' à grupos carboxílicos (Taft *et al.*, 2003) ou tiois (Zhang *et al.*, 1998) em diferentes tipos de suportes (ouro, platina, prata, grafite vítreo, pasta de carbono, entre outros) (Figura 9) (Pividori *et al.*, 2000).



A - Imobilização de ss-DNA em eletrodos de carbono vítreo



B - Imobilização de DNA na superfície do eletrodo de platina modificado.

Figura 9. Ligações covalentes de DNA em diferentes tipos de superfícies transdutoras. (A) Imobilização de ss-DNA em eletrodos de carbono vítreo, usando o método da carbodiimida. (B) Imobilização de DNA na superfície do eletrodo de platina modificado por uma camada de mercaptosilano, via grupos aminos das bases (Fonte: Pividori *et al.*, 2000).

1.7.4 Imobilização de DNA em Eletrodos de Carbono Composto

Novos sensores de DNA têm sido desenvolvidos utilizando compostos de grafite, que são facilmente polidos e renováveis (Wang *et al.*, 1998a) O eletrodo é preparado pela mistura de pó de grafite com algum material ligante (óleo nujol, epoxi-resina epoxi) (Pividori *et al.*, 2003) e algum composto que venha favorecer a imobilização do ácido nucléico na superfície do eletrodo. Normalmente há a necessidade de um pré-tratamento do eletrodo, através da atribuição de um determinado potencial que estabelece um caracter positivo a superfície e assim favorecendo a ligação com a sonda (Pividori *et al.*, 2000) ou ainda pela modificação da superfície do eletrodo por polímeros condutores (Mailley *et al.*, 2003).

1.7.5 Imobilização de DNA em Pasta de Carbono.

Entre os diferentes tipos de materiais usados para a imobilização de DNA, a pasta de carbono tem sido aplicada mais freqüentemente (Mailley *et al.*, 2003), devido a sua baixa corrente de fundo (background currents), facilidade de modificação do eletrodo produzido (Ravichandran & Baldwin 1981; Sampath & Lev 1996; Brett *et al.*, 1999), e por permitir uma composição com outros materiais e capacidade de miniaturização (Rice *et al.*, 1983; Wang & Zadeii 1988; Wang *et al.*, 1998a; Zou & Mo 1999; Wang *et al.*, 2000). Métodos de imobilização de DNA na superfície de eletrodos de pasta de carbono têm sido reportados: adsorção eletroquímica de DNA por potencial controlado (Wang *et al.*, 1996b; Gherghi *et al.*, 2003), imobilização envolvendo a complexação de avidina-biotina (Pividori *et al.*, 2001), ligação covalente e imobilização em eletrodo de carbono composto (bulk-modified carbon composite electrodes) (Millan *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998a). No entanto, esses métodos também possuem algumas desvantagens na imobilização de ácido nucléico na superfície do eletrodo de pasta de carbono; por simples adsorção (o ácido nucléico pode se desadsorver devido às condições de hibridização), por adsorção eletroquímica (o sensor fica impossibilitado de ser re-usado), por imobilização envolvendo a complexação de avidina-biotina (necessita de DNA marcado e a presença de uma grande proteína como a avidina, que pode comprometer a sensibilidade e seletividade sensora), por ligação covalente do DNA à superfície do eletrodo (o método envolve etapas químicas) (Yang *et al.*, 1997). A combinação de dois ou mais compostos vem sendo recentemente uma nova opção para a preparação de eletrodos (Mailley *et al.*, 2003), uma alternativa para solucionar inconveniências na imobilização do ácido nucléico (Zhang *et al.*, 2000; Pividori *et al.*, 2003). Cada material utilizado na preparação da composição da pasta conserva as suas propriedades originais, porém atribuindo ao composto final, uma característica química, física e mecânica. Tal procedimento vem a favorecer a construção de novos eletrodos, possibilitando maior facilidade de imobilização do material biológico e maior resistência mecânica do eletrodo.

1.8 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de biossensores de DNA (Genossensores) para diagnósticos clínicos, utilizando transdutores eletroquímicos e piezelétricos.

Como objetivo específico, desenvolver novos suportes para a imobilização da sonda de DNA em ambos transdutores (eletroquímico e piezelétrico), como também, desenvolver uma metodologia alternativa para a detecção do evento de hibridização de DNA, em análises eletroquímicas, sem o uso de indicadores eletroquímicos.

2. ARTIGOS

ARTIGO 1 : A NEW GRAPHITE POLYMERCAPTAN COMPOSITE FOR DNA IMMOBILIZATION AND ITS APPLICATION IN ELECTROCHEMISTRY ANALYSIS. * J.J.Brito Silva ¹; R.F. Dutra ^{1,2}; F.M.S. Silva ¹; N.L.C.L. da Silva⁴ ;J.L. L. Filho ^{1,3} & E.H.M. Melo ³

*1 - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA / UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-910 Brazil. grandifloras@yahoo.com.. 2 - Departamento de Patologia, ICB / UPE, Recife, Brazil. 3 - Departamento de Bioquímica, CCB / UFPE, Recife, Brazil. 4 - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-910 Brazil.

(Submetido à Biotechnology Letters em janeiro de 2004)

**A NEW GRAPHITE POLYMERCAPTAN COMPOSITE
FOR DNA IMMOBILIZATION AND ITS APPLICATION IN
ELECTROCHEMISTRY ANALYSIS**

** J.J.Brito Silva¹, R.F. Dutra^{1,2}, F.M.S. Silva¹, N.L.C.L. da Silva⁴*

J.L. L. Filho^{1,3} & E.H.M. Melo³.

*1 - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA / UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade

Universitária, Recife, CEP: 50670-910 Brazil. grandifloras@yahoo.com

2 - Departamento de Patologia, ICB / UPE, Recife, Brazil.

3 - Departamento de Bioquímica, CCB / UFPE, Recife, Brazil.

4 - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade

Universitária, Recife, CEP: 50670-910 Brazil.

Keywords: carbon paste electrode, Polymercaptan hardener, DNA immobilization, hybridisation, genosensor, cyclic voltammetry.

Abstract

A new graphite-polymercaptan electrode modified by DNA is reported. The polymercaptan-hardener (PMH) not only act as essential compound for the cured carbon paste, but also to improve DNA immobilization on the surface of the electrode, without any pre-treatment as showed in the voltammetric studies.

1. Introduction

The electrochemical oxidation of DNA and its adsorption at different types of electrodes have been carried out by means of solid electrodes (Wang *et al.* 2000), they have been demonstrated as excellent device for DNA diagnostic. Different approaches on the DNA immobilisation are described conform electrochemical transducers (Pividori *et al.* 2000). Among different types of materials used for the DNA immobilisation, carbon paste electrodes have been applied more frequently due to slow background currents, easy modification on shape and composition with other materials and capacity of miniaturisation adjusted with micro-fabrication technology (Wang *et al.* 1998a). Many methods to immobilize DNA onto carbon paste electrode surface have been reported (Wang *et al.* 1996, Pividori *et al.* 2001, Liu *et al.* 1996, Millan *et al.* 1994, Wang *et al.* 1998b).

Therefore, there are some practical difficulties that limit the easy use with which the carbon paste electrode can be routinely prepared, utilised and renewed for subsequent re-use (Pang *et al.* 1996), that include

inconvenience in the initial preparation of the electrode (formulation of the paste), cure conditions and reproducibility during extended use. Furthermore, there are also, some disadvantages in the DNA immobilization on the carbon paste electrodes: 1-Nucleic acid cannot be adsorbed without pre-treatment (by simple adsorption); 2-DNA sensor cannot be reuse and nucleic acid may desorb due to hybridisation conditions (by electrochemical adsorption); 3-Immobilization involving avidin-biotin complexation need DNA labelled and 4-The covalent attachment on electrode surface normally involve some chemical steps.

The aim of this work is to introduce advantages in the use of the mercaptans based hardener, that can be applied as facilitator compound to prepare carbon paste electrodes. This offer a mercaptans agent as accelerator to ready cure carbon paste at room temperature. This also provides, amino groups in its composition, that can be used as reactive group for the covalent attachment of DNA by a phosphoramidate bond with the 5'-terminal phosphate group of DNA (Millan *et al.* 1994) and the direct monitoring of DNA hybridisation without the need of an external

redox indicator by cyclic voltammetry (Pividori *et al.* 2000).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and Materials

The electrochemical equipment consisted of potentiostat (model MQPG 01-Microquímica Ind. e Com. Ltda- Brazil) in connection with a PC microcomputer.

The denatured single stranded DNA (ss-DNA) was produced by heating a double stranded salmon sperm DNA (ds-DNA) in acetate buffer (pH 5.0) solution at 100°C during 10 minutes. Graphite powder (particle size 1-2 μm) was obtained from FLUKA. The commercial polymercaptan based hardener was bought from Henkel Loctite Adesivos Ltda (Brazil).

2.2. Preparation of graphite-polymercaptan electrodes.

The graphite-polymercaptan paste was obtained by thoroughly hand-mixing 70% of graphite powder and 30% of polymercaptan based hardener. The graphite-polymercaptan electrodes (GPE) were prepared by tightly soaked the homogenised mixture into a capillary glass length with 4.0 cm, outer diameter 2.0 mm and inner diameter 1.0 mm,

filling the tip to a height about 2.0 mm long (Fig.1).

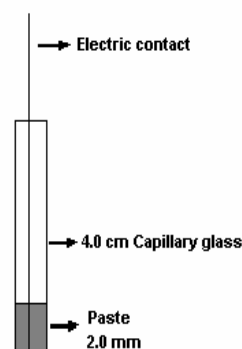


Figure 1. Electrode design.

The electrode was dried at room temperature (27°C) for a minimal of two hours.

2.3. Immobilization of ss-DNA.

The GPE was immersed in 10 μl of a buffer solution containing thermally denatured DNA (1mg.ml⁻¹) and kept at 4°C overnight, this electrode is denoted as ss-DNA/GPE. After the immobilization step, the GPE was washed exhaustively with milli-Q water to remove the excess of non-adsorbed ss-DNA and dried in low-pressure desiccator.

2.4. Voltammetric analysis

The voltammetry was carried out in sodium acetate buffer 0.1M at pH 5.0, with the GPE, ss-DNA/GPE as working electrode against an Ag/AgCl reference electrode and

the cyclic voltammograms were recorded at a scan rate of 100 mVs^{-1} by 5 cycles.

2.5. Hybridization procedures

The ss-DNA/GPE was immersed in an acetate buffer solution ($400\mu\text{l}$) 0.1M , $\text{pH } 5.0$ containing ss-DNA ($25\mu\text{g.ml}^{-1}$) at approximately 16°C . The electrochemical measurements was registered during 10 minutes.

3 Results and Discussion

3.1. Electrochemical characterisation of GPE.

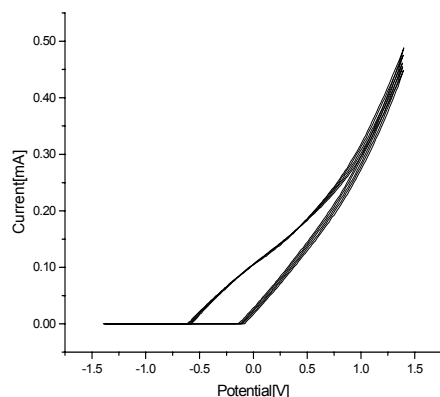


Figure 2. Cyclic voltammetry of graphite-polymercaptan electrodes (GPE) ranging from -0.8V to $+1.6\text{V}$ (vs. Ag/AgCl). No electrochemical peak was observed.

3.2. Voltammogram of ss-DNA/GPE.

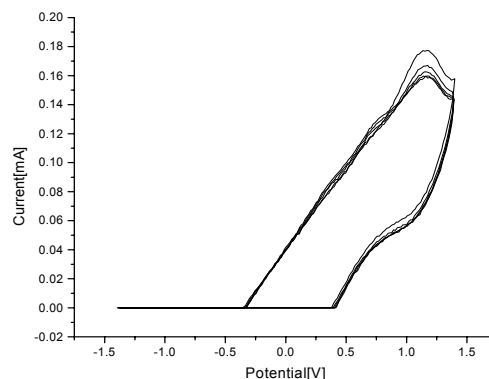


Figure 3. Voltammetric curve from -0.38V up $+1.4\text{V}$ (vs. Ag/AgCl) at 100mV.s^{-1} sweep rate of ss-DNA/GPE.

As can be seen in the figure 3, two anodic peaks appear: one at 0.7V with value of 0.13mA and the other one better defined at 1.2V with value of 0.18mA , that reach equilibrium after 5 successive cycles. These can be defined as an anodic peaks resulting of the oxidation of guanine and adenine bases, respectively, demonstrating that the ss-DNA was immobilized on the electrode surface.

3.3. DNA hybridization

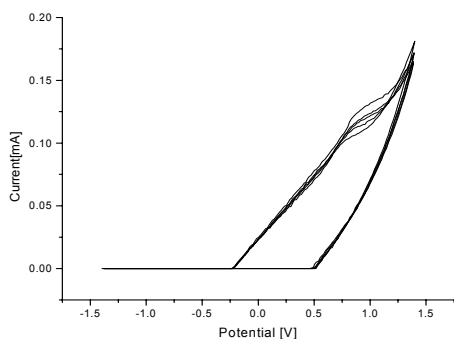


Figure 4. Voltammetric curve from -0.3V up to $+1.48\text{V}$ (vs. Ag/AgCl) at $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sweep rate of ss-DNA/GPE at the hybridisation procedure.

The cyclic voltammogram (fig.4) shows that an anodic peak was observed at approximately 0.75V with a current of 0.125mA and comparison between figure 4 and figure 3, shows that the peak well defined at 1.2V (fig.3), practically disappeared in figure 4. The partial formation of ds-DNA explain the reason of oxidation peak decrease (Wang *et al.* 1998a). This hybridisation did not used an external redox indicator to produce the response, only the signals decrease of the nucleic-acid bases immobilized upon the formation of the surface duplex. The roughness of a solid electrode surface means that double helix DNA have some difficulty in following the

surface contours (La-Scalea *et al.* 1999). Beside this, the transition of electrons from inside the rigid form of ds-DNA to the electrode surface, is the major difficulty owing to its stereochemistry (Pividori *et al.* 2000). The evaluation of the analytical performance of the ss-DNA/GPE electrode at a lower concentration of ss-DNA immobilisation ($0.5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) was also made. The voltammetric studies displaying a smaller oxidation peak separation and a shift to high potentials which was caused by ss-DNA directly adsorbed on the GPE surface (fig.5).

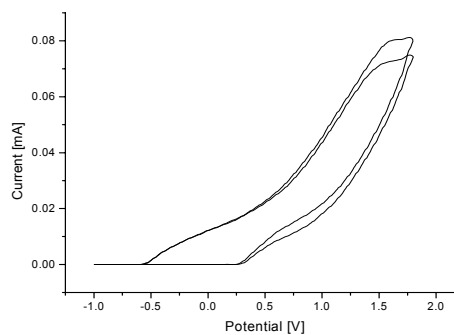


Figure 5. Voltammetric curve from $-0,5\text{V}$ up to $+1,7\text{V}$ (vs. Ag/AgCl) at $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ sweep rate of ss-DNA/GPE.

In order to verify the hybridisation response, the electrode was immersed into the acetate buffer solution, $400\mu\text{l}$, (0.1M , pH 5.0), containing thermally denatured DNA ($1.25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$). The cyclic voltammogram

registered sharp curve response between -1.0V to $+1.7\text{V}$ during 10 minutes at 16°C (fig.6). The guanine peak decreases in the presence of complementary target.

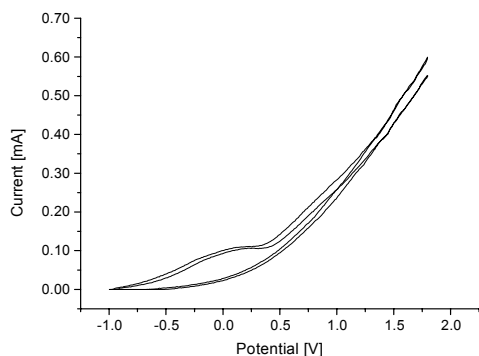


Figure 6. The hybridization reaction was detected by using the cyclic voltammetry curve from -1.0V up to $+1.7\text{V}$ at $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (vs. Ag/AgCl).

The cyclic voltammetry was again performed in the same condition during 10 minutes, the guanine response decreased completely showing non-electrochemical peaks as a response to the hybridisation process (fig.7).

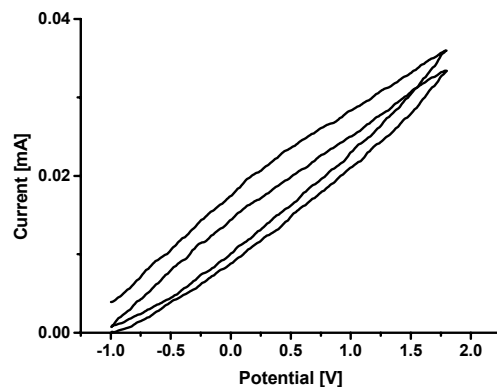


Figure 7. Cyclic voltammetry curve from -1.0V up to $+1.5\text{V}$ at $100\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (vs. Ag/AgCl), after two voltammetric cycles.

3. Conclusion

The novel graphite-polymercaptan composite has been demonstrated to be very efficient to prepare DNA electrode, with better mechanical stability, more reproducible and sensitive than graphite-mineral oil paste electrodes, practical and inexpensive. The immobilisation of DNA on the electrode surface showed to be stable.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (Brazil) and Federal University of Pernambuco. We are also grateful to Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM for technical assistance in this work.

References

- Brett CMA, Brett AMO, Serrano SHP (1999) An EIS study of DNA-modified electrodes. *Electrochimica Acta*. **44**: 4233- 4239.
- La-Scalea MA, Serrano SHP, Gutz IGR (1999) Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. *Química Nova*. **22** (3): 417-424.
- Liu S, Ye J, He P, Fang Y (1996) Voltammetric determination of sequence specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. *Anal. Chim. Acta*. **335**: 239-243.
- Millan KM, Saraullo A, Mikkelsen SR (1994) Voltammetric DNA biosensor for Cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. *Anal. Chem.***66**: 2943-2948.
- Pang D-W, Zhang M, Wang Z-L, Qi Y-P, Cheng J-K, Liu Z-Y (1996) Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA. *J.Electr. Chem.***403**: 183-188.
- Pividori MI, Merkoçi A, Alegret S (2000) Electrochemical genosensor design: Immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens & Bioelectron*. **15**: 291-303.
- Pividori MI, Merkoçi A, Alegret S (2001) Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridization genosensor. *Biosens & Bioelectron*.**16**: 1133-1142.
- Wang J, Chicharro M, Rivas G, Cai X, Dontha N, Farias PAM, Shiraishi H (1996) DNA biosensor for the detection of hydrazines. *Anal. Chem.* **68**: 2251-2254.
- Wang J, Rivas G, Fernandes JR, Paz JLL, Jiang M, Waymire R (1998a) Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Anal. Chim. Acta*. **375**: 197-203.
- Wang J, Fernandes JR, Kubota LT (1998b) Polishable and renewable DNA hybridization biosensors. *Anal. Chem.* **70**: 3699-3702.
- Wang J, Gründler P, Flechsig G-U, Jasinski M, Rivas G, Sahlin E, Paz JLL (2000) Stripping analysis of nucleic acids at a heated carbon paste electrode. *Anal. Chem.* **72**:3752-375.

Artigo 2. A QCM biosensor based on a new DNA-chitosan

film. Brito Silva, J.J. ^a Lima, C.A. ^a ; Amorim, R.V.S ^b ; Lima Filho, J.L. ^{a,d} ; *Dutra,

R.F. ^{a,c} and Melo, E.H.M. ^{a,d}

a – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA / UFPE; b - Departamento de

Bioquímica/UFPE; c – Departamento de Patologia/UPE; d- Departamento de

Bioquímica/UFPE

(A ser submetido a Biosensors & Bioelectronics)

A QCM biosensor based on a new DNA-chitosan film

Brito Silva, J.J. ^a Lima, C.A. ^a ; Amorim, R.V.S ^b ; Lima Filho, J.L. ^{a,d} ;

Dutra, R.F. ^{a,c} and Melo, E.H.M. ^{a,d}

a – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA; b - Departamento de Bioquímica/UFPB; c – Departamento de Patologia/UPE;

d - Departamento de Bioquímica/UFPE

ABSTRACT

A QCM biosensor based on a new DNA-chitosan film is described. A chitosan thin film was modified for DNA binding by amino groups activated with alkaline hydrolyze reaction. This DNA chitosan film was applied on the QCM biosensor for molecular interaction, hybridization with single strand DNA (ssDNA) homologue showed 28,4% more frequency response than control, double strand DNA (dsDNA). An active DNA-chitosan film on the QCM biosensor was developed can be applied to many molecular diagnostic.

Keywords: chitosan film , QCM Biosensor, DNA immobilization, piezoelectric sensor.

1 Introduction

On the last decades it has been increased the interest on the molecular diagnoses methods. There are many considerable methods currently available to management of infections and genetic diseases, such as the DNA fluorescence method, PCR amplification, RT-PCR, dot blot hybridization coupled to PCR amplification and others (Wang *et al* ,1997). However, all those molecular methods consume time, not are cheap and also need to be operated by specialized personal. Recently a great attention has been drove to lab-on –a-chip techniques including biosensors (Su *et al.*,1996). These devices combine a biological sensor coupled to transducers in order to produce an electrical measurement as responses from the recognition of the analite. In molecular areas, piezoelectric biosensors have been attractive due to non-involve labeled DNA and are faster and safer (Nicolini, *et al.*, 1996; Caruso *et al.*,1997). The kind how the DNA molecules are fixed on the electrode surface and maintained during the hybridization is intimately related to the biosensor performance (Sethy, 1994). Some immobilization methods were developed for this aim: DNA immobilization involving avidin-biotin complexation (Millan *et al.*,1994; Liu, 1996; Wang *et al.*,1998; Pividori *et al.*, 2000; Pividori, *et al.*,2001), simple adsorption of DNA on the metallic surface (Storri *et al.*, 1998). In this work, the chitosan was used in a piezoelectrical biosensor as a new approach performing a polymeric thin film for the DNA immobilization.

Chitosan (1 → 4)-2-amino-2-deoxy-β-D-glucan is a natural polymer obtained by N-deacetylation of the lateral groups from chitin (1 → 4)-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucan, a polysaccharide found mainly in crustaceans shells (Juang *et al*, 2002). The deacetylation in the ionic groups gives to chitosan single properties, just differing of the chitin by group attached to carbon 2 of their carbohydrate chains (Lopes *et al.*, 2003), as show in the figure 1. The chitosan as posses amino (-NH₂) and/or hidroxil (-OH) groups in the lateral chains, it has been widely used in the industrial and biomedical application to immobilize biological compounds, proteins, glycoproteins, nucleic acids (Zeng & Ruckenstein, 1998; Juang, *et al.*,

2001; Wan *et al.*, 2003). In general, enzymes are more frequently immobilized on chitosan, as example, it has been registered chitosan membranes fixed on the solid support to binding lipases (Hung *et al.*,2003) and chitosan beads using glutaraldehyde as fixing agent to attach metal ions (Lin *et al.*, 2002; Juang *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2003). Chitosan membranes were also prepared on the carbon paste electrode surface acting as support for the immobilization of enzymes implying on development of the sensors for metabolites measurements in the blood serum samples as glucose (Ohashi & Koriyama, 1992), lactate (Hikima *et al.*,1993), ethanol (Kurauchi *et al.*,1994) and urea (Magalhães & Machado,1993 and 1998). In addition, chitosan has the advantage of non-toxicity, low cost and also are biocompatible with many biomolecules.

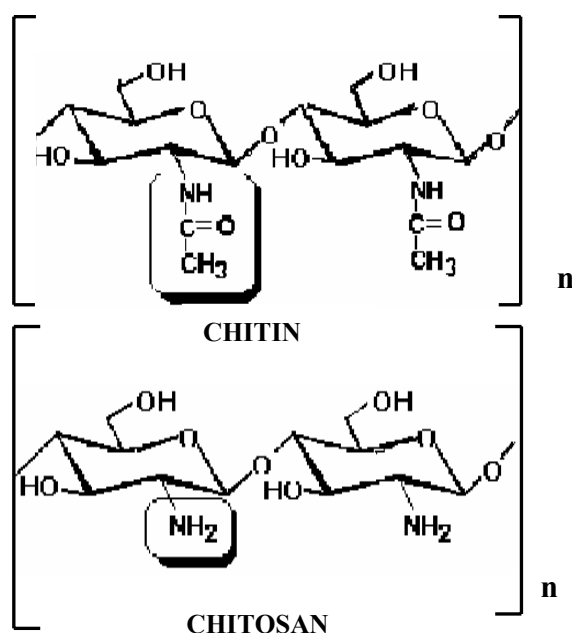


Fig. 1 . Structure of chitin and chitosan

2. Experimental

2.1 Reagents

Chitosan (240 kDa) with 85% deacetylation was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). The salmon sperm DNA double-stranded (ds-DNA), catalog. No. 27-4564, was obtained from Amersham Pharmacia Biotech. The denatured single stranded DNA (ss-DNA) was produced by heating a ds-DNA salmon sperm solution (2 μ g/ml) prepared in acetate buffer (pH 5.0) at 100°C for 10 min. followed by immediate cooling in the ice bath. In all experiments, the reagents used were analytical grade and the water was Milli-Q type purified by Millipore system (USA).

2.2. Apparatus and procedures

The figure 2 shows a quartz crystal microbalance system that consisted of a quartz crystals electrode coupled to TTL oscillator circuit self-made and a frequency counter (GFC-8131, Good Will, USA) to register the frequency outputs on the computer coupled. The quartz electrode (AT cut, quartz plate \varnothing 14mm, gold electrode \varnothing 8mm, 10MHz frequency) was bought from Universal Sensors (Oklahoma, U.S.A). In order to correct electrical fluctuations a reference crystal electrode (10mhz) was used into the oscillator circuit, that also permitted easily monitoring due to measure in Hz hundred of differential frequency resultant of the crystal. The apparatus was maintained in a faraday cage and the frequency measurements of the biosensor were performed at 0.5min sample rate during 10 min in the gas-phase after the nitrogen drying steps. In this approach, only one side of the quartz electrode was used to the biological reaction.

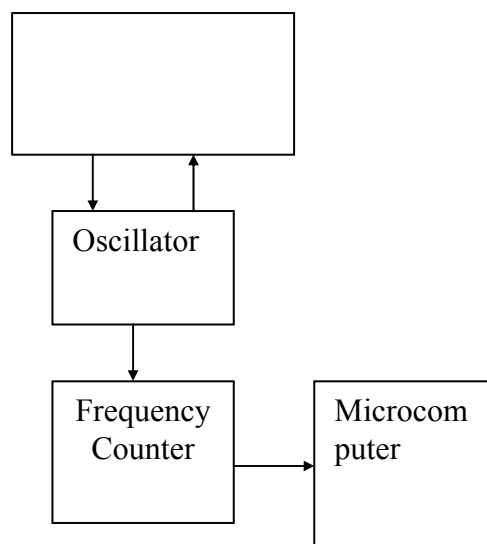


Fig 2 . Schematic design of the system

2.3 Immobilization of DNA on quartz crystal electrode

Prior immobilization, the quartz crystal electrodes were cleaned and sterilized by ultraviolet for 15 min. A chitosan solution (0,05%) was prepared by dissolving 0,005g of chitosan in 1ml of 0.8% (w/v) acetic acid solution and vigorously agitated for 10 minutes. The obtained viscous solution was diluted in ethanol 95% and NaOH 2M (1:1), resulting in a concentration of 2,5mg/ml. This solution was slowly spread on the gold QCM electrode and the film was nitrogen-air dried. After four PBS washes followed by clean with milli-Q water, a coated electrode with a thin chitosan film was obtained. Then 40 μ l of the ss-DNA solution(2 μ g/ml) was pipetted on the coated chitosan electrode and incubated at 4°C for 1h. The excess of non-adsorbed ss-DNA was removed by four washes with 0,01M PBS (pH 7,2) followed by two milli Q water washes and nitrogen air dried.

2.4 The hybridization procedure

It was incubated on the electrode surface, 40 μl of the ss-DNA solution (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at room temperature (26°C) for 45 minutes. The excess of non-adsorbed ss-DNA was removed by four washes with 0,01M PBS buffer solution followed by two successive milli-Q water washes and the electrode was nitrogen-air dried for three minutes. The control experiment was performed using ds-DNA hybridization instead of ss-DNA.

3. Results and discussion

3.1 Chitosan film preparation

In order to obtain more regular and homogeneous chitosan film, the chitosan solution was vigorously agitated to remove precipitate. The pH was established softly with alkaline solution, because the chitosan in acid medium is soluble, what difficult its binding onto the surface. (Wan *et al.*,2003).

The optimal chitosan concentration for chitosan film was determined by performing assays in different concentrations (1.0; 2.0; 2.5; 3.0; 3.5 and 4.0 mg/ml), which were spread on the electrode surface and nitrogen-air dried. The excess of the chitosan was removed by successive washings. The regular chitosan film was established when the frequency shift reached the steady state as observed in the figure 3 with a decrease frequency of 15,6%.

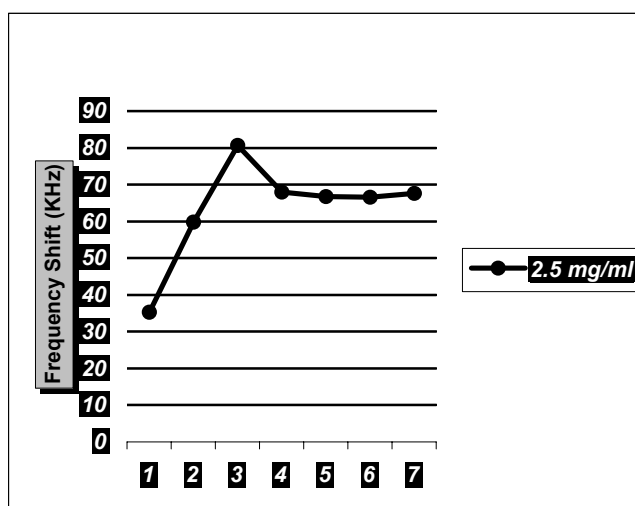


Fig 3. Representation of frequency shift observed in the chitosan-film preparation. 1- Clean electrode, 2-3 - Chitosan solution spread, 4 – after first washing, 5-7 after second to fourth washings.

According to the figure 4 was determined a chitosan concentration of 2,5mg/ml as optimal due to the major relative frequency changing found, that was calculated subtracting the initial point of chitosan spreading and the final point as the steady reached. Concentrations up to 3.0mg/ml caused reduction on the frequency measured, probably due to the increase of mass produced by chitosan film, which shift the measured frequency from the resonance oscillating frequency causing non-linear response, this point of view was confirmed by zero frequency response in the concentrations above 4.0mg/ml.

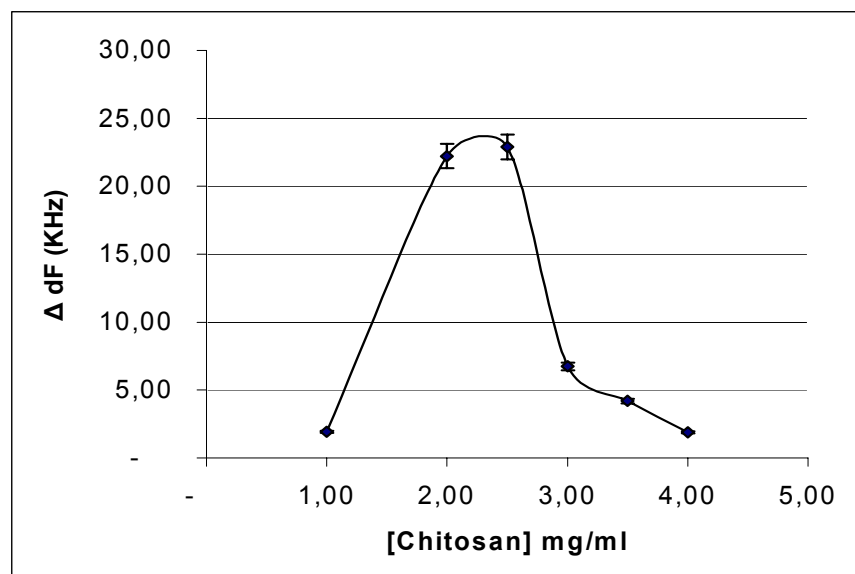


Fig.4. Effect of chitosan concentration solution on QCM electrode surface

3.2. ss-DNA chitosan immobilization

As mentioned, acid chitosan solutions can result in more soluble preparation implying on the non-cationic DNA interactions. In this work, a 2M NaOH alkaline solution was used to promote a better cationic DNA interaction, as observed in the figure 5, when the chitosan film was alkalinized by NaOH, the DNA was maintained for a long time on despite of the control (without NaOH) that was release after the third wash. The chitosan film with and without NaOH showed significant difference, t test ($p < 0,05$). These results can be probably explained by hydrolyze reaction of the acetyl groups that release the amino groups responsible by DNA cationic interactions (Roberts, 1992).

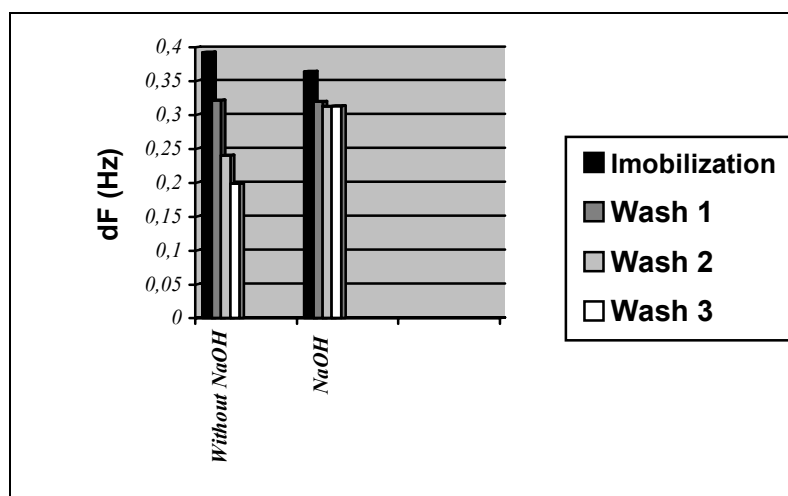


Fig. 5 . Signal transduction using NaOH on the chitosan film. The control experiment shows the chitosan film without NaOH.

At room temperature (26°C), the optimal time incubation for the DNA linkage to the chitosan film was reached up to 45 min. Incubation below that period showed non-changing frequency, probably either the DNA simply adsorbed was removed after PBS washings or the amino chitosan-DNA binding has not been established. Other conditions for DNA-chitosan binding were also investigated; a chitosan solution containing DNA mixtured was spread on the electrode surface, however, the results were not satisfactory. At 4°C when the DNA solution was also incubated during 45 min or less, the frequency change was lower than at room temperature (26°C).

The optimal DNA concentration was established at approximately 0,5µg /ml on the chitosan film electrode (figure 6). As also noted in the figure 6, at low DNA concentrations the measured frequencies were not stable, because few DNA molecules were offered to the reactive chitosan groups.

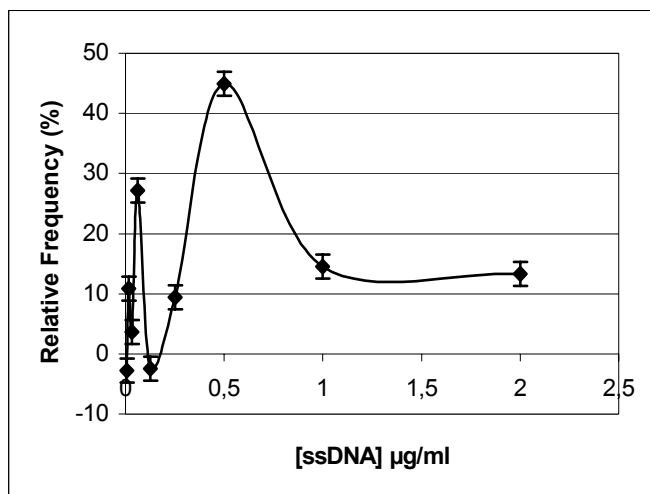


Fig 6. Effects of the ssDNA concentration on the DNA-chitosan immobilization

3.3 ss-DNA hybridization

Hybridization with ssDNA homologue was better confirmed at room temperature (26°C) than at 4°C (figure 7). On despite of incubation time (25; 45 and 60 min. and above) the hybridization at 4°C caused a reduced change frequency, this results were also confirmed by other authors (Nicolini *et al.*, 1997) describing an increase in the hybridization response of an electrochemical biosensor proportional to temperature. In accordance with the figure 8 there was significant difference among the hibridization change frequency at 4°C and at room temperature, using the t test, $n = 10$ ($p=1,23 \times 10^{-8}$). The authors (Pividori *et al.*, 2000) proposed that 60°C temperature is better for hybridization than 4°C and 25°C. Subsequently hybridization studies at 60°C should be made in order to improve the biosensor response.

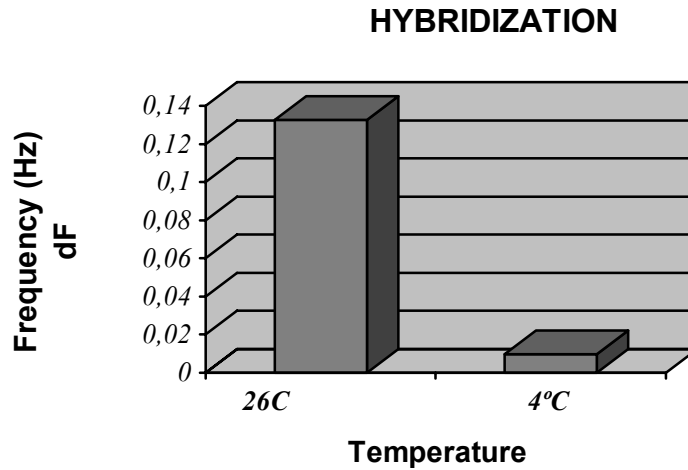


Fig. 7. Hybridization profile of DNA at 4°C and 26°C temperature

4 Conclusions

The active DNA chitosan film on the QCM electrode achieved represents a new method for production of more reliable and reproducible molecular biosensor, which in low concentrations of mass-sensitive can produce regular response to hybridization. The chitosan film increasing the stability of DNA immobilized in approximately 21% in comparison with the control immobilization (without chitosan film). It was possible to use the chitosan as composed to immobilize DNA in biosensors.

5. References

- ARLINGHAUS, H.F.; KWOKA, M.N. **Anal Chem**,v. 69, p. 3747-3745, 1997.
- ARSHADY,R. Functional polymer, synthesis and application. Washington DC: **American Chemical Society**,p.240,1996.
- ATTILI, B.S. & SULEIMAN,A.A. A piezoelectric immunosensor for the detection of cortisol. **Anal. Lett.**,v.28, p.2149-2159,1995.
- AUSUBEL,F.M.; BRENT,R.; KINGSTON,R.E.; MOORE,D.D.; SEDMAN,G.G.; SMITH,J.A.; STRUHL,K.S. Current Protocols in Molecular Biology, v.1,2, **Greene Publishing Company and Jon Wiley and Sons.Inc.**,New York,1993.
- BARDEA,A.;DAGAN,A; BEN-DOV,L. ;AMIT,B.;WILLNER,L. Amplified microgravimetric quartz-crystal-microbalance analysis of oligonucleotide complexes, a route to a Tay-Sachs sensor. **Soc. Chem. Commun**, v. 7, p. 839-840, 1998.
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, E. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. São Carlos. **Polímeros**, v.9 n.4, 1999.
- CARTER, R.M.; MEKALANOS, J.J. ; JACOBS, M.B. ; LUBRANO, G.J.; GUILBAULT, G.G. J Immunol. Method., v. 187, p.121-125, 1995.
- CARUSO, F.; RODDA, E.; FURLONG, D.F.; NIKURA, K.; OKAHATA, Y. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. **Anal. Chem.**, v. 69, p. 2043-2049, 1997b.
- CARUSO,F., NIKURA, FURLONG, D.F.; OKAHATA, Y. Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing. **Langmuir**, v.13, p.3427-3433, 1997a.

- CARUSO,F., RODDA,E., NEIL FURLONG,D., HARING,V. DNA binding and hybridization on gold derivatized surfaces, *Sensors and Actuators B*, v.41,p. 189-197,1997c.
- D'ANNIBALE, A., STAZI S.R., VINCIGUERRA V., DI MATTIA, E., GIOVANNOZZI SERMANNI G. Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. **Process Biochem.** v. 34, p. 697-706, 1999.
- DOWNS,M.E.A. Prospects for nucleic acid biosensors. **Biosensors Biochem. Soc. Trans.** v.19, p.39-34, 1991.
- DUTRA, R.F. Tese de Doutorado: Desenvolvimento de biossensores em bioquímica clínica e imunodiagnóstico, CCB-UFPE. 1999.
- EGGINS, B.R.. In: Biosensors, an introduction. **John Wiley & Sons**, England. 1996.
- FAWCETT ,N.C.;EVANS,J.; CHIEN,L.; FLOWERS,N. Nucleic Acids hybridization detected by piezoelectric resonance. *Analyt.Lett.* v.21, p. 1099-1114,1988.
- GUILBAULT, G. G.; JORDAN, J. J. **Crit. Rev. Anal. Chem.**, v. 55, p. 2333- 2336, 2000.
- HIKIMA, S. T. , KAKIZAKI, M.T., HASEBE ,K.; Enzyme Sensor for L-lactate with Chitosan-Mercury Film Electrode. **Fresenius' J. Anal. Chem.**, v.34, p.607-609,1993.
- HUNG,T-C., GIRIDHAR, S-H.C., WU, W-T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic** ,2003 , in press
- ICAZA, M.; BILIEWSKI, U. Determination of Phage Antibody Affinities to Antigen by a Microbalance by a Microbalance Sensor System. **Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 65, p. 525- 533, 1993.
- JANATA,J.; JOSOWICTZ,M. VANYSEK,P.; DEVANEY,D.M. **Anal. Chem.**,v.70, 179R,1998.
- JOSOWICZ, M.J.& DEVANEY, D.M. **Anal. Chem.** v. 66, p. 207-228, 1994.

- JOST, J.P.; MUNCH,O.; ANDERSSON,T. Study of protein DNA interactions by surface-plasmon resonance (real-time kinetics). *Nucleic Acids Res.*,v.19,p.2788,1991.
- JUANG, R.S., WU, F.C., TSENG,R.L. Solute adsorption and enzyme immobilization on chitosan beads prepared from shrimp shell wastes. *Bioresource Technology*. 80, 187-193, 2001.
- JUANG, R.S., WU, F.C., TSENG,R.L. Use of chemically modified chitosan beads for sorption and enzyme immobilization. **Advances in Environmental Research**, v.6, p.171-177, 2002.
- JUNHUI,Z.;HONG,C.;RUIFU,Y. DNA based biosensors. *Biotechnol. Advances*, v.15, n.1, p.43-58, 1997.
- KRAJEWSKA B, LESZKO M AND ZABORSKA W. Urease immobilized on chitosan membrane:preparation and properties. **J Chem Eng Prog** ,p.81-89, 1990.
- KUMAR, A. Biosensors basead on Piezoeletric Crystal Detectors: Theory and Aplication. **JOM – Minerals, Metals & Materials Society**, v.52, n.10, p. 15-20, out. 2000.
- KURAUCHI, T.Y.,EGASHIRA,N.,OHGA, K. Fiber-optic Sensor with a Chitosan/Poly (vinyl alcohol) Cladding for the Determination of Ethanol in Alcoholic Beverages.**Anal. Sci.**v.10 , p. 213,1994.
- LANDEGREN, Y.; KAISER, R.; CASKEY, C.T.; HOOD,L. DNA diagnostics – molecular techniques and automation. **Science** **242**,p.229,1988.
- LA-SCALEA,M.A.;SERRANO,H.P.;GUTZ,I.F.R. Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. **Quím. Nova**, v. 22, n.3, p.417-423, 1999.
- LI ,L.; WANG,M.; DOUNG,S.; WANG,E. Electrochemical investigation of DNA adsorbed on conducting polymer modified electrode. **Anal. Sci.** V.13,p.305-310,1997.
- LIN, H., WANG, H., XUE, C., YE,M. Preparation of chitosan oligomers by immobilized papain. **Enzyme and microbial technology**. v. 31, p.588-592, 2002.

- LIU, S.; YE, J.; HE, P.; FANG, Y. Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode, **Anal. Chim. Acta**, v.335, p.239-243,1996.
- LOPES,E.,C.; ANJOS,F.,S.,C.;VIEIRA,E.,F.,S.;CESTARI,A,R. An alternative Avrami equation to evaluate kinetic parameters of the interaction of Hg(II) with thin chitosan membranes,**Journal of Colloid and Interface Science**, 2003 , in press.
- LVOV,Y.;DECHER,G.; SUKHORUKOV,G. Assembly of thin-films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly (allylamine). **Macromolecules**, v.26, p.5396-5399, 1993.
- MAGALHÃES J.M.C.S, MACHADO A.A.S.C. Urea potentiometric biosensor based on urease immobilized on chitosan membranes . **Talanta**, p.183-191,1998.
- MAGALHÃES,J.M.C.S., MACHADO, A.A.S.C. Enzyme immobilization on chitin and chitosan for the construction of enzymatic sensors, in: Guilbault, G. And Mascini, M. (Eds.), Uses of Immobilized Biological Compounds for Detection, Medical, **Food and Environmental Analysis**, Kluwer, Dordrecht, p. 191,1993.
- MASSON,M., YUN,K.; HARUYAMA,T.; KOBATAKE,E.;AIZAWA , M. Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for biotin. **Anal. Chem.**, v. 67, p.2212-2215,1995.
- MIAO Y, TAN S.N. Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica. **Analytica Chimica Acta.**, v. 437 p. 87-93,2001.
- MILLAN,K.M., SARAULLO,A., MIKKELSEN,S.K.Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. **Anal.Chem.**v.66, p.2943-2948,1994.
- MUZZARELLI, R.A.A. Chitin.**Pergamon Press**, Oxford., p.87-153 & 183-205,1977.
- MUZZARELLI,R.A.A. Chitin and its derivatives: new trends of applied research. **Carbohydr.Polym.**,v.3, p53-75,1983.

- NG, S.C.; ZHOU,X.C.; CHEN,Z.K.;FU,P.; MIAO,P; LI,S,F.Y.; CHAN,H.S.O. Quartz crystal microbalance sensor deposited with LB films of conducting polymers and application to heavy metal ions analysis. **Langmuir**, v.14, p.1748-1752,1998.
- NICOLINI, C., ERKHIN,V., FACCI, P., GUERZONI, S., ROSS,A., PASCHKEVITSCH, P. Quartz balance DNA sensor. **Biosensors & Bioelectronics**,v.12,n.7,p. 613-618,1997.
- NICOLINI,C. Molecular Manufacturing. **World Scientific**, Singapore, p. 258, 1996.
- NO, H.A. AND MEYERS, S.P. Preparation and characterization of chitin and chitosan, a review. **Journal of Aquatic Food Product Technology** ,v. 4 ,p. 27-52, 1995.
- OHASHI, E., KORIYAMA, T. Simple and mild preparation of an enzyme-immobilized membrane for a biosensor using P-type crystalline chitin. **Anal. Chim. Acta** ,v.262 , p.19-25, 1992.
- PALANTI, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M. Electro chemical DNA probes. **Anal Letters**, v. 29 ,n.13, p. 2309-2331, 1996.
- PALECEK,F. New trends in electrochemical analysis of nucleic acids. **Bioelectrochemical.Bioenerg.** v.20, p. 179-194,1988.
- PANDEY, P.C. In: : Enzyme and microbial biosensors. **Human Press**. Totowa, New Jersey., p. 81-92 ,1998.
- PISCEVIC,D.; LAWALL,M.; VEITH,M.; OKAHATA,Y.;KNOLL,W. Oligonucleotide hybridization observed by surface plasmon optical techniques. **Appl.Surf. Sci.**, v.90, p. 425-436, 1995.
- PIVIDORI,M.,I., MERKOÇI, A.,ALEGRET,S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods.**Biosensors & Bioelectronics**,v.15, p.291-303, 2000.
- PIVIDORI,M.I., MERKOÇI,A., ALEGRET,S. Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridization genosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v.16, p.1133-1142, 2001.

- RICCARDI, C.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Quím.Nova**, v.25, n.2, p.316-320, 2002.
- ROBERTS, G.A.F. Chitin chemistry. London:**Macmillian Press**; p.65,1992.
- RODRIGUEZ-SANCHEZ, D. & RHA, C. Chitosan Globules. **J. Fd Technol.**, v.16, p.469-479, 1981.
- ROMOREN, K.; PEDERSEN, S.; SMISTAD, G.; EVENSEN, O.; THU, B., J. The influence of formulation variables on in vitro transfection efficiency and physicochemical properties of chitosan-based polyplexes. **International Journal of Pharmaceutics**,v. 261, p. 115–127, 2003.
- SAKURAI, K. Ultrafiltration chitosan membranes. In: Chitin Handbook (Ed. Muzzarelli, R.A.A. e Peter. M.G.), Via San Martino, Italy: **Atec Edizioni**, p. 445-450, 1997.
- SAMPATH, S. & LEV,O. **J. Electroanal. Chem.** v.426, p.131,1997.
- SAUERBREY, G. The use of quartz crystals for measuring thin layers and micro-weighing. *Zeitung Physik*, v.155, p.206, 1959.
- SAWATA, S.; KAI, E.; IKEBUKURO, K.; IIDA, T.; HONDA, T. Application of peptide nucleic acid to the direct detection of deoxyribonucleic acid amplified by Polymerase chain reaction. **Bios & Bioelectr.** v. 14 , p.401-408, 1999.
- SETHY, R. S. Transducer aspects of biosensors. **Biosensors & Bioelectronics.** Amsterdam, v. 9, p. 243-264, 1994.
- SHI,Q.-H., TIAN,Y., DONG, X.-Y., BAI, S., SUN, Y. Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption. **Biochemical engineering Journal**, v. 16 , p. 317-322, 2003.

- SHIN, S.J.; YAMANAKA, H.; ENDO H.; WATANABE E. Development of an octopine biosensor and its application to the estimation of scallop freshness. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.10–13,1998.
- SPAGNA G, ANDREANI F, SALATELLI E, ROMAGNOLI D, PIFFERI PG. Immobilization of α -L-arabinofuranosidase on chitin and chitosan. **Process Biochem.**, v. 33,p. 57-62, 1998.
- STORRI, S. SANTONI, T.; MASCINI, M. A piezoelectric biosensor for DNA hybridization detection. **Anal Letters**. v. 31,n.11, p.1795-1808, 1998.
- SU, H.,CHONG, S.,THOMPSON, M.Interfacial hybridization of RNA homopolymers studied by liquid phase acoustic network analysis. **Langmuir**, v.12, p.2247-2255,1996.
- SU, H. & THOMPSON, M. Kinetic of interfacial nucleic acid hybridization studied by acoustic network analysis . **Biosens. Bioelectron**. v.10, (3/4),p.329-340, 1997.
- SU,H.; SANDRA,C.;THOMPSON,M. Kinetic of hybridization of interfacial RNA homopolymers studies by thickness-shear mode acoustic wave sensor. **Biosens. Bioelectron**. v.12, n.3, p. 161-173, 1997.
- SUKHORUKOV,B.L.,SUKHORUKOV,G.B.,SHABARCHINA,L.I. MONTREL,M.M. Optical properties and the structure of Langmuir Blodget films of the complexes of nucleic acids with lipids and synthetic amphiphilie molecules 2. IR spectra hydration and comformational state of DNA in a multilayer. **Biophysics**, v.41, n.5, p.1016-1025,1996a.
- SUKHORUKOV,G.B.; MONTREL,M.M., PETROV,A.L.; SHABARCHINA,L.I.; SUKHORUKOV,B.L. Multilayer films containing imobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. **Biosens. Bioelectron**, v.11, p. 913-922,1996b.
- URAGAMI, T. Preparation and characteristics of chitosan membranes In: Chitin Handbook (Ed. Muzzarelli, R.A.A. e Peter. M.G.), Via San Mrtino, Italy: **Atec Edizioni**, p.451-455, 1997.

- WAN, Y., CREBER, K.A.M., PEPPLEY, B., BUI, V.T. Ionic conductivity of chitosan membranes, **Polymer** **44**, p.1057-1065, 2003.
- WANG,J. , RIVAS, G. , CAI,X., DONTA,N., SHIRAISHI , H., LUO,D., VALERA,F.S. Sequence-specific electrochemical biosensing of *M.tuberculosis* DNA. **Analytica Chimica Acta** ,v. 337,p.41-48, 1997.
- WANG,J. Polishable and renewable DNA hybridization biosensors. **Anal.Chem.**v.70,n.17, p.3699-3702, 1998.
- WOLFBEIS,O.S. **Anal. Chem.**v.72,p.81,2000.
- YAMAGUCHI,S. & SHIMOMURA,T. Adsorption, Immobilization , and Hybridization of DNA Studied by the use of Quartz Crystal Oscillators. **Anal. Chem.**,v.65, p.1925-1927,1993.
- YANG,M.; McGOVERN,M.E.; THOMPSON,M. Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry. **Anal. Chim. Acta**, v.346, p.259-275,1997.
- ZENG X., RUCKENSTEIN E. Cross-linked macroporous chitosan anion-exchange membranes for protein separations. **Journal of Membrane Science.**, v. 148, p.195 -205, 1998.
- ZHANG, H.; TAN, H.; WANG, R.; WEI, W.; YAO, S. Immobilization of DNA on silver surface of bulk acoustic wave sensor and its application to the study of UV – C damage. **Anal Chim Acta**. v. 374, p.31-38, 1999.
- ZHANG,S.F.; ROLFE,P.; WRIGHT,G.; LIAN,W.; MILLING,A.J.; TANAKA,S.; ISHIHARA,K. Physical and biological properties of compound membrane incorporating a copolymer with a phosphorylcholine head group.**Biomaterials**, v.19, p.691-700, 1998.
- ZHANG.S.; WRIGHT,G.; YANG,Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosens. Bioelectron.**,v.15,p.273,2000.

ZHOU,X.; LIU,.; HU,M.; WANG,L.; HU,J. Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. **J.Pharm. Biom.Anal.**, v.27, p.341-345, 2002.

ZHOU,X.C; HUANG,L.Q.; LI,S.F.Y. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance : comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16 , p.85-95, 2001.

ZULL,J.E.; REED-MUNDELL,J.; LEE,Y.W.; VEZENOV,D.;ZIATS,N.P.; ANDERSON,N.M.; SUKENIK,C.N. Problems and approaches in covalent attachment of peptides and proteins to inorganic surfaces for biosensor applications. **J. Ind. Microbiol.**,v.13, p.137,1994.

ARTIGO 3: BIOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA DETECÇÃO DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.

Autores : *Brito Silva, J.J.¹ ; Lima, M.A.¹; Silva, F.M. S.¹ ; Lima Filho, J.L.^{1,2}; Melo, R.A.M.³ Dutra, R.F.^{1,4} and Melo, E.H.M.^{1,2}

1 – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA / UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-910 Brazil. grandifloras@yahoo.com; 2 - Departamento de Bioquímica/UFPE; 3- Fundação HEMOPE/PE; 4 – Departamento de Patologia/UPE.

(A ser submetido a Biotechnology Advances)

BIOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA DETECÇÃO DE LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

*Brito Silva, J.J.¹ ; Lima, M.A.¹; Silva, F.M. S.¹ ; Lima Filho, J.L.^{1,2}; Melo, R.A.M.³

Dutra, R.F.^{1,4} and Melo, E.H.M.^{1,2}

1 – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami LIKA / UFPE , Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, CEP: 50670-910 Brazil. grandifloras@yahoo.com.. 2- Departamento de Bioquímica/UFPE; 3- Fundação HEMOPE/PE; 4 – Departamento de Patologia/UPE

ABSTRACT

The Chronic Myeloid Leukemia (LMC) characterizes for being a mieloproliferative illness monoclonal resultant of a neoplasics transformation of cells, whose average of age is between 40 and 60 years. The LMC is caused by a translocation between the long arms of chromosome the 9 and 22 (9;22)(q34;q11) in the hematopoietics cells, producing a small abnormality, the Philadelphia chromosome (Ph), present in 90-95% of the patients. In this work a piezoelectric biosensor for the detention of LMC was developed. The cDNA sequence (ss-Cdna) was immobilized for the adsorption technique, after daily pay-activation of the sensory surface. Studies of hybridization with homologous RNA of positive samples had presented average values of relative frequency of $0,58 \pm 0.01\%$, showing specify when compared with the controls: Not homologous RNA ($0.01 \pm 0.02\%$) and ss-DNA of E. coli ($0,12 \pm 0.2\%$). These findings show the viability of the technique as promising for diagnosis of the LMC.

Keywords: Piezoelectric biosensor ; Chronic myeloid leukemia; Hybridization.

Introdução

As leucemias são neoplasias malignas das células primordiais hematopoiéticas, caracterizadas por substituição difusa da medula óssea por células neoplásicas. Dentre as leucemias, a Leucemia Mielóide Crônica (LMC), caracteriza-se por ser uma doença mieloproliferativa monoclonal resultante de uma transformação neoplasias de células, como monócitos, eritrócitos, megacariócitos, células B e algumas vezes células T. A média de idade de ocorrência da doença é entre 40 e 60 anos, porém pode afetar pacientes de todas as idades¹.

A LMC é causada por uma translocação recíproca dos cromossomos 9 e 22 nas células germinativas hematopoiéticas, produzindo uma pequena anormalidade o cromossomo Philadelphia (Ph)¹, que está presente em 90-95% dos pacientes². Os pacientes com LMC positivos para o cromossomo Philadelphia têm um gene quimérico da fusão de BCR/ABL que é expresso somente nas células leucêmicas^{3,4}.

O diagnóstico das leucemias atualmente é realizado através de exames citomorfológicos e mais freqüentemente pela reação de cadeia polimerase (PCR). O método de PCR é sensível e rápido para especificamente detectar o rearranjo de BCR/ABL pela amplificação do DNA complementar (cDNA) produzido pela transcrição reversa do mRNA de BCR/ABL⁵.

A identificação de genes associados com doenças e os estágios da doença são áreas de pesquisa intensa na comunidade científica do mundo e esta atividade é de extrema necessidade⁶. As diversas mutações responsáveis por desordens herdadas são conhecidas e este conhecimento vem aumentando firmemente em todo o mundo. Decifrar a estrutura, a organização e a seqüência de moléculas de ácidos nucléicos, como também, aplicações importantes em diversos campos: diagnóstico clínico, desenvolvimento de novos e específicos procedimentos terapêuticos (focalizado na especificidade de cada pessoa para reagir diferentemente aos mesmos estímulos), pesquisas e desenvolvimento de novas drogas, terapia gênica, tecnologia de alimentos, ciências ambientais, forensis, etc⁷.

Para melhorar os cuidados com os pacientes, os laboratórios de diagnóstico molecular têm sido desafiados a desenvolverem novos testes que sejam de confiança,

exatos e que tenham custo efetivo, além disso, é necessário otimizar protocolos já existentes tornando-os mais rápidos e mais econômicos. A detecção de espécies infecciosas e de mutações genéticas no nível molecular abre possibilidades de executar o diagnóstico de confiança antes mesmo que os sintomas de uma doença apareçam⁸.

O interesse na detecção de seqüências específicas de DNA vem aumentando usando métodos de biossensores, os quais não requerem o uso de marcadores como radioisótopos, enzimas e fluoróforos⁹, oferecendo assim vantagens como monitoramento rápido da hibridização de DNA em solução em tempo real, bem como uma alta sensibilidade e especificidade¹⁰. O uso de materiais mais baratos e um baixo custo são exigências importantes no desenvolvimento dos biossensores, além disso, a redução ou a eliminação do pré-tratamento das amostras (extração, pré-concentração e separação) que conduzem a uma redução no tempo de análise são outros objetivos importantes na pesquisa de um biossensor¹¹.

O biossensor é um dispositivo eletrônico constituído por uma parte sensora, na qual o elemento biológico imobilizado reconhecerá o analito a ser testado e esse se encontra em íntimo contato com um transdutor capaz de detectar a presença de compostos em fluido biológicos ou não, convertendo em uma resposta elétrica passível de ser quantificada¹².

Biossensores, por definição, são dispositivos eletrônicos que têm a propriedade de detectar uma espécie química ou biológica (analito) quali ou quantitativamente. Ele é composto por um elemento biológico (sensor) e um transdutor. O elemento biológico ou elemento sensor tem a propriedade de reconhecer seletivamente e interagir com o analito. A resposta bioquímica desta interação, então, é convertida pelo transdutor num sinal elétrico passível de ser quantificado¹³. Estes são projetados para a simplicidade, a seletividade, a velocidade e a exatidão de resposta. A especificidade e a seletividade fornecidas pelo sistema biológico são utilizadas junto com a capacidade de processamento de sinal e de amplificação do transdutor¹⁴.

Diferentes componentes biológicos podem ser utilizados na construção de biossensores, tais como organismos, tecidos, células, organelas, membranas, enzimas, receptores, anticorpos, ácidos nucleicos e macromoléculas orgânicas¹⁵⁻¹⁹. Em geral o elemento biológico é fixado (imobilizado) na superfície sensora permitindo repetidas análises^{15,20}.

A resposta bioquímica da interação elemento biológico–analito que será convertida em sinal elétrico pelo transdutor, pode ser resultante de alterações na concentração de prótons, na liberação ou captação de gases (O_2 , CO_2 , NH_3), de íons específicos (NH_4^+ , de cátions monovalentes, CN^- , I^-), de calor, de massa, de absorvância, de condutância ou de transferência de elétrons. De acordo com o princípio de energia envolvida na transdução, são classificados basicamente quatro tipos de transdutores; os eletroquímicos, dentre eles, amperométricos, potenciométricos e condutimétricos; os acústicos ou piezelétricos; os ópticos e os térmicos²⁰.

Os biossensores de hibridização de DNA oferecem a promessa considerável para obter a informação seqüência-específica em uma maneira mais rápida, mais simples e mais barata comparada aos ensaios tradicionais de hibridização²¹. Estes se fundamentam na imobilização de ácidos nucleicos em superfícies transdutoras, que podem ser de diversos tipos de materiais, cuja superfície contém grupos químicos capazes de ligar os fragmentos de ácidos nucleicos²³. A base de um biossensor para DNA é a complementaridade da ligação entre uma seqüência específica de DNA (analito) e uma seqüência específica de DNA imobilizadas sobre um suporte sólido (transdutor)¹⁰.

Um genossensor ou biossensor para DNA, normalmente emprega fitas de DNA imobilizadas como elemento de reconhecimento e a medição do processo de ligação específica se dá com a formação de híbridos de DNA-DNA ou DNA-RNA, ou a interação entre proteínas ou moléculas com o DNA na superfície do sensor²².

Neste presente estudo foi avaliada a sensibilidade do sistema QCM em relação à imobilização de ss-cDNA de células Leucêmicas por adsorção na superfície de um eletrodo de ouro e subsequente estudos de hibridização, avaliando especificidade utilizando seqüências de RNA homólogas e não homólogas e seqüências de ss-cDNA de *E. coli*.

O QCM é um sensor de massa extremamente sensível e capaz de mensurar níveis de subnanogramas na mudança de massa²³. Os biossensores QCM de hibridização consiste na oscilação do cristal com a fita de DNA imobilizada na superfície. O aumento da massa associado com a reação de hibridização resulta na diminuição da freqüência de oscilação²⁴.

Transdutores piezoelétricos oferecem a vantagem de construção em estado sólido, quimicamente inerte, durabilidade e a possibilidade de baixo custo na produção em massa²⁴. Os sensores QCM foram usados para mensurar cineticamente a hibridização de DNA em solução²⁵, estudar quantitativamente as ligações para um DNA fita dupla (ds-DNA)²⁶ e monitorar diretamente a reação de cadeia polimerase (PCR) de DNA²⁷.

Material e métodos

1 Reagentes e Materiais

Foram utilizados seqüências de cDNA e de RNA, extraídas de células sangüíneas de pacientes com LMC, seguindo o protocolo adotado convencionalmente pelo Laboratório de Biologia Molecular do HEMOPE. Seqüências de DNA plasmidial de *E.coli* com aproximadamente 300 pbs foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do LIKA. As fitas simples de DNA (ss-cDNA) foram obtidas por aquecimento a 100⁰C de uma solução de ds-cDNA por 10 min, seguido por resfriamento imediato em banho de gelo durante 5 min. Quando aquecidas as fitas duplas de DNA, as ligações de hidrogênio intermoleculares que unem as duas fitas simples são quebradas e as fitas são separadas (Wu *et al.*, 2000). Os reagentes usados nos experimentos foram todos de grau analítico.

2 Equipamentos

O sistema piezelétrico de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM) foi constituído por um eletrodo QCM com diâmetro interno do eletrodo de ouro de 0,8 cm (10MHz, AT-cut,) acoplado a um circuito oscilador conectado a um contador de frequência (Gamry Instruments), que por sua vez foi acoplado a um microcomputador, como mostrado na figura 1.

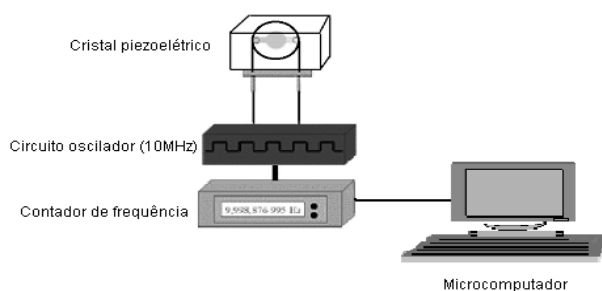


Fig.1 . Desenho esquemático do sistema QCM

3 Preparação da superfície do eletrodo QCM

A superfície do eletrodo QCM foi lavada duas vezes com acetona e esterilizada em luz ultravioleta por 15min, sendo esta posteriormente ativada com solução de 1,2 M de NaOH seguida por solução de 1,2M de HCl, ambas por 10 min e lavadas duas vezes com tampão tris-HCl (pH 8.2; 0,2 M).

4 Imobilização de Sequências de ss-cDNA

Um volume de 20 μl de uma solução de ss-cDNA (10 $\mu\text{g/ml}$) preparada em tampão tris-HCl (pH 8.2, 0.2M) foi incubada a 4⁰C durante 12h “*overnight*” na superfície do eletrodo QCM previamente tratado. Após esse período, a superfície do eletrodo foi lavada duas vezes com tampão tris-HCl com o objetivo de remover o excesso de ss-cDNA que não foi adsorvido.

5 Experimentos de Hibridização

5.1 Hibridização com amostras de RNA

O procedimento da reação de hibridização com amostras de RNA homólogo e não homólogo ao ss-cDNA imobilizado, foi realizado incubando-se 20 μl de uma solução de RNA (10 $\mu\text{g/ml}$) na superfície do eletrodo QCM. Os experimentos foram conduzidos variando a temperatura e o tempo de incubação para estudos cinéticos. Foram realizadas duas condições de hibridização, a primeira, incubando as amostras de RNA a 60⁰C por 12h e a segunda, à temperatura ambiente (25⁰C) por 10 min. Posteriormente à hibridização, o eletrodo QCM foi lavado duas vezes com tampão tris-HCl (pH 8.2, 0.2M) para retirar o excesso de RNA não hibridizado.

5.2 Hibridização com amostras de ss-cDNA homólogo e ss-cDNA de *E. coli*

Um volume de 20µl de soluções de ss-cDNA homólogo (10µg/ml) foram incubadas sobre a superfície do eletrodo QCM a 4⁰C durante 12h, sendo removidas o excesso das fitas não hibridizadas com lavagens com tampão tris-HCl (pH 8.2, 0.2M). Foram realizados experimentos controles de hibridização com fita dupla de cDNA (ds-cDNA) e com ss-cDNA de *E. coli*.

6 Avaliação das alterações de frequências

Todos os experimentos foram realizados no sistema QCM na fase gasosa e as mudanças das frequências elétricas apresentadas pelo eletrodo QCM com as amostras foram registradas por um contador de frequência acoplado a um microcomputador a cada 0.5min durante 10 min em todos os sucessivos passos do ensaio. Antes das frequências serem mensuradas os eletrodos foram secos com N₂ durante 5 min.

Resultados e discussão

1 Estudos de Hibridização ao ss-cDNA imobilizado

O QCM, sendo um dispositivo extremamente sensível à variação de massa, permite monitorar em tempo real todas as etapas da experimentação em função da diminuição de frequência elétrica do biossensor. Na figura 2 é mostrado um típico ensaio de acompanhamento das etapas: controle (eletrodo QCM após tratamento da superfície), após imobilização com ss-cDNA e hibridização com RNA homólogo.

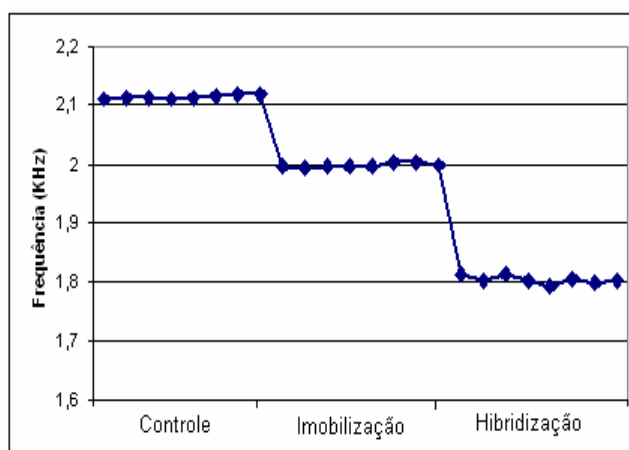


Fig.2. Ensaio experimental típico mostrando as medidas de frequência correspondentes às etapas de imobilização e hibridização.

A habilidade do RNA homólogo em reconhecer ss-cDNA imobilizado foi estudada quando foram comparadas as alterações de frequências produzidas pela hibridização em relação à frequência medida após a etapa de imobilização. A figura 3 comprova a eficiência do biossensor QCM em detectar a seqüências de RNA específica. A hibridização com RNA homólogo apresentou alterações significativas de valores de frequências quando comparados com os da imobilização apresentando valores médios de $0,58 \pm 0,01\%$ e $0,09 \pm 0,01 \%$ para a imobilização e hibridização, respectivamente, e confirmados com significância estatística pelo teste *t* pareado ($p < 0,01$).

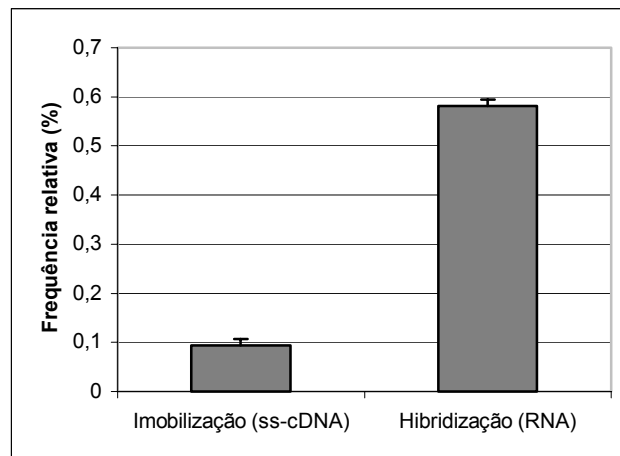


Fig.3. Alteração de frequência resultante nas etapas imobilização de ss-cDNA e hibridização com RNA homólogo.

Para estudos de especificidade diagnóstica do biossensor foram realizados experimentos de hibridização com RNA controle (RNA não homólogo). Na tabela 1 são mostrados os resultados de hibridização realizada com RNA homólogo e RNA não homólogo, sendo confirmadas diferenças significativas de frequências entre as hibridizações, $0,58 \pm 0,01\%$ e $0,02 \pm 0,01\%$ ($n=20$), respectivamente, confirmadas pelo teste t pareado ($p<0,01$), mostrando que o ss-DNA imobilizado no biossensor apresentou uma resposta de frequência superior a 50% em reconhecer a seqüência de RNA homóloga.

Tabela. 1. Resultados comparativos das variações de frequências referentes aos estudos de hibridização com RNA homólogo e RNA não homólogo.

Hibridização	Frequência Relativa (%)	N
RNA homólogo	$0,58 \pm 0,01$	20
RNA não homólogo	$0,02 \pm 0,01$	20

N- Número de amostragem.

Estudos de hibridização com outras amostras controles, contendo ss-cDNA homólogo e ss-cDNA de *E.coli* foram realizados. Na figura 4 são mostrados resultados de alterações de frequências quando os experimentos de hibridização foram realizados incubando soluções de ss-cDNA homólogo e ss-cDNA de *E. coli* (aproximadamente 70% não homólogo). A especificidade diagnóstica do biossensor foi satisfatória visto que foram observadas diferenças significativas ($p<0,01$, teste t), para valores médios de frequências de $0,09 \pm 0,02\%$ e $0,01 \pm 0,01\%$, para ss-cDNA homólogo e ss-cDNA não-homólogo de *E. coli*, respectivamente. A alteração de frequência referente à hibridização de ss-cDNA de *E. coli* pode ser explicada tanto por ligações não específicas de seqüências ou fragmentos moleculares à superfície do eletrodo quanto por homologia entre as fitas ss-cDNA de LMC e ss-cDNA plasmidial de *E. coli*, num percentual de aproximadamente 30%.

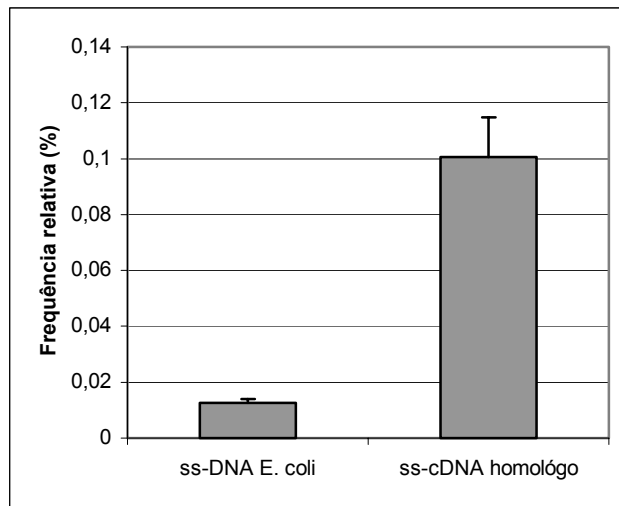


Fig.4. Respostas de freqüências referentes à hibridização com ss-cDNA homólogo e ss-cDNA de *E. coli* (70% homólogo).

Conclusão

Diante do exposto, pode-se concluir:

- A hibridização foi representada por diversos experimentos, dentre estes os realizados com RNA homólogo apresentaram um resultado satisfatório de $0,58 \pm 0,01\%$;
- Os estudos de especificidade do biossensor mostraram a capacidade de diferenciar na hibridização, as seqüências de RNA homólogas ($0,58 \pm 0,01\%$) das seqüências de RNA não homólogas ($0,02 \pm 0,01\%$) e de ss-cDNA de *E. coli* ($0,01 \pm 0,01\%$);
- Enfim, os resultados apontam a viabilidade do biossensor como um método promissor no diagnóstico da LMC.

Referências bibliográficas

1. Kalaycio, M.E. *Clev.Clin. Journal Med.* **2001**, 68, 913.
2. Mitelman, F., Johansson. B., Mertens, F. Mitelman ed. **2001**.
3. Heisterkamp, N.; Groffen, J. *Haemat Phatol.* **1991**, 5.
4. Ben neriah, Y.; Daley, G.Q.; Mes-messon, A.M.; Witte, O.N.; Baltimore, D. *Science.* 1984, 223, 212.
5. Kawasaki, E.S.; Clark, S.S.; Coyne, N.Y.; Smith, S.D.; Champlin, R.; Witte, O.N.; McCormick, F.P. *Proc Naatl Acad Sci.* **1988**, 86.
6. Blohm, D.H., Guiseppi-Elie, A.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, 12, 41.
7. Gheorghe, M.; Guiseppi-Elie, A. *Bios. Bioel.* **2003**, 1
8. Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Turner, A.P.F.; MascinI, M. *Bios. Bioel.* **2003**.
9. Downs, M.E.A. *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, 19, 39.
10. Zhou, X.C.; Huang, L.Q.; Yau Li, S.F. *Bios. Bioel.* **2001**, 16, 85.
11. Grubor, N.M.; Shinar, R.; Jankowiak, R.; Porter, M.D.; Small, G.J.; *Bios. Bioel.* **2003**
12. Dutra, R.A.F.; Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, 1999.
13. Schulk, P. ; *An. Rev. Bioph. and Biomol. Struct.* **1997**, 26, 541.
14. Ngeh-ngwainbi,J.; Ahmad, A.S.; George, G.G.; *Bios. Bioel.* **1990**, 5, 13.
15. Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S.; Oxford University Press, **1987**, 494.
16. Zhang, Y.; Chen, N. Y.; Zhu, L. G.; *Chem. J. Chin. Univers.* **2000**, 21, 675.
17. Iwuoha, E. I.; Kane, S.; AniA, C. O.; Smyth, M. R.; de Montellano, P. R.O.; Fuhr, U.; *Electroanal.* **2000** , 12, 980.
18. Bottcher, H.; *J. Prakt. Chemie-Pract. Appl. Chem.* **2000**, 342, 427.
19. Bhatia, R. B.; Brinker, C. J.; Gupta, A. K.; Singh, A. K.; *Chem. Mat.* **2000**, 12, 2434.
20. Eggins, B.R. ;Jonh Willey & Sons. **1996**, 223.
21. Wang, J. ;*Bios. Bioel.* **1998**, 13, 757.
22. Yang, M.; Mcgovern, M.E.; Thompson, M.; *Anal. Chim. Act.* **1997**, 346, 259.
23. Zhou, X.C.; O'Shea, S.J.; Li, S.F.Y. ;*Chem. Commun.* **2000**, 953.
24. Wang, J.; *Nucleic Acids Research.* **2000**, 28, 3011.

25. Su, H.; Sandra, C.; Thompson, M. ;Bios. Bioel. **1997**, 12, 161.
26. Okahata, Y.; Nikura, K.; Sugiura, Y.; Sawata, M.; Morri, T. ;Biochem. **1998**, 7, 5666.
27. Nikura, K.; Matsuno, H.; Ohatake, H.; Furasama, H.; Ebara, Y.; Am. Chem. Soc. **1998**, 120, 8537.

3. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que:

1. A nova composição de grafite e endurecedor a base de polimercaptanas forneceu um eletrodo capaz de imobilizar ácidos nucleicos sem a necessidade do uso de modificador, preparo químico ou alterações eletroquímicas. O novo eletrodo de DNA apresentou estabilidade na imobilização do DNA. A presença de grupos aminos na composição do endurecedor, provavelmente interage com o grupamento fosfato da posição terminal 5' da fita de DNA. O novo eletrodo de DNA é de fácil preparação, com tempo de cura relativamente baixo à temperatura ambiente, renovável, não necessitando de tratamentos químico ou eletroquímico e, acima de tudo, de baixo custo. A nova metodologia de detecção da hibridização sem o uso de indicadores eletroativos se procedeu com sucesso, o simples monitoramento da temperatura em torno de 16°C foi suficiente para observar as alterações dos picos oxidativos de guanina e adenina, que indicaram a hibridização da sonda de DNA com a sua fita complementar.
2. Quitosana ativado com solução alcalina de hidróxido de sódio demonstrou ser altamente eficiente na preparação de filme delgado modificador da superfície de eletrodos de ouro de cristal piezométrico, favorecendo assim, uma imobilização estável e de baixo custo.
3. A imobilização direta de ácidos nucleicos leucêmicos na superfície de eletrodo de ouro de cristais piezométrico forneceu um novo biossensor piezométrico (QCM). O estudo de diferentes temperaturas de hibridização da sonda de DNA com a sua fita complementar demonstrou melhor eficiência na temperatura de 60°C, podendo assim o sensor ser utilizado em meio gasoso, tanto para a imobilização quando para a hibridização de ácidos nucleicos leucêmicos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Babkina SS, Ulakhovich NA, Zyavkina YI (2004) Amperometric DNA biosensor for the determination of auto-antibodies using DNA interaction with Pt (II) complex. *Analytica Chimica Acta*. **502**, 23-30

Baeumner AJ, Schlesinger NA, Slutzki NS, Romano J, Lee EM, Montagna RA (2002) Biosensor for Dengue virus detection: sensitive, rapid, and serotype specific. *Analytical Chemistry*. **74**, 1442-1448.

Bataillard P (1993) Calorimetric sensing in bioanalytical chemistry-Principles, applications and trends. *Trac-Trends in analytical chemistry*. **12** (10): 387-394.

Biotechnology Information Center-National Agricultural Library/USDA
([http:// www.accessexcellence.org](http://www.accessexcellence.org)). Acesso em: 10/2003.

Bogdanovskaya VA, Tarasevich MR (1996) Electrochemical biosensors for Medicine and ecology. *Biosensors & Bioelectronics*. **11**(9), 853-861.

Brabec V (1980) Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode. Qualitative aspects. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. **7**, 69-82.

Brabec V (1981) Nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. **8**, 437-449.

Brabec V (1983) Conformational changes in DNA induced by its adsorption at negatively charged surfaces. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. **11**, 245-255.

Braguglia CM (1998) Biosensors: An outline of general principles and applications. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*. **12**(4), 183-190.

Brett CMA, Brett AMO, Serrano SHP (1994) On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **366**, 225-231.

Brett CMA, Serrano SHP, Gutz I, La-Scalea MA, Cruz MI (1997) Voltammetric behavior of nitroimidazoles at a DNA-biosensor *Electroanalysis*. **9**, 1132-1137.

Brett CMA, Brett AMO, Serrano SHP (1999) An EIS study of DNA-modified electrodes. *Electrochimica Acta*. **44**, 4233-4239.

Caelen I, Kalman A, Wahlstrom L (2004) Biosensor-based determination of riboflavin in milk samples. *Analytical Chemistry*. **76**, 137-143.

Cai H, Xu C, He P, Fang Y (2001) Colloid Au-enhanced DNA immobilization for the electrochemical detection of sequence-specific DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **510**, 78-85.

Caruso F, Rodda E, Furlong DN (1997a) Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development. *Analytical Chemistry*. **69**, 2043-2049.

Caruso F, Rodda E, Furlong DN, Haring V (1997b) DNA binding and hybridization on gold and derivatized surfaces. *Sensors and Actuators-B chemical*. **41**, 189-197.

Carvalho RM, Rath S, Kubota LT (2003) SPR- uma nova ferramenta para biossensores. *Química Nova*. **26**(1), 97-104.

Chaubey A & Malhotra BD (2002) Mediated biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **17**, 441-456.

Chen X, Zhang X-E, Chai Y-Q, Hu W-P, Zhang Z-P, Zhang X-M, Cass AEG (1998) DNA optical sensor: a rapid method for the detection of DNA hybridization. *Biosensors & Bioelectronics*. **13**, 451-458.

Chenggnou HU & Shengshui HU. (2004) Electrochemical characterization of cetyl trimethyl ammonium bromide modified carbon paste electrode and the application in the immobilization of DNA. *Electrochimica Acta*. **49**, 405-412.

Chou S-F, Hsu W-L, Hwang J-M, Chen C-Y (2002) Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on a Quartz Crystal Microbalance. *Analytica Chimica Acta*. **453**, 181-189.

Collings AF, Caruso F (1997) Biosensors: recent advances. *Reports on Progress in Physics*. **60**(11), 1397-1445.

Cumming EA, Mailley P, Linquette-Mailley S, Eggins BR, McAdams ET, McFadden S (1998) Amperometric carbon paste biosensor based on plant tissue for the determination of total flavanol content in beers. *Analyst*. **123**(10), 1975-1980.

Daikhin L, Gileadi E, Tsionsky V, Urbakh M, Zilberman G (2000) Slippage at adsorbate-electrolyte interface. Response of electrochemical quartz crystal microbalance to adsorption. *Electrochimica Acta*. **45**, 3615-3621.

Danielsson B, Hedberg U, Rank M, Xie B (1992) Recent investigation on calorimetric biosensors. *Sensors and Actuators B*. **6**, 138-142.

Duman M, Saber R, Piskin E (2003) A new approach for immobilization of oligonucleotides onto piezoelectric quartz crystal for preparation of a nucleic acid sensor for following hybridization. *Biosensors & Bioelectronics*. **18**(11), 1355-1363.

Eggenstein C, Borchardt M, Diekmann C, Grundig B, Dumschat C, Cammann K, Knoll M, Spener F (1999) A disposable biosensor for urea determination in blood based on an ammonium sensitive transducer. *Biosensors & Bioelectronics* **14**(1), 33-41.

Eggins BR (1996) In: *Biosensors, an introduction*, ed. John Wiley & Sons England.

Eickes C, Rosenmund J, Wasle S, Doblhofer K, Wang K, Weil KG (2000) The electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) in the studies of complex electrochemical reactions. *Electrochimica Acta*. **45**, 3623-3628.

Erdem A, Kerman K, Meric B, Akarca US, Ozsoz M (1999) DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the hepatitis B virus. *Electroanalysis*. **11**(8), 586-588.

Eun AJC, Huang LQ, Chew FT, Li SFY, Wong SM (2002) Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance-based DNA biosensors. *Phytopathology*. **92**(6), 654-658.

Fatibello Filho O, Capelato MD (1992) Biossensores. Revisão. *Química Nova*. **15** (1), 28-39.

Fundação Nacional de Saúde.Gov.(a) 2003.
(<http://www.saude.pr.gov.br/Seminario/Dengue/funasa.htm>).

Fundação Nacional de Saúde.Gov.(b). 2003
(http://www.funasa.gov.br/pub/pdfs/manual_tuberculose.pdf)

Gheorghe M & Guiseppi EA (2003) Electrical frequency dependent characterization of DNA hybridization. *Biosensors & Bioelectronics*. **19** (2) 95-102

Gherghi IC, Girousi ST, Pantazaki AA, Voulgaropoulos AN, Tzimou-Tsitouridou R (2003) Electrochemical DNA biosensors applicable to the study of interactions between DNA and DNA intercalators. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **83**(7-8), 693-700.

González-García MB, Fernández-Sánchez C, Costa-García A (2000) Colloidal gold as an electrochemical label of streptavidin-biotin interaction.

Biosensors & Bioelectronics. **15**, 315-321.

Gooding JJ (2002) Electrochemical DNA hybridization biosensors.

Electroanalysis. **14**(17), 1149-1156.

Harwood GW, Pouton CW (1996) Amperometric enzyme biosensors for the analysis of drug and metabolites. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **18**, (2), 163-191.

Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y (1994) Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Analytica Chimica Acta*, **286**, 219-224.

Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y (1998) Microfabricated disposable DNA sensor for detection of hepatitis B virus DNA. *Sensors and Actuators-B chemical*, **46**, 220-225.

Henke L, Krull UJ (1999) Immobilization technologies used for nucleic acid biosensors: A review. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*. **44**(2), 61-70.

Huber A, Demartis S, Neri D (1999) The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *Journal of Molecular Recognition*. **12**(3), 198-216.

Inoue K, Arai T, Aoyagi M (1999) Sensitivity of real time viral detection by an optical biosensor system using a crude home-made antiserum against measles virus as a ligand. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. **22**, (2), 210-213.

Ivnitski D, Abdel-Hamid I, Atanasov P, Wilkins E (1999) Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosensors & Bioelectronics*. **14**(7), 599-624.

Jelen F, Fojta M, Palecek E (1997) Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNAs. *Electroanalytical Chemistry*. **427**, 49-56.

Jiang GF, Chen RS, Yan H, Qi QY (2001) A new method of preparing fiber-optic DNA biosensor and its array for gene detection. *Science in China Series C-Life Sciences*. **44**(1), 33-39.

Junhui Z, Hong C, Ruifu Y.(1997) Dna based biosensors. *Biotechnology Advances*. **15** (1), 43-58.

Kalaycio M.E (2001) *Clev. Clin. Journal Med*. **68**, 913

Kleinjung F, Bier FF, Warsinke A, Scheller FW (1997) Fibre-optic genosensor For specific determination of femtomolar DNA oligomers. *Analytica Chimica Acta*. **350**, 51-58.

Ko AI, Reis MG, Dourado CMR, Johnson WD, Riley LW (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. *Lancet*. **354**(9181), 820-825.

Koncki R, Radomska A, Glab S (2000) Potentiometric determination of dialysate urea nitrogen. *Talanta*, 52, 13-17.

Kovács B, Nagy G, Dombi R, Tóth K (2003) Optical biosensor for urea with improved response time. *Biosensors & Bioelectronics*. **18** (2-3), 111-118.

La-Scalea MA, Serrano SHP, Gutz IGR (1999) Eletrodos modificados com DNA: Uma nova alternativa em eletroanálise. *Química Nova*. **22** (3), 417-424.

Lange K, Bender F, Voigt A, Gao H, Rapp M (2003) A surface acoustic wave biosensor concept with low flow cell volumes for label-free detection. *Analytical Chemistry*. **75** (20), 5561-5566.

Larsson C, Rodahl M, Höök F (2003) Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization on a 2D arrangement of streptavidin on a biotin-modified lipid bilayer on SiO₂. *Analytical Chemistry*. 5080-5087.

Lassalle N, Mailley P, Vieil E, Livache T, Roget A, Correia JP, Abrantes LM (2001) Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electrochemical sensors of DNA. Preliminary study of real time monitoring by in situ techniques. *Electroanalytical Chemistry*. **509**, 48-57.

Li L, Wang M, Dong S, Wang E (1997) Electrochemical investigation of DNA adsorbed on conducting polymer modified electrode. *Analytical Science* **13**, 305-310.

Liao JC, Hoake DA, Ho CM, Churchill BM (2002) Rapid electrochemical detection of uropathogenic bacteria using DNA biosensors. *Journal of Urology*. **167** (4), 7.

Liu S, Ye J, He P, Fang Y (1996) Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode. *Analytica Chimica Acta*. **335**, 239-243.

Liu Y, Yu X, Zhao R, Shangnan D.H, Bo Z.y, Liu G.Q (2003) Quartz crystal biosensor for real-time monitoring of molecular recognition between protein and small molecular medicinal agents. *Biosensors & Bioelectronics*. **19** (1), 9-19.

Löfås S, Johnsson B (1990) A novel hydrogel matrix on gold surfaces in Surface Plasmon Resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *Journal of Chemistry Society*. 1526-1528.

Lu H, Zhao YJ, Ma JM, Li WY, Lu ZH (2000) Characterization of DNA hybridization on the optical fiber surface. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. **175**(1-2),147-152.

Lu XJ, Ju HX (2003) Electrochemical deoxyribonucleic acid biosensors, and their applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*. **31**(1), 110-115.

Lucarelli F, Authier L, Bagni G, Marrazza G, Baussant T, Aas E, Mascini M (2003) DNA biosensor investigations in fish bile for use as a biomonitoring tool. *Analytical Letters*. **36**(9), 1887-1901.

Lucarelli F, Marrazza G, Turner A.P.F. Mascini M (2004) Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **19**, 515-530

Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW (2001) Immunosensors-principles and applications to clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta*. **314**, 1-26.

Mailley P, Cumming EA, Mailley SC, Eggins BR, McAdams E, Cosnier S (2003) Composite carbon paste biosensor for phenolic derivatives based on *in situ* electrogenerated polypyrrole bider. *Analytical Chemistry*, **75**(20), 5422-5428.

Malicka J, Gryczynski I, Gryczynski Z, Lakowicz J.R (2003) DNA hybridization using surface plasmon-coupled emission. *Analytical Chemistry*. **75**. 6629-6633.

Mannelli I, Minunui M, Tombelli S, Mascini M (2003) Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosensors & Bioelectronics*. **18** (2-3), 129-140.

Marrazza G, Chianella I, Mascini M (1999a) Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. *Biosensors & Bioelectronics*. **14**, (1), 43-51.

Marrazza G, Chianella I, Mascini M (1999b) Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Analytical Chimica Acta*. **387**, 297-307.

Marrazza G, Tombelli S, Mascini M, Manzoni A (2003) Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR. *Clinica Chimica Acta*. **329** (1-2), 157.

Mickelsen SR (1996) Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis*. **8** (1), 15-19.

Millan KM, Saraullo A, Mikkelsen SR (1994) Voltammetric DNA biosensor For Cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. *Analytical Chemistry*. **66**, 2943-2948.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (1997)
([http:// www. Saude.gov.br](http://www.Saude.gov.br)).

Mitelman F, Johansson B, Merteus F, Mitelman ed. 2001

Morgan CL, Newman DJ, Price CP (1996) Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. *Clinical Chemistry*. **42**(2), 193-209.

Moser I, Schalkhammer T, Pittner F, Urban G (1997) Surface techniques for an electrochemical DNA biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. **12**(8),729-737.

Muhammad-Tahir Z, Alocilja EC (2003) A conductometric biosensor for biosecurity. *Biosensors & Bioelectronics*. **18**(5-6), 813-819.

Nakamura F, Ito E, Sakao Y, Ueno N, Gatuna IN, Ohuchi FS, Hara M (2003) Preparation of a branched DNA self-assembled monolayer toward sensitive DNA biosensors. *Nano Letters*. **3** (8), 1083-1086.

Ngeh-Ngwainbi J, Suleiman AA, Guilbault GG (1990) Piezoelectric Crystal Biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **5**, 13-26.

Nicolini C, Erokhin V, Facci P, Guerzoni S, Ross A, Paschkevitsch P (1997) Quartz balance DNA sensor. *Biosensors & Bioelectronics*. **12**(7), 613-618.

Nogueira RMR, Miagostovich MP, Schatzmayr HG, dos Santos FB, de Araújo ESM, de Filippis AMB, de Souza RV, Zague SMO, Nicolau C, Barau M, Teixeira G (1999) Dengue in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1986-1998. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. **94**(3), 297-304.

Ozsoz M, Erdem A, Kara P, Kerman K, Ozkan D (2003) Electrochemical biosensor for the detection of interaction between arsenic trioxide and DNA based on guanine signal. *Electroanalysis*. **15**(7), 613-619.

Ozsoz M, Erdem A, Kerman K, Ozkan D, Tugrul B, Topcuoglu N, Ekren H, Taylan M (2003) Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. *Analytical Chemistry*. **75**, 2181-2187

Paddle B.M (1996) Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. *Biosensors & Bioelectronics*. **11**(11), 1079-1113.

Palecek E, Fojta M, Tomschik M, Wang J (1998) Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. *Biosensors & Bioelectronics*. **13**, (6), 621-628.

Pang D-W, Abruña H.D (1998) Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules. *Analytical Chemistry*. **70**. 3162-3169.

Pang D-W, Zhang M, Wang Z-L, Qi Y-P, Cheng J-K, Liu Z-Y (1996) Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **403**, 183-188.

Pedano M.L. & Rivas G.A (2003) Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **18**(2-3), 269-277.

Pereira AC, Santos AS, Kubota LT (2002) Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*. **25**(6), 1012-1021.

Piunno PAE, Krull UJ, Hudson RHE, Damba MJ, Cohen H (1994) Fiber optic biosensor for fluorometric detection of DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*. **288**, 205-214

Pividori MI, Merkoçi A, Alegret S (2000) Electrochemical genosensor design: Immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection Methods. *Biosensors & Bioelectronics*. **15**, 291-303.

Pividori MI, Merkoçi A, Alegret S (2001) Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridization genosensor. *Biosensors & Bioelectronics*. **16**, 1133-1142.

Pividori MI, Merkoçi A, Alegret S (2003) Graphite-epoxy composite as a new transducing material for electrochemical genosensing. *Biosensors & Bioelectronics*. **19** (5), 473-484.

Porter KR, Widjaja S, Lohita HD, Hadiwijaya SH, Moroef CN, Suharyono W, Tan R (1999) Evaluation of a commercially available immunoglobulin M, Capture enzyme-linked immunosorbent assay kit diagnosing acute dengue infections. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology*. **6**(5), 741-744.

Qiu W, Parzuchowski P, Zhang W, Meyerhoff M.E (2003) Optical sensor for amine vapors based on dimer-monomer equilibrium of indium (III) octaethylporphyrin in a polymeric film. *Analytical Chemistry*. **75**, 332-340

Radi A, El Ries MA, Kandil S (2003) Electrochemical study of the interaction of levofloxacin with DNA. *Analytica Chimica Acta*. **495**, 61-67.

Ravichandran K, Baldwin RP (1981) Chemically modified carbon paste electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **126**, 293-300.

Reshetilov NA (1996) Model of biosensors based on principles of potentiometric and amperometric transducers: Use in medicine, biotechnology, and environmental monitoring. (Review). *Applied Biochemistry and microbiology*. **32**(1), 72-85.

Rice ME, Galus Z, Adams RN (1983) Graphite paste electrodes- Effects of paste compositions and surface states on electron-transfer rates. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **143**, 89-102.

Rickert J, Brecht A, Göpel W (1997) Quartz crystal microbalance for quantitative biosensing and characterizing protein multilayers. *Biosensors & Bioelectronics*. **12** (7), 567-575.

Rosatto SS, Freire RS, Durán N, Kubota LT (2001) Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*. **24** (1), 77-86.

Rowe CA, Tender LM, Feldstein MJ, Golden JP, Scruggs SB, MacCraith BD, Crass JJ, Ligler FS (1999) Array Biosensor for Simultaneous Identification of Bacterial, Viral, and Protein Analytes. *Analytical Chemistry*. **71**(17) 3846-3852.

Sampath S, Lev O (1996) Inert metal-modified, composite ceramic-carbon, amperometric biosensors: Renewable, controlled reactive layer. *Analytical Chemistry*. **68**, 2015-2021.

Scheper TH, Hilmer JM, Lammers F, Muller C, Reinecke M (1996) Biosensor in bioprocess monitoring. *Journal of Chromatography A*. **725**(1), 3-12.

Secordel RPM, Poisson F, VanRegenmortel MHV (1996) Uses of biosensor technology in the development of probes for viral diagnosis. *Clinical and Diagnostic Virology*. **5**(2-3), 111-119.

Sethi RS (1994) Transducer aspects of biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **9**, 243-264.

Sigrist H, Gao H (1999) Biosensors @ CSEM. *Chimia*. **53** (3), 81-86.

Silin V, Plant A (1997) Biotechnological applications of surface plasmon resonance. *Trends in Biotechnology*. **15**(9), 353-359.

Skladal P (2003) Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. **14**(4), 491-502.

Skuridin SG, Yevdokimov YM, Efimov VS, Hall JM, Turner APF (1996) A new approach for creating double-stranded DNA biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **11**(9), 903-911.

Solak AO, Eichorst LR, Clark WJ, McCreery RL (2003) Modified carbon surfaces as "organic electrodes" that exhibit conductance switching *Analytical Chemistry*. **75**, 296-305.

Souza D, Machado S.A.S., Avaca L.A (2003) Voltametria de onda quadrada Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, **26** (1), 81-89.

Stanley S, Percival CJ, Aner M, Braithwaite A, Newton MI, Mcttale G, Hayes W (2003) Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons using quartz crystal microbalance. *Analytical Chemistry*. **75**, 1573-1577

Storri S, Santoni T, Minunni M, Mascini M (1998) Surface modifications for the development of piezoimmunosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. **13**, (3-4), 347-357.

Su C-C, Wu T-Z, Chen L-K, Yang H-H, Tai D-F (2003) Development of immunochips for detection of Dengue viral antigens. *Analytica Chimica Acta*. **479**, 117-123.

Sukhorukov GB, Montreal MM, Petrov AI, Shabarchina LI, Sukhorukov BI (1996) Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications. *Biosensors & Bioelectronics*. **11**(9), 913-922.

Taft BJ, O`Keefe M, Fourkas JT, Kelley SO (2003) Engineering DNA Electrode connectivities manipulation of linker length and structure. *Analytica Chimica Acta*. **496**, 81-91.

Tapuhi E, Venter EA, Kfir R (1996) Trends in biosensor development and some potential applications. *South African Journal of Chemistry Suid-Afrika. Tydsk Vir. Chemie*. **49**(1-2), 8-25.

Teijeiro C, Perez P, Marín D, Palecek E (1995) Cyclic voltammetry of mitomycin C and DNA. *Bioelectrochemistry & Bioenergetics*. **38**, 77-83.

Thorp HH (1998) Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation. *TIBTECH*. **16**, 117-121.

Toko K (1998) Electronic Tongue. *Biosensors & Bioelectronics*. **13**(6), 701-709

Tombelli S, Mascini M, Braccini L, Anichini M, Turner APF (2000) Coupling of a DNA piezoelectric biosensor and polymerase chain reaction to detect apolipoprotein E polymorphisms. *Biosensors & Bioelectronics*. **15**, 363-370.

Tombelli S, Marrazza G, Mascini M (2001) Recent advances on DNA biosensors. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. **80**(2), 87-99.

Towery RB, Fawcett NC, Zhang P, Evans JA (2001) Genomic DNA hybridizes with the same rate constant on the QCM biosensor as in homogeneous solution. *Biosensors & Bioelectronics*. **16**,1-8.

Tsoi PY, Yang J, Sun YT, Sui SF, Yang M (2000) Surface Plasmon Resonance study of DNA polymerases binding to template/primes DNA duplexes immobilized on supported lipid monolayers. *Langmuir*. **16**, 6590-6596

Vanghau RD, Carter RM, O`Sullivan CK, Guilbault GG (2003) A Quartz crystal microbalance (QCM) sensor for the detection of *Bacillus cereus*. *Analytical Letters*. **36** (14), 3095.

Varela H, Malta M, Torresi M (2000) Técnicas *in situ* de baixo custo em Eletroquímica: A microbalanço a Cristal de Quartzo. *Química Nova*. **23**(5), 664 – 679.

Vo-Dinh T, Cullum B (2000) Biosensors and Biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **366**, (6-7), 540-551.

Wang J (2003) Nanoparticle-based electrochemical DNA detection. *Analytica Chimica Acta*. **500**, 247-257.

Wang J (2002) Electrochemical nucleic acid biosensors. *Analytica Chimica Acta*. **469**(1), 63-71.

Wang J, Cai X, Rivas G, Shiraishi H (1996a) Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes. *Analytica Chimica Acta*. **326**, 141-147.

- Wang J, Cai X, Rivas G, Shiraishi H, Dontha N (1997a) Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosensors & Bioelectronics*. **12**(7), 587-599.
- Wang J, Chicharro M, Rivas G, Cai X, Dontha N, Farias PAM, Shiraishi H (1996b) DNA biosensor for the detection of hydrazines. *Analytical Chemistry*. **68**(13), 2251-2254.
- Wang J, Fernandes JR, Kubota LT (1998a) Polishable and renewable DNA Hybridization biosensors. *Analytical Chemistry*. **70**, 3699-3702.
- Wang J, Gründler P, Flechsig G-U, Jasinski M, Rivas G, Sahlin E, Paz JLL (2000) Stripping analysis of nucleic acids at a heated carbon paste electrode. *Analytical Chemistry*. **72**, 3752-3756.
- Wang J, Kawde A-N (2001) Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*. **431**, 219-224.
- Wang J, Rivas G, Cai X, , Dontha N, Shiraishi H, Luo D, Valera FS (1997b) Sequence-specific electrochemical biosensing of *M. tuberculosis* DNA. *Analytica Chimica Acta*. **337**, 41-48.
- Wang J, Rivas G, Cai X, Palecek E, Nielsen P, Shiraishi H, Dontha N, Luo D, Parrado C, Chicharro M, Farias PAM, Valera FS, Grand DH, Ozsoz M, Flair MN (1997c) DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Analytica Chimica Acta*. **347**, 1-8.
- Wang J, Rivas G, Fernandes JR, Paz JLL, Jiang M, Waymire R (1998b) Indicator-free electrochemical DNA hybridization biosensor. *Analytica Chimica Acta*. **375**, 197-203.

Wang J, Zandeei JM (1988) Ensembles of carbon paste ultramicroelectrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **249**, 339-345.

Weetall HH(1999)Chemical sensors and biosensors, update, what, where, when and how. *Biosensors & Bioelectronics*. **14** (2), 237-242.

Wilson & Walker (1997) In: *Practical Biochemical Principles and Techniques*, 4^a ed.

Yang M, McGovern ME, Thompson M (1997) Genosensor technology and the Detection of interfacial nucleic acid chemistry. *Analytica Chimica Acta*. **346**, 259-275.

Zhang H, Tan H, Wang R, Wei W, Yao S (1998) Immobilization of DNA on silver surface of bulk acoustic wave sensor and its application to the study of UV-C damage. *Analytica Chimica Acta*. **374**, 31-38.

Zhang S, Wright G, Yang Y (2000) Materials and techniques for Electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors & Bioelectronics*. **15**, 273-282.

Zhou X, Liu L, Hu M, Wang L, Hu J (2002) Detection of hepatitis B virus by piezoelectric biosensor. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **27**, 341-345.

Zhou XC, Huang LQ, Li SFY (2001) Microgravimetric DNA sensor based on Quartz Crystal Microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization Methods and the application in genetic diagnosis. *Biosensors & Bioelectronics*. **16**, 85-95.

Zou Y, Mo J (1999) Ensembles of carbon paste microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*. **382**, 145-150.