UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE FÍSICA

STEPHANIE LISBOA DELLEVEDOVE

Detecção de alterações de miRNAs relacionados ao
câncer colorretal utilizando sensores de carga e
massa

Ribeirão Preto – SP

2018

STEPHANIE LISBOA DELLEVEDOVE

**Detecção de alterações de miRNAs relacionados ao
câncer colorretal utilizando sensores de carga e
massa**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo como
parte das exigências para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:

Física Aplicada à Medicina e Biologia

Orientador:

Marcelo Mulato

Ribeirão Preto – SP

2018

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Dellevedove, Stephanie Lisboa

Detecção de alterações de miRNAs relacionados ao câncer colorretal utilizando sensores de carga e massa /Stephanie Lisboa Dellevedove; supervisor Marcelo Mulato. – Ribeirão Preto, 2018. 68p.: il.

Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, 2018.

1. Eletroquímica. 2. QCM. 3. DNA. 4. miRNA

Nome: DELLEVEDOVE, Stephanie Lisboa

Título: Detecção de alterações de miRNAs relacionados ao câncer colorretal utilizando sensores de carga e massa

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha mãe, Janir, que sempre me apoiou em
cada projeto que eu me propus a fazer.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Marcelo Mulato, pela orientação, pela paciência, pela confiança em mim depositada, pela oportunidade de trabalhar no grupo Sensormat e principalmente pelos ensinamentos e conhecimentos adquiridos nesses anos.

A todos os meus colegas de laboratório, que tornaram essa caminhada mais leve e prazerosa. Em especial à Marina Ribeiro Batistuti e ao Bassam Bachour Junior por desprenderem comigo tanto tempo e paciência me ensinando o caminho das pedras, e que juntamente com os grandes amigos Hugo José Dias Mello, Guilherme de Oliveira Silva, Luiz Henrique dos Santos Nunes, Ricardo França Rocha e Fernando de Macedo Mano me ensinaram não somente teorias e experimentos, mas também a ser uma pessoa melhor.

Aos meus grandes amigos e colegas da USP Máira Siqueira Pinto, Felipe Vital Gimenes, Débora Cristina Kawasaki Codognato e Guilherme de Araújo Braz pela amizade, apoio, incentivo e ajuda.

À minha mãe Janir, aos meus tios Jaci e Jair, que me inspiraram na ciência, às minhas primas Caroline e Jacqueline, aos meus avós Antônio e Francisca que são a base de tudo e ao meu namorado Carlos que está comigo sempre. Sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

À CAPES, pelo apoio financeiro através de bolsa de estudos.

À FAPESP, pelo apoio através de materiais e equipamentos sem os quais esse estudo não seria possível.

À USP, pela infraestrutura fornecida.

Resumo

Dellevedove, S.L. **Detecção de alterações de miRNAs relacionados ao câncer colorretal utilizando sensores de carga e massa**, 2018 Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2018.

O câncer colorretal é uma das malignidades com maior incidência no Brasil e, na maioria dos casos, tem poucos sintomas visíveis até a doença estar em um estágio avançado. Pensando em simplificar o procedimento do exame e fazer um diagnóstico mais rápido para pacientes com câncer colorretal, este estudo teve como objetivo desenvolver um processo de diagnóstico simplificado baseado na caracterização de um biossensor eletroquímico em que fitas simples de miRNAs de interesse foram imobilizadas na superfície de eletrodos de ouro com objetivo de fazer a detecção de sua fita complementar utilizando-se dos métodos de espectroscopia de impedância eletroquímica e microbalança de cristal de quartzo. A sequência que foi imobilizada foi uma sequência de DNA que corresponde ao miRNA-224, cuja elevada expressão foi recentemente correlacionada com a agressividade e a incidência de metástase em pacientes com câncer colorretal. Os dados obtidos através da técnica de EIS foram comparados a dois modelos físicos de circuito equivalente, o circuito Randles clássico e um circuito Randles modificado, onde o capacitor foi substituído por um elemento de fase constante, tentando modelar de maneira mais eficiente a dupla camada que se forma na região de contato do eletrodo com a solução eletrolítica. O modelo modificado apresentou uma janela de funcionamento de 40,11% enquanto o circuito original apresentou uma janela de funcionamento de 23,98%; o que juntamente com o embasamento teórico do modelo de dupla camada fez com que o circuito modificado tenha sido escolhido para modelar os dados dos experimentos feitos na sequência. Tendo em vista que a imobilização das fitas simples de DNA na superfície do eletrodo de ouro é o passo chave para a obtenção de uma resposta satisfatória no biossensor, foram feitos testes alterando a proporção de DNA e espaçadores na fase de funcionalização a fim de determinar qual a proporção que otimiza a resposta do sensor. Comparando os resultados obtidos para as proporções de ssDNA:tiol total na etapa de funcionalização do eletrodo de 1:3, 1:4 e 1:5, a proporção 1:4 que corresponde a 20% de amostra no buffer de imobilização foi a que levou a uma maior variação percentual dos valores de R_{ct} devido às hibridizações. Considerando esses como sendo os parâmetros otimizados para o sistema, foi construída então uma curva de caracterização do sensor, e o limite de detecção encontrado foi de 10pM; um valor considerado alto comparado com outros experimentos

semelhantes, entretanto deve-se lembrar que o sistema aqui estudado não fez o uso de elementos amplificadores, como nanopartículas ou intercaladores de DNA. Para fins de comparação entre técnicas, foi conduzida uma análise semelhante utilizando uma microbalança de cristal de quartzo. Inicialmente foram utilizados os parâmetros encontrados como otimizados para a EIS, e posteriormente foram usados parâmetros mais próximos aos otimizados para essa técnica encontrados na literatura. Em ambos os casos foi possível observar variações referentes à hibridização das fitas complementares, entretanto como esperado, a resposta se mostrou mais expressiva para o segundo caso. Essas diferenças de resposta puderam ser relacionadas aos diferentes princípios de funcionamento dos sensores nas duas técnicas, mostrando que para a QCM o fator que influencia na resposta está relacionado à quantidade total de amostra imobilizada na superfície do eletrodo, enquanto que para a técnica de EIS o mais relevante é o quão compacta a camada se mostra.

Abstract

Dellevedove, S.L. **Detection of miRNAs changes related to colorectal cancer using charge and mass sensors**, 2018. Dissertation (Master program in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature of University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2017.

Colorectal cancer is one of the most prevalent malignancies in Brazil and, in most cases, has few visible symptoms until the disease is at an advanced stage. In order to simplify the examination procedure and to make a faster diagnosis for patients with colorectal cancer, this study aimed to develop a simplified diagnostic process based on the characterization of an electrochemical biosensor in which single strands of miRNAs of interest were immobilized on the surface of gold electrodes with the objective of detecting their complementary strand using the methods of electrochemical impedance spectroscopy and quartz crystal microbalance. The sequence that was immobilized was a DNA sequence corresponding to miRNA-224, whose high expression was recently correlated with the aggressiveness and incidence of metastasis in patients with colorectal cancer. The data obtained through the EIS technique were compared to two equivalent circuit models, the classic Randles circuit and a modified Randles circuit, where the capacitor was replaced by a constant phase element, trying to more efficiently model the double layer that is formed in the interface between the electrode and the electrolytic solution. The modified model presented an operating range of 40.11% while the original circuit presented an operating range of 23.98%; which along with the theoretical understanding of the double-layer model made the modified circuit to be chosen as the model to fit the data of the experiments realized in the sequence. Considering that the immobilization of the simple DNA strands on the surface of the gold electrode is the key step to obtain a satisfactory response in the biosensor, tests were performed by altering the ratio of DNA and spacers in the functionalization phase in order to determine which the ratio that optimizes the sensor response. Comparing the results obtained for the proportions of ssDNA:total thiol in the functionalization stage of the electrode of 1:3, 1:4 and 1:5, the ratio 1:4 corresponding to 20% of sample in the immobilization buffer was the one that led to a greater percentage variation of R_{ct} values due to hybridizations. Considering these as the optimized parameters for the system, a sensor characterization curve was built, and the limit of detection found was 10pM; a value considered high compared to other similar experiments, however it must be remembered that the system studied here did not make use of amplifying elements, such as nanoparticles or DNA intercalators. For purposes of comparing techniques, a similar analysis was conducted using a quartz crystal microbalance. Initially,

the parameters found as optimized for the SIS were used, and later parameters that were closer to those optimized for this technique found in the literature were. In both cases it was possible to observe variations related to the hybridization of the complementary tapes, however, as expected, the response was more expressive for the second case. These differences in optimization parameters for the two techniques could be related to the different principles of sensor operation, showing that for the QCM the factor that influences the response is related to the total amount of sample immobilized on the surface of the electrode, while for the EIS technique the most relevant parameter is how compact the layer is.

I. Lista de figuras

Figura 2.1: Funcionamento de um biossensor eletroquímico baseado em DNA. Em (a) um esquema de todos os elementos e processos. Em (b) o circuito equivalente do sistema. Adaptado de [12].....6

Figura 2.2: Ilustração da dupla camada entendida como (a) um capacitor de eletrodos planos e paralelos, (b) uma camada difusa e (c) junção de uma região próxima que se assemelha a um capacitor e a camada mais distante difusa, de acordo com o modelo de Gouy-Chapman-Stern. Adaptado de [12]7

Figura 2.3: Esquema ilustrativo dos eletrodos de referência, de trabalho e contra-eletródo de uma célula eletroquímica, mostrando seu correto posicionamento bem como o circuito equivalente ao qual essa pode ser comparada.8

Figura 2.4: Ilustração dos fenômenos que dão origem à corrente entre a solução eletrolítica e a superfície do eletrodo de ouro: taxa de transferência de massa da solução para a superfície do eletrodo, transferência de elétrons na superfície do eletrodo e outras reações químicas que seguem a transferência eletrônica. Adaptado de [19] ..8

Figura 2.5: Ilustração do processo de voltametria cíclica mostrando em (a) a forma do potencial aplicado e em (b) a resposta em corrente...9

Figura 2.6: Exemplo do diagrama de Nyquist obtido para um circuito RC em série. 12

Figura 2.7: Exemplo do diagrama de Nyquist obtido para um circuito RC em paralelo..... 13

Figura 2.8: Diagrama esquemático mostrando os componentes do circuito Randles. No circuito R_s representa a resistência da solução eletrolítica, C_{dl} representa a capacitância da dupla camada, R_{ct} representa a resistência de transferência de carga que acontece durante o processo no eletrodo e W representa o elemento de Warburg, relacionado especificamente com a difusão no sistema. 14

Figura 2.9: Exemplo do diagrama de Nyquist obtido para o circuito Randles. 14

Figura 2.10: Ilustração de um sistema baseado em um cristal ressonante de quartzo (a) e seu respectivo modelo de circuito elétrico equivalente (b). Adaptado de [12]..... 15

Figura 3.1: Esquema ilustrando o sensor baseado na hibridização do DNA passo a passo. (a) imobilização de ssDNA na superfície do eletrodo de ouro, (b) preenchimento com MCH para construir uma monocamada auto organizada (SAM) e (c) SAM hibridizada. Adaptado de [12] 17

Figura 3.2: Dessorção de eletrodo em uma solução de 0,5M de NaOH, sob uma variação cíclica do potencial entre 2,0 e -0,8 V (contra um eletrodo Hg / Hg₂SO₄)...... 19

Figura 3.3: Voltametria cíclica do procedimento de limpeza eletroquímica de -0,5 a 1,1 mV vs. eletrodo de Hg / Hg₂SO₄ em uma solução 0,5M de H₂SO₄. Destacada em azul a região correspondente à área capacitiva. 20

Figura 3.4: Ilustração da estrutura molecular de DTT..... 22

Figura 4.1: Célula eletroquímica utilizada no projeto. Ao lado esquerdo é possível ver o eletrodo de referência (azul), ao centro se encontra o eletrodo de trabalho (vermelho) e à direita o contra-eletrodo (preto), no qual a corrente é medida. 23

Figura 4.2: Diagrama de Nyquist contendo os resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica para diferentes situações: para o eletrodo modificado apenas com a amostra de fita simples de DNA, e para o eletrodo após a hibridização de diferentes concentrações de fita complementar. 24

Figura 4.3: Variação percentual de R_{ct} para diferentes concentrações de fitas complementares utilizadas para hibridização em relação ao valor de R_{ct} encontrado para o eletrodo modificado apenas com a fita simples de DNA analisados de acordo com dois modelos diferentes, o circuito Randles e um circuito Randles modificado. 25

Figura 4.4: (a) Curvas das variações percentuais médias nos valores de R_{ct} dos eletrodos após a hibridização com diferentes concentrações de tDNA em comparação com o eletrodo contendo apenas a amostra de fita simples de DNA para as proporções de DNA:tiol total na funcionalização de 1:3, 1:4 e 1:5; em destaque em (b) as variações percentuais médias nos valores de R_{ct} dos eletrodos apenas para a concentração de ssDNA 1μM. 26

Figura 4.5: Variações dos valores absolutos e variações percentuais para o elemento de fase constante conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA. 27

Figura 4.6: Variações dos valores absolutos e variações percentuais para o resistor de entrada conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA. 28

Figura 4.7: Variações dos valores absolutos e variações percentuais para o elemento de Warbrug conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA. 29

Figura 4.8: Variações dos valores absolutos e variações percentuais de Rct conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA. 29

Figura 4.9: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4. 30

Figura 4.10: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para as proporções de DNA: tiol total de 1:3, 1:4 e 1:5. 31

Figura 4.11: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4. 32

Figura 4.12: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração das duas curvas encontradas para os experimentos realizados. Ambas as curvas foram obtidas para os parâmetros otimizados previamente. 33

Figura 4.13: Comparação das faixas dinâmicas de diferentes estudos, utilizando como substrato eletrodos de ouro semelhantes aos utilizados nesse estudo, bem como metodologias semelhantes. 36

Figura 4.14: Comparação dos limites de detecção de diferentes estudos, utilizando como substrato eletrodos de ouro semelhantes aos utilizados nesse estudo, bem como metodologias semelhantes..... 37

Figura 4.15: Curva em tempo real da resposta em frequência para o terceiro harmônico conforme injeção de soluções com diferentes concentrações de fitas complementares de DNA no decorrer do tempo em uma situação de fluxo contínuo..... 38

Figura 4.16: Variação da frequência em função da concentração de fitas complementares para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:4 e 1:50. 40

Figura 4.17: Variação da massa em função da concentração de fitas complementares para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:4 e 1:50. 40

Figura 4.18: Variação da quantidade total de fitas de DNA hibridizadas em função da concentração de fitas complementares para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:4 e 1:50..... 41

Figura 7.1: Variações dos valores absolutos para R_{ct} e para o elemento de Warburg conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:3. 48

Figura 7.2: Variações dos valores absolutos para o elemento de fase constante e para o resistor de entrada conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:3. 48

Figura 7.3: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:3..... 48

Figura 7.4: Variações dos valores absolutos para R_{ct} e para o elemento de Warburg conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:5. 49

Figura 7.5: Variações dos valores absolutos para o elemento de fase constante e para o resistor de entrada conforme adição de diferentes

concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:5. 49

Figura 7.6: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:5. 49

II. Lista de tabelas

Tabela 3.1: Sequências de DNA correspondentes ao miRNA-224 utilizadas neste estudo: a amostra modificada com tiol e sua sequência complementar completa. 21

Tabela 4.1: Comparação das sequências imobilizadas como base do biossensor, da faixa dinâmica obtida e do limite de detecção obtidos para diferentes trabalhos utilizando mitologias semelhantes à utilizada neste trabalho..... 35

Tabela 4.2: Quantidade de DNA hibridizado. A partir dos gráficos obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4 foram extraídos Δf , Δm e foi calculada a quantidade aproximada de fitas DNA hibridizadas. 39

Tabela 4.3: Quantidade de DNA hibridizado. A partir dos gráficos obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:50 foram extraídos Δf , Δm e foi calculada a quantidade aproximada de fitas DNA hibridizadas. 39

III. Lista de Abreviaturas

CRC: Câncer Colorretal.

AC: Corrente Alternada.

CV: Voltametria Cíclica.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

dsDNA: Fita complementar de DNA.

DTT: Dithiothreitol.

EDTA: Ácido Ethylenediaminetetraacetico.

EIS: Espectroscopia de Impedância Eletroquímica.

LOD: Limite de detecção.

MCH: 6-mercaptop-1-hexanol.

miRNA: MicroRNA.

QCM: Micro balança de cristal de Quartzo.

RC: Resistor Capacitor.

RNA: Ácido Ribonucleico.

SAM: Monocamada auto-organizada.

ssDNA: Fita simples de DNA.

tDNA: DNA alvo.

TE: Tris com EDTA.

SUMÁRIO

I. Lista de figuras	xi
II. Lista de tabelas	xvi
III. Lista de Abreviaturas	xvii
1 Introdução	1
1.1 Objetivo do Estudo	2
2 Princípios Teóricos	4
2.1 Conceito de miRNA	4
2.2 Princípios de Eletroquímica	5
2.3 Visão eletroquímica geral do sistema	5
2.3.1 Dupla camada elétrica na superfície do eletrodo	6
2.3.2 Célula Eletroquímica	7
2.3.3 Técnicas de caracterização eletroquímicas	9
2.4 Princípios da Piezoelectricidade	14
2.4.1 Microbalança de Cristal de Quartzo	14
3 Materiais e Métodos	17
3.1 Preparando o Eletrodo	18
3.1.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica	18
3.1.2 Microbalança de Cristal de Quartzo	21
3.2 Preparação da Amostra	21
3.3 Imobilização da amostra de DNA	22
4 Resultados e Discussão	23
4.1 Detecção da hibridização usando EIS	23
4.2 Otimização do modelo de circuito equivalente a ser utilizado	24
4.3 Otimização da proporção entre ssDNA e espaçador	26
4.4 Entendendo a variação vista nos diagramas de Nyquist	27
4.5 Detecção da Hibridização utilizando a QCM	37
5 Conclusões	42
6 Referências Bibliográficas	44
7 Anexo I	48
8 Anexo II	50

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CRC) é a quarta neoplasia maligna mais incidente no Brasil [1]. O tempo médio entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico varia entre aproximadamente 2 a 10 meses. Normalmente, os indivíduos mais jovens são considerados portadores de doenças com pouca relevância clínica, aumentando o período entre o início dos sintomas e o diagnóstico correto da doença [2]. Além disso, o diagnóstico clínico inicial de CRC como benigno em pacientes jovens é comum, especialmente abaixo dos 30 anos de idade, uma vez que a presença de tecido neoplásico é considerada uma condição clínica importante apenas em pacientes idosos [3]. No entanto, um estudo feito com 186 pacientes com idade inferior a 40 anos com adenocarcinoma colorretal primário mostrou que estes apresentaram indicadores de maior agressividade em maior proporção quando comparados aos pacientes com mais de 40 anos de idade, o que poderia explicar a alta taxa de diagnóstico tardio em pacientes mais jovens [4].

O CRC geralmente apresenta sintomas iniciais pouco perceptivos, mas tem a peculiaridade de exibir lesões precursoras conhecidas como pólipos adenomatosos. O tempo estimado para o aparecimento do adenoma, seu crescimento e transformação em um tumor é de mais de 10 anos, um período suficientemente longo para permitir sua identificação, ressecção e, portanto, prevenção do câncer [5].

As metástases observadas no fígado, na cavidade abdominal e nas áreas extra-abdominais são comuns, assim como uma recorrência da doença após a ressecção cirúrgica do tumor primário, sendo o fígado o principal local atingido por metástases extraganglionares de CRC, pois este é o primeiro órgão grande afetado pela cadeia venosa da região colorretal. As metástases neste órgão são a principal causa de morte nos pacientes em questão: 20% dos pacientes apresentam lesões metastáticas no fígado quando o tumor primário é identificado e outros 25% podem desenvolver lesões metastáticas nos anos após a ressecção do tumor intestinal. Em contraste, a maioria das metástases extra-hepáticas estão localizadas no pulmão [5].

Atualmente, as metástases relacionadas ao CRC são diagnosticadas através do exame de PET-CT; uma técnica que utiliza rastreadores radioativos e o princípio da detecção coincidente para medir os processos bioquímicos que ocorrem nos tecidos [5]. Entre os traçadores existentes, a 2- [F18] -fluoro-2-desoxi glicose, chamado de FDG, é o mais utilizado no Brasil, sendo Fluor-18 o elemento radioativo e a glicose o açúcar conhecido como uma das principais fontes de energia celular [6]. Durante o exame, uma pequena quantidade dessa solução contendo açúcar radioativo é injetada no paciente e, após um

período de captura, as imagens são obtidas. O dispositivo PET captura os sinais de radiação emitidos pelo Fluor-18. Usando os diferentes tempos de aquisição para cada sinal proveniente do corpo e sua localização de origem para a formação de imagens, são determinados os locais onde há maior presença deste açúcar, demonstrando desta forma o metabolismo da glicose [5,6].

Assim, ao contrário de outras tecnologias de imagem voltadas predominantemente para definições anatômicas de doenças, como raios-X, tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (MRI), o PET avalia a perfusão e a atividade metabólica dos tecidos. As alterações na fisiologia do tumor precedem as alterações anatômicas. Como o PET fornece imagens da função e estrutura bioquímica do corpo, esta tecnologia é capaz de demonstrar mudanças bioquímicas, mesmo quando não há anormalidades estruturais óbvias, permitindo o diagnóstico precoce de locais tumorais [4].

Embora seja um método eficiente, o PET apresenta algumas desvantagens. Além de ser uma técnica que expõe o paciente a um processo radioativo, também há problemas relacionados à produção e distribuição do radiofármaco a ser utilizado no exame: a curta meia-vida da F18-FDG (meia-vida de duas horas) torna difícil a sua utilização, uma vez que sua produção é limitada e centralizada por agências federais localizadas apenas em São Paulo e Rio de Janeiro e, mais recentemente, em Pernambuco [5].

Há também uma série de obstáculos para a implementação do serviço de exames, entre eles a impossibilidade de transportar o fármaco em condições de uso para centros de distribuição longe do local de sua produção, a necessidade de um espaço físico apropriado com rígido controle de condições de temperatura e proteção radiológica para realização dos exames, armazenamento do fármaco, descarte de apropriado de resíduos radioativos gerados, preocupação com a radioproteção do paciente e da equipe médica envolvida, além do treinamento correto destes últimos. Outros aspectos relevantes estão relacionados a questões financeiras, como a preocupação com o retorno comercial das instalações onde se realizarão os exames, levando em consideração os recursos de manutenção do aparelho e o custo dos materiais de consumo necessários, bem como o alto valor do equipamento [5]. Todos esses fatores aumentam o custo do exame (de R \$ 3.500 para R \$ 4.000) ao paciente, que não é coberto pela maioria das empresas de cuidados de saúde complementares, e é difícil de acessar através do Sistema Único de Saúde (SUS) [6].

1.1 OBJETIVO DO ESTUDO

Visando alternativas mais econômicas, confiáveis e rápidas para ampliar o alcance do diagnóstico precoce de metástases de CRC, a proposta desse estudo foi desenvolver e caracterizar um biossensor para detectar fatores relacionados a este câncer usando a imobilização

de fitas simples de DNA (ssDNA) na superfície de eletrodos de ouro, o processo de hibridização com sua fita complementar e a posterior caracterização e detecção através do EIS e da utilização de uma microbalança de quartzo.

A importância funcional dos miRNAs na fisiologia de diversas doenças tem sido amplamente estudada. Os miRNAs são diferencialmente expressos em tecidos normais e tumorais, e padrões únicos de expressão de miRNAs foram caracterizados em muitos tipos de câncer, incluindo CRC.

Na literatura, verificou-se que o miRNA-224 é super-expresso em pacientes que possuem tumores metastáticos, desencadeando o desprendimento de células tumorais e consequentemente aumentando a mobilidade celular, que é o princípio por trás da formação de metástases [7].

A estrutura bioquímica do biossensor foi baseada em oligonucleotídeos de DNA sintéticos imobilizados através da ligação de grupos tiol na superfície de eletrodos de ouro, tendo em conta que a fita simples de DNA tem carga intrínseca negativa devido aos seus grupos fosfato. A hibridação da sequência complementar aumenta a carga negativa na superfície do eletrodo e a detecção desta amostra livre de marcadores pode ser feita através da técnica de EIS utilizando-se um marcador redox em solução, consistindo na aplicação de uma gama de potenciais em um eletrodo de trabalho, que é imerso em uma solução eletrolítica e medindo a corrente resultante. Todas as respostas de técnicas eletroquímicas foram modeladas por um circuito equivalente otimizado.

O funcionamento da estrutura bioquímica do sensor foi testado também tendo como princípio de funcionamento o efeito piezoelétrico, onde a estratégia de imobilização foi reproduzida na superfície de um cristal de quartzo recoberto com ouro. A hibridação aumenta a quantidade de massa depositada sobre o cristal, o que acarreta em uma variação na frequência de ressonância do cristal.

2 PRINCÍPIOS TEÓRICOS

Aqui encontram-se brevemente descritos os fundamentos teóricos relevantes ao entendimento e aplicação em biossensores bem como das técnicas de caracterização que foram empregadas nesse estudo.

2.1 CONCEITO DE MIRNA

Os estudos de miRNA surgiram recentemente mostrando a utilização destes como uma nova classe com potencial para ser aplicada na análise de biomarcadores com na próxima geração de técnicas terapêuticas contra o câncer [8].

Eles são definidos como uma classe de codificação não proteica e são RNAs de poucas bases nitrogenadas (12 - 25), tendo papéis reguladores importantes em diferentes tipos de expressão gênica e processos celulares [9]. Alguns estudos mostram que microrganismos específicos regulam a proliferação celular e os processos de apoptose, que são modificações importantes durante o desenvolvimento de tumores cancerígenos [10].

Esses RNAs não codificantes podem ser divididos em RNA ribossômico (RNAr), RNAs de transferência (RNAt), RNAs nucleares (snRNAs) e RNAs nucleolares (snoRNAs). Adicionalmente podem ser subdivididos em RNAs não codificáveis curtos e longos (mais de 200 bases). Os RNA não codificantes longos são particularmente adequados à regulação epigenética uma vez que se ligam a sequências alvo complementares no genoma. Após a ligação aos seus alvos do genoma, eles ajudam a transcrever proteínas que modificam a cromatina [11]. Os RNAs menores, que não codificam (incluindo os miRNAs), funcionam ligando-se ao miRNA alvo, onde eles podem reprimir o processo de tradução ou causar a degradação do alvo, tendo como consequência uma redução na quantidade de proteína produzida por um RNA.

MiRNAs podem ser detectados em fluídos corporais como no sangue e na urina [11], fornecendo a possibilidade de desenvolver novas tecnologias de biossensores baseados na detecção de oligonucleotídeos que são miRNAs complementares associados a doenças e biomarcadores úteis, dentre outros fins, para o câncer.

Para este trabalho, o miRNA-224 foi escolhido como sequência a ser imobilizada como amostra para o desenvolvimento do biossensor. A sequência foi estudada juntamente com sua cadeia complementar completa (alvo de estudo). A super-expressão desse miRNA foi recentemente relacionada à alta agressividade e incidência de metástases em pacientes que possuem câncer colorretal [7].

2.2 PRINCÍPIOS DE ELETROQUÍMICA

2.3 VISÃO ELETROQUÍMICA GERAL DO SISTEMA

Um biossensor baseado em DNA possui uma configuração característica onde amostras de fitas simples de DNA (ssDNA) são imobilizadas na superfície de eletrodos, a fim de funcionalizar o mesmo. A estrutura uniforme do DNA faz com que o seu arranjo na superfície do eletrodo se dê de forma bem definida. Eletrodos de ouro possuem uma afinidade de ligação com amostras que contenham tiolatos, de forma que esses se tornam facilmente funcionalizados, formando uma camada auto-organizada da amostra de DNA [12]. Para prevenir ligações não específicas são utilizadas pequenas moléculas, chamadas de espaçadores, que são co-imobilizados com as ssDNA. Nesse tipo de arranjo, a dinâmica de captura das estruturas alvo, para esse estudo, as fitas complementares de DNA, possui uma importância crítica, tornando-se então crucial a afinidade da superfície funcionalizada do eletrodo com a fita alvo a ser hibridizada, sendo esse o processo chave para o funcionamento do dispositivo [13].

Quando esse sistema completo é imerso em uma solução eletrolítica, há o surgimento de uma região específica de interface, chamada de dupla camada. A estrutura dessa interface tem a propriedade de modificar os processos que ocorrem entre o eletrodo e a solução na qual ele se encontra, ou seja, as propriedades dessa dupla camada podem afetar as medidas eletroquímicas do sistema como um todo [14].

O sistema eletroquímico é composto de um eletrodo de trabalho funcionalizado com a SAM, um eletrodo de referência e um contra-eletrodo, imersos em uma célula eletroquímica com a solução eletrolítica. O potencial do eletrodo de trabalho é aplicado em relação a um eletrodo de referência, que pode ser de diferentes materiais, tais como calomel saturado, hidrogênio ou prata/cloreto de prata. O potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência pode ser considerado um sinal de excitação e a corrente resultante é então tomada como um sinal de resposta [9]. A Figura 2.1 ilustra um sensor eletroquímico (a) com três eletrodos imersos em uma solução eletrolítica, correlacionados com seu circuito equivalente (b).

No circuito elétrico utilizado para modelar o sistema, a dupla camada pode ser comparada a um capacitor (Cdl) em paralelo com uma resistência (Rf). Um sistema livre de marcadores usa um par redox em solução para trocar elétrons com o eletrodo de trabalho, gerando assim um processo que pode ser dividido em transferência eletrônica e transferência de massa [12]. Os princípios desses dois processos e seus métodos de caracterização são introduzidos a seguir para a compreensão do funcionamento do biossensor baseado em DNA.

Figura 2.1: Funcionamento de um biossensor eletroquímico baseado em DNA. Em (a) um esquema de todos os elementos e processos. Em (b) o circuito equivalente do sistema. Adaptado de [12]

2.3.1 Dupla camada elétrica na superfície do eletrodo

O conceito de dupla camada elétrica em células eletroquímicas foi originalmente introduzido por Helmholtz, em 1879, que sugeriu que uma superfície carregada em contato com uma solução eletrolítica repele os íons de mesma carga e atrai os íons de carga oposta [15]. Essa monocamada de cargas na superfície do eletrodo e a camada de íons de cargas opostas que se forma próxima à superfície do eletrodo, devido à presença de íons na solução eletrolítica da célula eletroquímica formam o que é conhecido como uma dupla camada elétrica (ilustrada na Figura 2.2(a)) e foi então entendida como sendo análoga a capacitores com dois eletrodos planos separados por uma pequena distância, correspondente aproximadamente ao raio de um íon.

Posteriormente, em 1910, Gouy e Chapman propuseram que essa dupla camada não está organizada de forma tão compacta como Helmholtz havia sugerido, implementando assim o conceito de uma camada difusa, na qual a quantidade dos íons acumulados segue uma distribuição de Boltzmann, caindo exponencialmente como uma função da distância em relação à superfície do eletrodo [16]. Esse modelo descreve os íons como sendo móveis na solução, estando sujeitos aos efeitos de difusão, devido aos gradientes de concentração existentes, e a migração, devido ao gradiente de potencial elétrico ou campo elétrico. O novo entendimento resultante dessa mudança de paradigma pode ser visto na Figura 2.2(b).

Atualmente o modelo que é aceito como uma melhor aproximação da dupla camada elétrica é o modelo proposto por Stern, que assume tanto a existência de uma região compacta e rígida como

a proposta por Helmholtz na zona próxima à superfície do eletrodo como uma camada subsequente à essa, mais difusa, como proposta por Gouy e Chapman, considerando que os íons possuem um tamanho finito [15]. Um esquema desse modelo é mostrado na Figura 2.2(c).

Figura 2.2: Ilustração da dupla camada entendida como (a) um capacitor de eletrodos planos e paralelos, (b) uma camada difusa e (c) junção de uma região próxima que se assemelha a um capacitor e a camada mais distante difusa, de acordo com o modelo de Gouy-Chapman-Stern. Adaptado de [12]

2.3.2 Célula Eletroquímica

Uma célula eletroquímica é um arranjo normalmente composto por dois ou três eletrodos, todos imersos em uma solução eletrolítica, de forma a facilitar reações químicas de oxirredução através da introdução de energia elétrica no sistema. No estudo em questão foi utilizado um arranjo experimental contendo três eletrodos: um eletrodo de trabalho, onde ocorre a funcionalização para a detecção da reação de interesse, um eletrodo de referência, que possui um potencial conhecido e uma vasta faixa de não-polarização, e um contra-eletrodo (ou eletrodo auxiliar).

Um potenciostato ligado aos três eletrodos aplica uma voltagem no eletrodo de referência tendo como base de comparação o contra eletrodo, que possui uma alta impedância de entrada, o que leva a um potencial aproximadamente constante e de igual valor ao potencial de circuito aberto. Ao mesmo tempo, o aparelho mede a corrente que flui entre o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo.

Figura 2.3: Esquema ilustrativo dos eletrodos de referência, de trabalho e contra-eletródo de uma célula eletroquímica, mostrando seu correto posicionamento bem como o circuito equivalente ao qual essa pode ser comparada.

Uma célula eletroquímica pode ser aproximada e comparada com um circuito RC equivalente, onde a capacitância da dupla camada no eletródo de trabalho é representada por C_w e a resistência da solução eletrolítica é representada por R_s . Como o comportamento do potencial exibe uma queda que depende da distância entre os eletrodos, há um correto posicionamento que deve ser seguido entre os eletrodos, mostrado na Figura 2.3(a), a fim de minimizar esse efeito [16]. A reação na superfície do eletródo de trabalho é composta por uma série de passos que causam as conversões de espécies oxidadas e reduzidas na solução eletrolítica, ilustradas na Figura 2.4. A corrente que se forma é governada pela taxa de transferência de massa da solução para a superfície do eletródo, transferência de elétrons na superfície do eletródo e outras reações químicas que seguem a transferência eletrônica.

Figura 2.4: Ilustração dos fenômenos que dão origem à corrente entre a solução eletrolítica e a superfície do eletródo de ouro: taxa de transferência de massa da solução para a superfície do eletródo, transferência de elétrons na superfície do eletródo e outras reações químicas que seguem a transferência eletrônica. Adaptado de [19]

2.3.3 Técnicas de caracterização eletroquímicas

As técnicas de caracterização eletroquímicas podem ser divididas em potenciométricas, onde o potencial entre um eletrodo de interesse e um eletrodo de referência é analisado, ou amperométricas, onde a corrente que flui entre dois eletrodos é analisada. Nessa dissertação foram usadas diferentes técnicas de caracterização eletroquímicas, comentadas em mais detalhes a seguir.

2.3.3.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma das mais complexas técnicas eletroquímicas e é muito utilizada pelo fato de ser um método rápido e poderoso para a caracterização eletroquímica do comportamento de analitos que podem ser oxidados ou reduzidos eletroquimicamente [16]. É uma técnica de medição que varre o potencial variando linearmente entre um potencial inicial E_i e seu potencial reverso E_f . [17]

Quando a varredura se inicia em um potencial negativo, apenas há o fluxo de íons devido às correntes não faradaicas resultantes da carga e descarga proveniente da capacitância da dupla camada. Quando o potencial começa a aumentar, chegando perto do valor do potencial de oxidação (E_{pa}), há o aparecimento de uma corrente faradaica. Conforme o potencial continua crescendo para um valor cada vez mais positivo, a concentração de partículas na superfície decai. Conforme o potencial ultrapassa o valor de E_{pa} , a taxa de transferência de massa do analito para a superfície alcança seu valor máximo, e em seguida decresce.

Quando o potencial começa a diminuir, indo agora em direção a um valor negativo, conforme o potencial alcança e ultrapassa o valor E_0 , a superfície se torna mais favorável a ligações com espécies neutras. Conforme o potencial chega mais perto do valor de E_{pc} , as espécies começam a ser reduzidas [9].

Figura 2.5: Ilustração do processo de voltametria cíclica mostrando em (a) a forma do potencial aplicado e em (b) a resposta em corrente.

Através do gráfico da resposta de corrente em função do potencial aplicado é possível extrair informações tais como os valores de E_{pc} , E_{pa} e a corrente relativa a esses picos, I_{pc} e I_{pa} , respectivamente.

No processo de transferência de cargas o eletrodo pode funcionar tanto quanto um doador (no caso de uma redução) quanto um receptor (no caso de uma oxidação) de elétrons transferidos com as espécies na solução. O estado de equilíbrio de uma solução química é caracterizado pela equação de Nernst:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{D_R}{D_O} \quad 2.1$$

Onde E é a diferença de potencial aplicada, E_0 é o potencial do eletrodo de referência, R é a constante dos gases, T é a temperatura, n é o número de elétrons transferidos por molécula difundida no eletrodo, F é a constante de Faraday, D_R e D_O representam os coeficientes de difusão para as formas reduzida e oxidada das espécies, respectivamente.

A equação de Nernst mostra como a concentração de uma dada espécie química na superfície e o potencial do eletrodo se relacionam, não levando em conta a corrente.

Dessa maneira, a voltametria cíclica pode ser utilizada para o estudo e entendimento da reversibilidade química, que acontece quando uma mesma reação química pode ocorrer nos dois sentidos.

2.3.3.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica

A impedância, quando considerados parâmetros elétricos, pode ser entendida como a relação complexa entre a voltagem e a corrente em um circuito sob a influência de uma corrente alternada (AC), como um conceito ampliado de resistência que considera um termo de magnitude e um termo de fase, em contrapartida à resistência, que considera apenas a magnitude. A espectroscopia de impedância eletroquímica é uma técnica onde a impedância na superfície de um eletrodo é medida em função da frequência da fonte de corrente (AC).

Uma corrente ou voltagem alternada varia com o tempo de uma maneira periódica, possuindo uma frequência (f) que pode ser entendida como o número de ciclos de corrente completos por segundo.

Inicialmente é aplicado no sistema o potencial de circuito aberto (OCP), no qual não há corrente fluindo. O potencial E pode ser então descrito como puramente senoidal, e pode ser escrito da seguinte forma:

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t + \theta) \quad 2.2$$

Onde E_0 representa a amplitude do pico, ω representa a frequência angular (em rad/s) e θ a fase angular (rad). Analogamente a equação para a corrente, que também possui forma senoidal é:

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + \phi) \quad 2.3$$

Sendo que nesse caso I_0 representa a amplitude da onda de corrente senoidal e ϕ representa o ângulo de fase.

Levando em consideração um resistor sob influência de uma corrente AC, sua resistência pode ser escrita baseada na lei de Ohm como:

$$R = \frac{E(t)}{I(t)} \quad 2.4$$

Uma vez que não existe diferença entre os ângulos ϕ e θ ($\phi = \theta$).

Considerando agora um capacitor puro sob influência de uma corrente AC, quando essa corrente passa através do capacitor, isso leva a um decaimento de voltagem no capacitor com uma defasagem de 90° . Quando considerado um circuito RC, as equações para tensão e corrente podem ser escritas da seguinte forma:

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t) \quad 2.5$$

$$I(t) = I_0 \sin(\omega t + 90^\circ) \quad 2.6$$

Relações essas que podem ser também escritas na forma complexa, eliminando a dependência com o tempo, sendo então entendido como fasores, onde o número complexo representa uma função senoidal:

$$E = E_0 e^{i 0^\circ} \quad 2.7$$

$$I = I_0 e^{i 90^\circ} \quad 2.8$$

Diferentemente da resistência, o conceito de impedância se estende como sendo uma variável complexa, que pode ser entendida como uma soma de uma parte real Z_{re} (ou Z') e uma parte imaginária Z_{im} (ou Z''). A relação entre a voltagem, a corrente e a impedância pode ser escrita de forma análoga à usada para uma resistência, de acordo com a lei de Ohm:

$$Z = \frac{E(t)}{I(t)} \quad 2.9$$

A impedância de um resistor submetido a uma corrente AC no plano complexo pode ser escrita como:

$$Z_R = \frac{E_0 \sin(\omega t + \theta)}{I_0 \sin(\omega t + \phi)} = R \quad 2.10$$

A impedância de um capacitor submetido a uma corrente AC no plano complexo pode ser escrita como:

$$Z_C = \frac{E_0 \sin \omega t}{I_0 \sin(\omega t + 90^\circ)} = \frac{E_0 e^{i 0^\circ}}{I_0 e^{i 90^\circ}} = \frac{E_0 e^{i 0^\circ}}{\omega C V_0 e^{i 90^\circ}} = \frac{e^{i(-90^\circ)}}{\omega C} \quad 2.11$$

Simplificando com a relação de Euler:

$$e^{i(-90^\circ)} = \cos(-90^\circ) + i \sin(-90^\circ) \quad 2.12$$

$$Z_C = \frac{1}{i\omega C} \quad 2.13$$

Esses dois elementos podem ser combinados de duas maneiras distintas: em série e em paralelo. Em um circuito RC em série, a impedância equivalente pode ser expressa como uma soma das impedâncias individuais:

$$Z_{RC} = R + \frac{1}{i\omega C} \quad 2.14$$

A Figura 2.6 mostra uma representação gráfica da impedância complexa no diagrama de Nyquist como uma linha vertical para o circuito RC em série, de acordo com a equação 2.14.

Figura 2.6: Exemplo do diagrama de Nyquist obtido para um circuito RC em série.

Já para um circuito RC em paralelo, a impedância equivalente pode ser escrita como:

$$\frac{1}{Z_{RC}} = \frac{1}{Z_R} + \frac{1}{Z_C} = \frac{1}{R} + \frac{i\omega C}{1} \quad 2.15$$

Reescrevendo essa relação e separando a parte real da parte complexa:

$$Z_{RC} = \frac{R}{1 + (\omega RC)^2} - i \frac{\omega R^2 C}{1 + (\omega RC)^2} \quad 2.16$$

O primeiro termo da equação é real (Z_{re}) e o segundo termo é imaginário (Z_{im}). Para baixas frequências $\omega RC \ll 1$, então $Z_{re} \approx R$ e $Z_{im} \approx 0$. Nesse caso, a parte RC do circuito se comporta como um resistor. Em contrapartida, para altas frequências, $\omega RC \gg 1$, então $Z_{re} \approx 0$ e $Z_{im} \approx 1/\omega C$, e então a parte RC do circuito se comporta como um capacitor.

A equação 2.16 pode ser escrita de maneira simplificada como:

$$(Z_{re} - \frac{R}{2})^2 + Z_{im}^2 = (\frac{R}{2})^2 \quad 2.17$$

A equação 2.17 representa uma curva na forma de semicírculo de raio $R/2$, centrado em $(R/2, 0)$ no plano complexo, como mostrado na Figura 2.7:

Figura 2.7: Exemplo do diagrama de Nyquist obtido para um circuito RC em paralelo.

A EIS é um método frequentemente utilizado para avaliar parâmetros relacionados à transferência de carga e para estudos da estrutura de dupla camada [12]. O circuito equivalente para a dupla camada deve representar o sistema eletroquímico da melhor maneira possível, considerando a resistência do eletrólito, a capacitância da dupla camada, e a impedância dos processos faradaicos e não faradaicos.

Um circuito muito comumente utilizado para modelar uma interface eletroquímica é o circuito Randles, mostrado na Figura 2.8:. Esse circuito é composto de um resistor que representa a resistência da solução, ou resistência eletrolítica (R_s), um capacitor que representa a capacitância da dupla camada (C_{dl}), um resistor que representa a resistência de transferência de carga que acontece durante o processo no eletrodo (R_{ct}) e um elemento eletroquímico relacionado especificamente com a difusão, chamado de elemento de Warburg (W).

Figura 2.8: Diagrama esquemático mostrando os componentes do circuito Randles. No circuito R_s representa a resistência da solução eletrolítica, C_{dl} representa a capacitância da dupla camada, R_{ct} representa a resistência de transferência de carga que acontece durante o processo no eletrodo e W representa o elemento de Warbrug, relacionado especificamente com a difusão no sistema.

Como já discutido previamente, para as altas frequências há uma maior correlação com o comportamento de R_s , enquanto para baixas frequências o comportamento predominante corresponde à soma do R_{ct} e R_s , onde o diâmetro do semicírculo corresponde ao valor de R_{ct} . A impedância do elemento de Warbrug está relacionada à difusão entre o eletrodo e a solução eletrolítica durante a transferência de carga, e no diagrama de Nyquist se mostra como uma linha com um ângulo de aproximadamente 45° , que pode ser vista na Figura 2.9.

Figura 2.9: Exemplo do diagrama de Nyquist obtido para o circuito Randles.

2.4 PRINCÍPIOS DA PIEZOELETRICIDADE

O efeito piezoelétrico é uma propriedade presente em certos materiais onde esses são capazes de gerar uma diferença de potencial quando são submetidos a algum tipo de estresse mecânico. A reversibilidade, onde os materiais sofrem o chamado efeito piezoelétrico inverso (onde há uma deformação do material em decorrência da aplicação de uma diferença de potencial entre dois pontos do mesmo) também ocorre.

2.4.1 Microbalança de Cristal de Quartzo

A microbalança de cristal de quartzo (QCM) é um sistema extremamente sensível utilizado para medição de massas, consistindo de um disco de quartzo com eletrodos de metal depositados em ambos

Em 1959, Sauerbery em um trabalho pioneiro reconheceu o potencial de uso para a QCM demonstrando em vácuo que [19]:

Onde C_q é uma constante relacionada com a espessura e as propriedades intrínsecas do cristal de quartzo e n é o número do harmônico medido.

Um esquema mostrando os componentes de sistema contendo um cristal ressonante de quartzo e o modelo de circuito elétrico equivalente, conhecido como Butterworth van Dyke (BVD), são mostrados na Figura 2.10. Esse modelo é normalmente utilizado para representar o comportamento de um cristal ressonante quando esse se encontra com uma frequência próxima à frequência de um de seus harmônicos de vibração natural.

O modelo elétrico de BVD consiste de duas partes distintas. A parte superior os componentes são modificados de acordo com a massa e a viscosidade da amostra que se encontra na superfície do cristal: o resistor (R1) representa a dissipação da energia de oscilação; o capacitor C1 corresponde à energia armazenada no processo de oscilação, que está relacionada com a elasticidade do cristal de quartzo e o meio no qual ele está inserido, e o indutor L1 está relacionado com o componente inercial da oscilação. A parte inferior do modelo representada pelo capacitor C_{tot} expressa a capacitância parasita do sistema, formada pela soma da capacitância estática e a capacitância dos conectores do sistema.

Durante uma aquisição de dados na QCM uma variação de frequência Δf é o principal indicador da variação de massa sobre o cristal, de forma que conforme a massa depositada sobre o mesmo aumenta, ocorre uma diminuição na frequência de oscilação. Entretanto, também pode ser conveniente o uso do fator de dissipação (D), que em meio líquido pode ter um seu valor aumentado devido ao casamento de viscosidade.

O cristal de quartzo da QCM é extremamente sensível a variações de massa depositada sobre sua superfície, que quando este está imerso em meio líquido se trata da interação na interface sólido/líquido. Quando o cristal entra em contato com uma solução, há uma alteração na frequência de vibração do mesmo, que depende da viscosidade e da densidade da solução. Uma análise da influência dessa interação na superfície do cristal permite uma previsão de como será a variação da frequência de ressonância, da seguinte forma:

$$\Delta f = -f_q^{3/2} \left(\frac{\rho_l \eta_l}{\pi \rho_q \mu_q} \right)^{1/2} \quad 2.19$$

Onde ρ_q e μ_q são a densidade do quartzo e seu módulo de cisalhamento respectivamente, η_l é a viscosidade da solução na qual o cristal está inserido, ρ_l é a densidade do líquido e f_q é a frequência de ressonância natural do cristal de quartzo. Sendo assim, as aquisições de Δf e ΔD são normalmente utilizadas como indicadores independentes da quantidade de massa acumulada no cristal e da viscosidade na interface entre o cristal e a solução.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Um sensor de hibridação de fitas de DNA é baseado em sequências conhecidas de amostras de DNA imobilizadas na superfície de um eletrodo com o intuito de detectar um DNA alvo em solução. Para o correto funcionamento do eletrodo se faz necessário dominar os parâmetros otimizados da imobilização da amostra como um primeiro passo crucial no desenvolvimento do sensor. Para isso, muitas estratégias diferentes para criar a funcionalização da superfície do eletrodo foram criadas. Uma das estratégias mais utilizadas é a criação de monocamadas auto-organizadas (SAM).

O conceito de SAM baseia-se na descoberta do filme molecular de alcenotiolato espontâneo em ouro [17] e sua capacidade de se conectar a superfícies metálicas. Esta modificação superficial consiste na formação de uma camada monomolecular altamente organizada que é formada espontaneamente quando o eletrodo está em contato com uma solução de moléculas anfotéricas [21].

As ligações de tiol em eletrodos de superfície de ouro são o tipo de SAM mais amplamente estudado [12]. Eles são caracterizados por uma ligação perfeita entre os alcanos em grau de alta organização e foram utilizados em vários estudos, incluindo a transferência de elétrons, um conceito fundamental para o conceito de sensores eletroquímicos [22].

SAM de fitas simples de DNA usam amostras sintéticas da sequência escolhida modificadas com tiol imobilizadas na superfície do eletrodo de ouro através de uma ligação de enxofre-ouro. Para sensores de hibridação, o 6-mercaptop-1-hexanol é uma molécula pequena que funciona como um agente bloqueador e um espaçador para aumentar a acessibilidade das fitas imobilizadas às sequências alvo complementares, comumente usadas devido às suas propriedades de ligação com o substrato por causa do grupo tiol, levando à formação de uma monocamada compacta [23].

Figura 3.1: Esquema ilustrando o sensor baseado na hibridação do DNA passo a passo. (a) imobilização de ssDNA na superfície do eletrodo de ouro, (b) preenchimento com MCH para construir uma monocamada auto organizada (SAM) e (c) SAM hibridizada. Adaptado de [12]

O espaçador utilizado na formação da SAM (ilustrado na Figura 3.1) fornece uma camada compacta e organizada, impedindo a adsorção de bases de DNA hidrofóbicas diretamente na superfície do ouro e reduz a adsorção não específica de fitas alvo na superfície do eletrodo, melhorando a eficiência de hibridação.

3.1 PREPARANDO O ELETRODO

3.1.1 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Os eletrodos de superfície de ouro têm muitas vantagens como substrato para a formação da SAM [21], mas ao mesmo tempo é uma superfície que pode ser facilmente contaminada; criando defeitos que podem interferir no processo de transferência de elétrons e, conseqüentemente, na detecção de hibridação de DNA.

A preparação do eletrodo pode ser dividida em tratamentos físicos, que envolvem polimento mecânico com partículas de alumina de diferentes granulações para remover uma fina camada exterior de ouro e criar uma nova superfície para utilizar os eletrodos; tratamentos químicos, com base em diferentes métodos para oxidar a superfície, como a solução de ozônio ou piranha (uma mistura concentrada de H_2SO_4 e H_2O_2); e tratamentos eletroquímicos, ao fazer a varredura cíclica do potencial do eletrodo em torno de um valor fixo para que a superfície do ouro seja oxidada e depois reduzida para remover as impurezas adsorvidas e reduzir a rugosidade da superfície do eletrodo [24].

Os procedimentos adotados para a preparação dos eletrodos utilizados nesse trabalho seguem os parâmetros estabelecidos em [12] como sendo otimizados. O mesmo conjunto de eletrodos de trabalho de ouro policristalino (2mm de diâmetro, 99,99%, Metrohm 6.1204.020, Suíça) e um contra-eletrodo de platina (Metrohm, Suíça) foram utilizados em todos os experimentos de EIS.

3.1.1.1 Dessorção

Primeiro, os eletrodos foram dessorvidos eletroquimicamente fazendo uma variação cíclica do potencial entre -2,0 e -0,8 V (contra um eletrodo $\text{Hg} / \text{Hg}_2\text{SO}_4$) em uma solução de NaOH a 0,5 M. O potencial negativo usado aqui deve ser capaz de reduzir qualquer composto baseado em tiol remanescente ligado à superfície devido a experimentos anteriores. A Figura 3.2 mostra o gráfico resultante desse processo, evidenciando o pico de redução do tiol.

Figura 3.2: Dessorção de eletrodo em uma solução de 0,5M de NaOH, sob uma variação cíclica do potencial entre 2,0 e -0,8 V (contra um eletrodo Hg / Hg₂SO₄).

3.1.1.2 Polimento Mecânico

Os eletrodos de ouro foram então polidos utilizando soluções de alumina com granulações de 1 e 0.3 μM (Struers, Dinamarca) por 5 minutos para cada granulação. Entre cada polimento, os eletrodos foram sonificados em água MilliQ por 10 minutos com a intenção de remover qualquer resquício de alumina.

3.1.1.3 Limpeza Eletroquímica

A limpeza eletroquímica foi realizada através de ciclos de -0,5 a 1,1 V (contra um eletrodo Hg / Hg₂SO₄) em uma solução de H₂SO₄ a 0,5 M durante 50 ciclos ou até que não se observasse alteração nos voltamogramas. Este procedimento oxida e reduz sucessivamente a superfície do ouro em ácido diluído e os voltamogramas obtidos foram posteriormente usados para determinar a área relativa do eletrodo, definido como a relação entre a área de eletrodo real e sua área geométrica (Figura 3.3).

Figura 3.3: Voltametria cíclica do procedimento de limpeza eletroquímica de -0,5 a 1,1 mV vs. eletrodo de Hg / Hg₂SO₄ em uma solução 0,5M de H₂SO₄. Destacada em azul a região correspondente à área capacitiva.

A área do pico de redução representa a carga necessária para reduzir uma monocamada de oxigênio adsorvido na superfície do ouro em uma varredura de potencial anódico. A área real (AreaR) pode ser calculada como a área do pico reduzido subtraído da área capacitiva [12]. O resultado é então dividido pela constante 390 $\mu\text{C} / \text{cm}^2$ para ouro policristalino, como mostrado na Eq. 3.1:

$$AreaR = \frac{1-2}{390} \quad 3.1$$

$$r = \frac{AreaR}{AreaG} \quad 3.2$$

Onde ÁreaG corresponde a $\pi * raio^2 \text{ cm}^2$. Os valores aceitáveis para usar os eletrodos em um experimento foram limitados de 1 a 1,5, e a área de eletrodo real também foi usada para normalizar os sinais eletroquímicos de cada eletrodo.

3.1.1.4 Enxágue e secagem

Como um passo de limpeza final, os eletrodos foram enxaguados com água ultrapura MilliQ e secos com gás nitrogênio, ficando assim prontos para a imobilização da amostra de DNA.

3.1.2 Microbalança de Cristal de Quartzo

As medidas na QCM foram realizadas no sistema Q-Sense (QCM-D, E4) utilizando como sensores cristais de 5MHz com 14mm de diâmetro, AT-cut, cobertos com ouro.

3.1.2.1 Sonicação em Etanol

Os cristais foram sonicados em um banho de etanol durante 15 minutos.

3.1.2.2 Banho em solução Piranha

Os cristais foram inseridos na solução piranha (solução de peróxido de hidrogênio 1:3 e ácido sulfúrico concentrado) por aproximadamente 1 minuto.

3.1.2.3 Enxágue e Secagem

Como um passo de limpeza final, os eletrodos foram enxaguados com água ultrapura MilliQ e secos com gás nitrogênio, ficando assim prontos para a imobilização da amostra de DNA.

3.2 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Todos os reagentes e oligonucleotídeos sintéticos de DNA foram adquiridos da Sigma-Aldrich e as soluções foram preparadas com água MilliQ ultrapura (sistema Millipore) com Ultrafiltro Biopak Polisher (CDUFBI001) para remover pirogênio, nuclease e protease. A sequência utilizada é uma sequência de DNA correspondente ao miRNA-224, correlacionado ao câncer colorretal. Para obter essa correspondência, as bases de uracila existentes na sequência original de miRNA-224 foram substituídas por bases de timina, a fim de proporcionar ao sistema mais estabilidade e resistência contra a degradação enzimática.

Tabela 3.1: Sequências de DNA correspondentes ao miRNA-224 utilizadas neste estudo: a amostra modificada com tiol e sua sequência complementar completa.

Nomenclatura	Sequência
Amostra (miR-224)	5' -[ThiC6]TTTTTCAAGTCACTAGTGGTTCGTT-3'
Alvo (miR-224)	5'- AACGGAACCACTAGTGACTTG -3'

As sequências modificadas com tiol foram fornecidas em forma protegida com ligação dissulfeto para minimizar o potencial de

oxidação. A empresa Sigma-Aldrich recomenda reduzir a ligação dissulfeto com DTT para se obter uma molécula de tiol livre (-SH). Para ativar a modificação do tiol, uma solução de DTT a 100 mM em tampão de fosfato de sódio, a pH 8,5, foi adicionado à sequência e mantido à temperatura ambiente durante 1 hora. Depois disso, para remover a DTT, a amostra foi eluída em uma coluna NAP-10 (GE Healthcare Life Science) com tampão de fosfato de sódio a 50 mM. A coluna deve remover completamente a DTT na amostra.

Figura 3.4: Ilustração da estrutura molecular de DTT.

As amostras de fita complementar (alvo) listadas na Tabela 3.1 foram fornecidas prontas para uso após sua ressuspensão, que foi realizada adicionando tampão TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA), a pH 7,5 com 100 μ M de solução estoque. As amostras foram divididas e mantidas a -20°C .

3.3 IMOBILIZAÇÃO DA AMOSTRA DE DNA

A imobilização da amostra é o passo mais importante ao produzir um sensor de hibridação, uma vez que as interações com a sequência alvo ocorrem em uma superfície heterogênea. Tentando alcançar um método otimizado, foram relatados muitos procedimentos que descrevem a imobilização da amostra, portanto, como primeiro passo, o método de imobilização foi otimizado para produzir uma superfície funcionalizada do sensor com resposta otimizada e bom controle sobre a reprodutibilidade.

Geralmente, o que a maioria dos procedimentos relatados tem em comum é a formação de SAM, à temperatura ambiente, com tempo de pausa para imobilização variando de minutos a muitas horas, diferentes buffers com pH neutro e examinados usando diferentes técnicas para fornecer informações sobre a interface entre o eletrodo e a SAM.

No procedimento adotado neste estudo, a solução tampão adotada para a imobilização foi o tampão de fosfato de potássio a 1M, pH 7, onde o ssDNA de 1 μ M foi diluído e mantido por 18 horas à temperatura ambiente. Depois disso, os eletrodos foram colocados em contato com uma solução de MCH a 1 mM (em água ultrapura MilliQ) durante 1 h e lavados com NaCl a 10 mM em PB 5 mM, pH 7,4 por mais 1 h. A hibridação das diferentes concentrações de tDNA ocorreram em NaCl 1M, EDTA 1 mM e PB 10 mM, pH 7,4, ao longo de 30 minutos cada. A voltametria cíclica e EIS foram realizados em hexacianoferrato II e III 2 mM (1: 1) em PB 10 mM, pH 7,4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de EIS mede a resistência à transferência de carga (R_{ct}) na presença de um par redox de carga negativa. A detecção através de Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) foi a principal técnica estudada nesse trabalho devido à existência de carga intrínseca negativa dos oligonucleotídeos e provou-se como uma técnica extremamente promissora [13]. No entanto, outras abordagens como a que utiliza uma microbalança de cristal de quartzo (QCM) podem fornecer informações complementares sobre o sistema, auxiliando no desenvolvimento de sensores mais confiáveis.

4.1 DETECÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO USANDO EIS

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica com a configuração de 3 eletrodos, usando um eletrodo de Hg / HgSO_4 (FATEC) como eletrodo de referência e um fio de platina como contra-eletrodo (Metrohm) (

Figura 4.1). Um potenciostato Autolab PGSTAT20 (Metrohm) com um módulo FRA foi utilizado para realizar os experimentos eletroquímicos.

Figura 4.1: Célula eletroquímica utilizada no projeto. Ao lado esquerdo é possível ver o eletrodo de referência (azul), ao centro se encontra o eletrodo de trabalho (vermelho) e à direita o contra-eletrodo (preto), no qual a corrente é medida.

O valor aproximado de R_{ct} para o eletrodo utilizado nesse estudo limpo corresponde a 300Ω [12]. Ao imobilizar as fitas simples na superfície do eletrodo, a carga negativa da sequência de DNA produz uma barreira eletrostática ao marcador redox carregado negativamente $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3- / 4-}$, o que dificulta os processos de transferência de carga entre o marcador redox em solução e a superfície dos eletrodos, levando assim ao aparecimento de uma impedância inicial que pode ser interpretada como a resistência à

transferência de carga entre a superfície do eletrodo e os marcadores redox na solução devido à monocamada de DNA que se encontra imobilizada. Isso pode ser percebido observando a ordem de grandeza da impedância do eletrodo funcionalizado, que apresenta um valor de R_{ct} na ordem de $k\Omega$.

A hibridação tem como resultado um aumento da carga negativa intrínseca da estrutura de fosfato das moléculas de DNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizada. Isso leva a uma mudança tanto física, agregando massa e volume à superfície do eletrodo, quanto uma mudança no potencial da interface; causando um aumento na repulsão entre as fitas de DNA imobilizadas e as cargas negativas do par redox. Por esta razão, uma maior densidade de fitas na superfície do eletrodo resulta em valores mais altos de resistência à transferência de carga (R_{ct}), podendo essa ser transduzida usando diferentes técnicas.

Analizando a Figura 4.2 é possível observar a existência de variações na resistência de transferência de carga (R_{ct}), vista como uma mudança no raio do semicírculo no diagrama de Nyquist, conforme são adicionadas diferentes concentrações de tDNA ao eletrodo funcionalizado.

Figura 4.2: Diagrama de Nyquist contendo os resultados de espectroscopia de impedância eletroquímica para diferentes situações: para o eletrodo modificado apenas com a amostra de fita simples de DNA, e para o eletrodo após a hibridização de diferentes concentrações de fita complementar.

4.2 OTIMIZAÇÃO DO MODELO DE CIRCUITO EQUIVALENTE A SER UTILIZADO

O modelo de Randles apresenta uma boa aproximação para a interação do eletrodo com a superfície quando o modelo considerado para a dupla camada é o modelo proposto por Helmholtz [26], onde a

mesma se assemelha a um capacitor de placas paralelas. Entretanto, como discutido previamente, o modelo mais aceito atualmente para a dupla camada elétrica assume tanto uma área próxima ao eletrodo onde há a formação de uma dupla camada com comportamento semelhante ao de um capacitor quanto uma região subsequente onde os íons se organizam de maneira difusa. Esse comportamento pode ser melhor modelado substituindo o capacitor por um elemento de fase constante para obter uma melhor aproximação da dupla camada eletroquímica real do sistema [27]. A fim entender como esses dois modelos se correlacionam com os dados e escolher o modelo que mais se ajusta ao experimento, foram feitas análises em um mesmo conjunto de dados com os dois modelos utilizando para o ajuste o software Autolab NOVA 1.11 - Metrohm e os resultados podem ser observados na Figura 4.3, a seguir.

Figura 4.3: Variação percentual de R_{ct} para diferentes concentrações de fitas complementares utilizadas para hibridização em relação ao valor de R_{ct} encontrado para o eletrodo modificado apenas com a fita simples de DNA analisados de acordo com dois modelos diferentes, o circuito Randles e um circuito Randles modificado.

Observando o gráfico de comparação dos dois modelos pode-se perceber que há uma diferença em como os dados são interpretados para uma mesma janela de valores de concentração de tDNA. Para o modelo inicial do circuito Randles os valores de variação percentual de R_{ct} variam de 8,99% a 32,97% quando a concentração de fitas complementares na solução de hibridização varia de 0,01 μ M a 10 μ M; gerando assim um intervalo de funcionamento que tem como janela de variação uma amplitude de 23,98%. Já para o modelo modificado a variação percentual vai de 28,81% a 68,92% no mesmo intervalo de concentrações de tDNA, apresentando assim uma janela de funcionamento de 40,11%. Desta maneira, uma variação menor de concentração de fitas complementares corresponde a uma maior variação percentual de R_{ct} . Considerando o circuito Randles modificado

como modelo que representa mais fielmente o experimento realizado de acordo com a literatura, e tendo esse resultado em uma melhor janela de trabalho dos dados obtidos nesse experimento, esse modelo foi escolhido para as análises de todos os dados a seguir, buscando testar então outros parâmetros de otimização.

4.3 OTIMIZAÇÃO DA PROPORÇÃO ENTRE ssDNA E ESPAÇADOR

A detecção eletroquímica com a presença de marcador redox em solução foi investigada através de medidas de EIS, alterando a densidade de amostra na superfície de ouro durante a funcionalização, controlando a proporção molar de tiol total em solução.

A eficiência de hibridação para cada concentração de ssDNA pode ser entendida como a diferença percentual no valor de R_{ct} entre a camada hibridizada completa quando comparada com o valor de R_{ct} para a amostra isoladamente, o que é mostrado na Figura 4.4 para as proporções entre DNA e quantidade total de tiol de 1:3, 1:4 e 1:5.

Figura 4.4: (a) Curvas das variações percentuais médias nos valores de R_{ct} dos eletrodos após a hibridização com diferentes concentrações de tDNA em comparação com o eletrodo contendo apenas a amostra de fita simples de DNA para as proporções de DNA:tiol total na funcionalização de 1:3, 1:4 e 1:5; em destaque em (b) as variações percentuais médias nos valores de R_{ct} dos eletrodos apenas para a concentração de ssDNA 1µM.

A otimização da eficiência de hibridação foi avaliada utilizando a resposta obtida para a variação de R_{ct} fazendo exposições sequenciais do eletrodo funcionalizado a diferentes soluções contendo tDNA em concentrações variando de 0,01 µM a 10 uM por 30 min cada. Em especial foi dada uma atenção maior para a concentração de tDNA de 1µM que é considerada na literatura como sendo suficiente para hibridizar todas as fitas simples de DNA que foram imobilizadas [27], e, portanto, é vista como parâmetro para a determinação da otimização da proporção de ssDNA/tiol total na solução de funcionalização do eletrodo. A alteração máxima no valor de R_{ct} após a hibridação ocorre em torno de uma fração de 20% de ssDNA/tiol total no I-BFR, o que corresponde a amostras de ssDNA:tiol total de 1:4.

4.4 ENTENDENDO A VARIAÇÃO VISTA NOS DIAGRAMAS DE NYQUIST

Com o modelo de ajuste definido e os parâmetros da formação da amostra de funcionalização do eletrodo otimizados, foram então analisados todos os elementos obtidos pelo software com o ajuste do circuito equivalente a fim de compreender quais fatores interferem nas alterações observadas nas curvas dos diagramas de Nyquist obtidos.

Os resultados das variações dos valores absolutos bem como das variações percentuais de cada um dos componentes podem ser vistos a seguir.

Variações do elemento de fase constante têm sido observadas apenas em eletrodos porosos e/ou não homogêneos, não tendo sido possível obter uma interpretação física completa de seu comportamento [28]. Sendo assim, é desejável que seu valor no decorrer do experimento seja aproximadamente constante, a fim de que a variação observada nos diagramas de Nyquist se deva apenas às variações de R_{ct} .

Analisando a Figura 4.5 é possível perceber que o valor de capacitância relativo ao elemento de fase constante manteve-se aproximadamente inalterado, apresentando variações percentuais em torno de 2% no decorrer do experimento, indicando uma grande homogeneidade no eletrodo que se manteve durante as aquisições.

Figura 4.5: Variações dos valores absolutos e variações percentuais para o elemento de fase constante conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA.

A resistência da solução eletrolítica é muitas vezes um fator significativo na variação de impedância de uma célula eletroquímica. O modelo de célula eletroquímica que possui três eletrodos utilizado neste trabalho, tem como objetivo compensar a resistência da solução eletrolítica entre o eletrodo de referência e o contra-eletrodo. Sendo assim, é desejável que seu valor se mantenha inalterado durante os experimentos.

Analisando a Figura 4.6 é possível perceber que o valor de R_{in} sofre pequenas alterações no decorrer do experimento, ficando na faixa de variação de 3 a 9%. Essa variação no valor de R_{in} pode indicar

uma variação na concentração iônica, modelo de íons, temperatura e geometria da área onde a corrente é carregada da solução eletrolítica [29]; que pode ser devido à alguma contaminação da solução com fitas sobressalentes de tDNA no decorrer de sucessivas medidas experimentais.

Figura 4.6: Variações dos valores absolutos e variações percentuais para o resistor de entrada conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA.

Como os eletrodos utilizados no experimento possuem dimensões macroscópicas, a corrente total macroscópica que flui em resposta às variações aplicadas de potencial é o resultado de uma soma de um grande número de filamentos de corrente microscópicos tendo origem e terminando no eletrodo, gerando assim um volume de material onde as propriedades não são completamente homogêneas. As contribuições individuais para a corrente total são então diferentes, causando o aparecimento de uma resposta na forma de um elemento de distribuição relacionado à difusão. Esse elemento de distribuição é modelado a partir da segunda lei de Fick, a equação que modela os processos de difusão, para uma difusão unidimensional de uma partícula em um espaço semi-infinito constante [30], considerado como a espessura da camada de difusão de Nernst [31]. Analisando a figura Figura 4.7 é possível notar que os valores absolutos do coeficiente de Warbrug se mantiveram aproximadamente constantes, possuindo uma variação em torno de 1 a 3%. Essa pequena variação indica então que as propriedades de espessura da camada de difusão na interface do eletrodo de ouro com a solução se mantiveram aproximadamente constantes, o que condiz com o modelo esperado onde a variação no decorrer do experimento se dá na densidade de fitas de DNA e consequentemente na carga acumulada na região superficial do eletrodo, não havendo variação na espessura da camada formada.

Figura 4.7: Variações dos valores absolutos e variações percentuais para o elemento de Warbrug conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA.

Como discutido previamente, conforme as ligações entre as fitas simples inicialmente imobilizadas no eletrodo e as fitas de tDNA durante o processo de hibridização ocorrem, há um aumento na carga negativa na superfície do eletrodo, causando uma barreira de repulsão para os íons carregados negativamente presentes na solução eletrolítica, causando uma variação no aumento de R_{ct} . Essa variação pode ser vista na Figura 4.8, mostrando que esse elemento do sistema apresentou variações percentuais de R_{ct} entre 28,81% a 68,92% para a faixa de concentrações estudada.

Figura 4.8: Variações dos valores absolutos e variações percentuais de R_{ct} conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA.

Por fim todas as variações percentuais foram analisadas em conjunto para que fosse possível uma conclusão a respeito de quais fatores interferem de fato na variação vista nas curvas no diagrama de Nyquist para as aquisições feitas para as diferentes concentrações de tDNA inseridas no sistema.

Figura 4.9: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4.

Observando a Figura 4.9 é possível notar que apesar da flutuação dos valores dos componentes R_{in} , W e CPE , o componente que apresenta uma variação bastante relevante é o R_{ct} , que representa justamente a resistência de transferência de carga do sistema.

O mesmo ajuste de todos os componentes ao modelo de circuito Randles modificado foi feito para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:3 e 1:5, e os dados para cada componente em separado podem ser vistos no Anexo I.

A Figura 4.10 mostra como um resumo todos os dados referentes aos componentes do circuito Randles modificado para cada uma das proporções de ssDNA:tiol total. É possível perceber novamente que a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4 é a proporção otimizada para o sistema em estudo, uma vez que para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:3 e 1:4 a variação percentual de R_{ct} é comparável com as variações dos outros componentes do sistema, enquanto que para a proporção de 1:4 a variação percentual de R_{ct} quando comparada com os outros elementos se destaca bastante; tendo variação de uma ordem de grandeza de diferença.

Figura 4.10: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para as proporções de DNA: tiol total de 1:3, 1:4 e 1:5.

Buscando obter uma curva de calibração do sistema mais completa em relação a diferentes concentrações de fita complementar hibridizadas e obter uma melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na variação dos valores de R_{ct} observados a fim de obter uma curva confiável de calibração do sistema, foram realizados novos experimentos seguindo os mesmos parâmetros otimizados encontrados previamente, e o resultado pode ser visto a seguir.

Figura 4.11: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4.

As características eletroquímicas nesse experimento não foram reprodutíveis e os resultados mostrados são referentes a um eletrodo apenas, que foi o único que apresentou uma resposta no decorrer do experimento. O resultado observado sugere que a SAM formada não tenha sido compacta o suficiente, havendo assim uma interação das fitas simples de DNA com a superfície do eletrodo de ouro, indicando que o tratamento pós imobilização com o espaçador MCH talvez não tenha sido suficiente para remover todas as fitas que não foram corretamente adsorvidas. Ao mesmo tempo, a adsorção das bases de DNA no ouro possui uma ligação tão forte com o ouro que podem romper a hibridização das sequencias complementares com sua base, o que pode resultar em uma baixa estabilidade do sistema [27].

Figura 4.12: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração das duas curvas encontradas para os experimentos realizados. Ambas as curvas foram obtidas para os parâmetros otimizados previamente.

Como pode ser visto na Figura 4.12, a nova curva obtida apresenta variações percentuais menores que a curva anterior, mostrada na figura Figura 4.8.

A fim de situar os dados obtidos na nova curva em meio a experimentos já existentes na literatura, foram comparados os valores de faixa dinâmica e limite de detecção para experimentos com metodologias semelhantes às utilizadas nesse estudo.

No primeiro estudo a ser comparado [35] foi desenvolvido um biossensor eletroquímico utilizando fitas de RNA contendo 33 bases nitrogenadas para a detecção rápida e livre de marcadores de teofilina broncodilatadora. A extremidade funcionalizada com 5'-dissulfureto da sequência de RNA foi imobilizada sobre um eletrodo de ouro e o terminal funcionalizado com 3'-amino foi conjugado com uma sonda redox de ferroceno (Fc). Após a ligação da teofilina, o aptâmero muda sua conformação de um estado desdobrado aberto para uma conformação fechada, do tipo gancho, resultando no aumento da eficiência de transferência de elétrons entre Fc e o eletrodo. A faixa dinâmica para a detecção de teofilina encontrada foi de 0,2–10 μM , e seu limite de detecção foi de 0,2 μM .

No estudo relatado em [36] foi descrito o desenvolvimento de biossensor eletroquímico baseado em aptâmeros de DNA para detecção do interferon (IFN)- γ ; um tipo de citocina que possui propriedades antivirais, antiproliferativas, indutoras de diferenciação e imunorreguladoras. Uma amostra de DNA contendo o ligante para (IFN)- γ conjugado com um marcador redox de metileno foi imobilizado na superfície de um eletrodo de ouro. A ligação do (IFN)- γ causou o desdobramento da molécula de DNA, afastando as moléculas do marcador redox para longe da superfície do eletrodo, diminuindo assim

a eficiência da transferência de elétrons. O limite de detecção do biossensor otimizado foi de 0,06 nM com resposta estendendo-se a 10 nM.

Em [37] foi relatado o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico baseado em aptâmeros de RNA para análise de dopamina na presença de outros neurotransmissores. O biossensor explora uma ligação específica da dopamina com o aptâmero de RNA, imobilizado em um eletrodo de ouro, e a reação de oxidação eletroquímica da dopamina. O reconhecimento específico da dopamina pelo aptâmero permitiu a obtenção de uma detecção amperométrica da dopamina na faixa de 100 nM a 5 μ M; que é fisiologicamente relevante, na presença de concentrações competitivas de catecol, epinefrina, norepinefrina, 3,4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA), ido 3,4-di-hidroxifenilacico (DOPAC), metildopamina e tiramina, que deram sinais insignificantes sob condições de experimentos (eletroanálise a 0,185 V vs AgCl), exibindo assim o sensor uma alta eletividade.

No estudo relatado em [38] foi desenvolvido um biossensor eletroquímico baseado na imobilização sobre a superfície de um eletrodo de ouro de uma sequência de DNA de captura (5'-SH-(CH₂)₆-TCGTACGATCGATCC-3') a fim de quantificar sua ligação com uma sequência alvo de DNA (5'-GCCGCTCACACGATATTTTTTTTGGATCG ATCGTACGA-3'). Buscando uma amplificação na resposta obtida para o biossensor, o eletrodo de ouro foi previamente tratado com uma estratégia para retirar ligantes de prata que possam existir na superfície do eletrodo, onde estes foram desorvidos em ácido nítrico, tornando a superfície do eletrodo 9,2 vezes mais atrativa à novas ligações com as fitas de DNA. No experimento foram utilizados a sequência alvo de DNA que era complementar à sequência de captura, e uma sequência não ligante de DNA conectada a nanopartículas de ouro, a fim de reduzir a reação cruzada entre os alvos de DNA na superfície do eletrodo. Aproveitando a dupla amplificação obtida, este biossensor de DNA foi capaz detectar o DNA alvo na faixa de $8,0 \times 10^{-17} \sim 1,6 \times 10^{-12}$ M, com um limite de detecção de 28 aM, e exibiu excelente seletividade.

Para o estudo mostrado em [39] houve um processo de otimização onde foram testadas diferentes configurações para uma amostra de RNA de 26 bases nitrogenadas, imobilizadas na superfície de um eletrodo de ouro com a finalidade de detectar a ligação de tobramicina, incluindo a variação das frequências de aquisição testadas, e a variação das diferentes formas conformacionais da molécula utilizada como alvo. Para o biossensor otimizado foi encontrada uma faixa dinâmica de 220 nM $\sim$ 42 μ M e um limite de detecção de 220nM.

Por fim, o estudo relatado em [40] mostrou o desenvolvimento de um biossensor baseado na detecção da hibridização de fitas de miRNA-

155 imobilizadas na superfície do eletrodo escolhido, utilizando de nanopartículas de Pt (PtNPs) a fim de amplificar o sinal obtido. Como resultado, o biossensor obteve uma detecção de miRNA-155 na faixa de 0,8 fM a 1 nM com um limite de detecção de 0,35 fM.

Os dados referentes às sequências utilizadas para a funcionalização dos diferentes eletrodos, bem como a faixa encontrada para cada biossensor aqui comparado e seu limite de detecção podem ser encontrados como um resumo na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Comparação das sequências imobilizadas como base do biossensor, da faixa dinâmica obtida e do limite de detecção obtidos para diferentes trabalhos utilizando mitologias semelhantes à utilizada neste trabalho.

Identificação	Sequência	Faixa dinâmica	LOD	Referência
Theophylline-binding RNA	5'-GGCGAUACCAGCCGAA AGGCCCUUGGCAGCGUC-3'	0,2 ~ 10 µM	0,2µM	[35]
(IFN)-γ-binding DNA	5'- NH2-C6-GGGGTTGTTGT GTTGGGTGTTGTGTCCAACCC CC3-SH-3'	0,06nM ~10nM	0,06nM	[36]
Dopamine bonding RNA	5'-GUCUCUGUGUGGCCAG AGACAGUGGGGAGAU AUGG GCCAGCACAGAAUGAGGCC -3'	100nM ~ 5µM	100nM	[37]
AuNPS-reporter DNA	5'-SH-(CH ₂) ₆ -TCGTACGAT CGATCC-3'	28aM ~ 1pM	28aM	[38]
Tobramycin bonding RNA	5'-HSC6-GGGACUUGGUUU AGGUAAUGAGUCCC-MB-3'	220 nM ~ 42 µM	220nM	[39]
MiRNA-155	5'-UUA AUGCUAAUCG UGAUAGGGGU-3'	0.8 fM ~ 1 nM	0.35 fM	[40]
MiRNA-224	5'- CAAGTCACTAGTG GTTCCGTT -3'	0,01µM ~ 3µM	10pM	Este trabalho

Esses valores, portanto, mostram uma faixa dinâmica de funcionamento do sensor condizente quando comparada com as faixas dinâmicas encontradas em outros experimentos semelhantes. Essa comparação de faixas dinâmicas pode ser vista separadamente na Figura 4.13.

Figura 4.13: Comparação das faixas dinâmicas de diferentes estudos, utilizando como substrato eletrodos de ouro semelhantes aos utilizados nesse estudo, bem como metodologias semelhantes.

O limite de detecção (LOD) de um sensor baseado no processo de hibridização corresponde ao menor valor de concentração de analito que o sensor consegue distinguir com clareza do valor da monocamada, a partir do qual a detecção se torna possível. Ele pode ser determinado diminuindo a concentração da fita complementar de DNA na solução de hibridização ao ponto em que nenhuma variação no valor de R_{ct} é visto. Considerando os valores obtidos para a curva analítica para a variação de R_{ct} mostrada na Figura 4.11, o valor encontrado para o limite de detecção corresponde a 10pM. A comparação desse valor de LOD com os valores encontrados em outros estudos pode ser vista na Figura 4.14.

Figura 4.14: Comparação dos limites de detecção de diferentes estudos, utilizando como substrato eletrodos de ouro semelhantes aos utilizados nesse estudo, bem como metodologias semelhantes.

Esse valor pode ser considerado alto em comparação com alguns biossensores semelhantes encontrados na literatura, entretanto esse sistema não possui nenhum tipo de amplificadores de sinal como nanopartículas, intercaladores redox ou amostras sem cargas, que fariam com que a detecção em concentrações menores de analito se tornasse mais evidente.

4.5 DETECÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO UTILIZANDO A QCM

Diferentemente da técnica de EIS, uma microbalança de cristal de quartzo mede a variação da frequência de vibração de um cristal ressonador de quartzo causada a partir da pressão mecânica exercida por uma variação de massa depositada sobre o cristal em relação à sua área. A frequência de ressonância do cristal é perturbada pela adição ou remoção de uma pequena massa devido ao acréscimo/decrécimo de óxido ou deposição de massa na superfície do ressonador acústico, fornecendo informações em tempo real sobre a formação da SAM, sendo, portanto, uma forma de detecção dinâmica.

Tendo como embasamento resultados obtidos antes na literatura [33], e buscando compreender melhor os parâmetros que caracterizam as técnicas de aquisição de EIS e QCM, o biossensor foi testado utilizando-se uma balança de quartzo. Inicialmente as aquisições foram realizadas utilizando os parâmetros encontrados como sendo otimizados para as aquisições de EIS, com a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4. O oscilador foi excitado em sua frequência de ressonância fundamental e foram monitoradas as frequências de ressonância dos harmônicos de números inteiros ímpares, nesse caso a frequência fundamental, o terceiro, quinto e sétimo harmônico, que representam apenas os harmônicos que são eletricamente excitados quando o cristal

vibra em sua frequência fundamental [34]; bem como o parâmetro D relativo à dissipação de energia.

Após a estabilização do sistema à temperatura ambiente, diferentes concentrações de DNA foram injetadas a uma taxa de 100µl/min e o fluxo foi desligado para que houvesse a hibridização. Após 30 minutos foi injetado buffer para a remoção da solução de tDNA sobressalente. Na Figura 4.15 são mostradas as variações da frequência conforme as concentrações de 0,01; 0,1 e 1µM de tDNA foram injetadas no sistema em função do tempo. A variação da frequência, Δf , para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4 é mostrada na Tabela 4.2 com os respectivos valores de variação de massa Δm e quantidade de moléculas hibridizadas.

Figura 4.15: Curva em tempo real da resposta em frequência para o terceiro harmônico conforme injeção de soluções com diferentes concentrações de fitas complementares de DNA no decorrer do tempo em uma situação de fluxo contínuo.

A variação de frequência foi aplicada na equação de Sauerbrey para a determinação da variação de massa depositada [34], onde C_q foi substituído por 17,1 Hz.ng.cm⁻², um valor comumente aceito para cristais de 5MHz e n correspondente a 3. A quantidade de fitas de DNA hibridizadas (Γ) foi calculada da seguinte forma:

$$\Delta m = \frac{MWT\Gamma}{N_A} \quad 4.1$$

Os resultados de Δf , Δm e quantidade de fitas hibridizadas obtidos para cada uma das concentrações pode ser vista na Tabela 4.2, a seguir:

Tabela 4.2: Quantidade de DNA hibridizado. A partir dos gráficos obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4 foram extraídos Δf , Δm e foi calculada a quantidade aproximada de fitas DNA hibridizadas.

Concentração	Delta f	Delta m	Hibridização
0,01	-0,66	3,8645	0,03
0,1	-3,95	23,305	0,20
1	-8,185	48,2915	0,42

Como uma forma de entender melhor o sistema de aquisições utilizando a QCM, tendo como base os resultados obtidos em [32] para a otimização das proporções de ssDNA:tiol total para as técnicas de EIS e de QCM para um mesmo analito no biossensor, a proporção de 1:50 também foi testada. Os resultados de Δf , Δm e quantidade de fitas hibridizadas obtidos para cada concentração nessa nova configuração do sistema podem ser vistos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Quantidade de DNA hibridizado. A partir dos gráficos obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:50 foram extraídos Δf , Δm e foi calculada a quantidade aproximada de fitas DNA hibridizadas.

Concentração	Delta f	Delta m	Hibridização
0,01	-213,93	1262,18	11,22
0,1	-447,59	2640,78	23,47
1	-540,3	3187,77	28,33

As informações contidas nas tabelas 4.1 e 4.2 podem ser interpretadas de forma mais clara comparando graficamente as diferenças entre os valores obtidos para as diferentes proporções de ssDNA:tiol total.

Na Figura 4.16 pode ser vista a comparação nas variações de frequência para cada uma das concentrações inseridas no sistema para hibridização quando comparadas com o eletrodo funcionalizado para as duas proporções de ssDNA:tiol total testadas. Concordantemente com a equação de Sauerbrey, conforme a hibridização das fitas simples aumenta, causando um aumento na quantidade de massa depositada sobre o cristal de quartzo ressonante, há uma diminuição na frequência de ressonância do mesmo. Essa variação da frequência pode ser vista para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:4, entretanto o sensor apresenta valores de variação mais expressivos para a proporção de 1:50.

Figura 4.16: Variação da frequência em função da concentração de fitas complementares para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:4 e 1:50.

De acordo com os valores de variação de frequência obtidos é possível calcular a variação de massa sobre a superfície do eletrodo de ouro no cristal ressonante, e assim como no gráfico que mostra a variação das frequências, o gráfico que compara a variação de massa depositada mostra que o sensor com uma proporção de ssDNA:tiol total de 1:50 é mais sensível que o mesmo arranjo utilizando uma proporção de 1:4.

Figura 4.17: Variação da massa em função da concentração de fitas complementares para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:4 e 1:50.

Por fim, calculando a quantidade de fitas de DNA hibridizadas, que é o objetivo do estudo, é possível ver que para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:50 a quantidade de hibridizações que acontecem é superior à quantidade de hibridizações para a proporção de 1:4.

Figura 4.18: Variação da quantidade total de fitas de DNA hibridizadas em função da concentração de fitas complementares para as proporções de ssDNA:tiol total de 1:4 e 1:50.

Comparando os resultados obtidos para a técnica de EIS e a técnica de QCM é possível verificar que os parâmetros que são otimizados para uma técnica não necessariamente representam os parâmetros otimizados para outra. Os dados relativos à proporção de ssDNA:tiol total de 1:50 mostraram uma resposta nitidamente mais expressiva que a proporção de 1:4, corroborando com a tendência dos valores encontrados na literatura, onde foram reportadas como otimizadas proporções de 1:200 [32].

Essa diferença reforça o fato de que para o sistema de QCM o fator relevante para as medidas observadas foi a otimização da eficiência da cobertura da superfície do eletrodo visando uma maior taxa de hibridização. Já para a técnica de EIS, a otimização do sistema de resposta está relacionada à uma maior densidade de amostra na superfície do ouro, tendo como mais sensível um sensor onde a monocamada se encontra mais compacta. Isso se relaciona principalmente com o princípio físico de funcionamento das duas técnicas, onde a QCM sendo uma técnica gravimétrica possui relação direta com a quantidade de massa ligada à superfície do eletrodo, e a EIS, sendo uma técnica impedométrica tem uma relação direta com como as amostras atuam no bloqueio ou facilitação da interação da superfície do eletrodo com a solução eletrolítica.

5 CONCLUSÕES

Nesse estudo foram investigadas diferentes estratégias para a otimização de biossensores baseados tanto na técnica de EIS quanto no uso de uma QCM. Foi utilizada uma amostra de fita simples de DNA correspondente ao miRNA-224, escolhido devido à recente correlação de sua super-expressão com a agressividade e com a alta taxa de incidência de metástases em pacientes que possuem câncer colorretal, bem como sua fita de sequência diretamente complementar a fim de monitorar a quantidade de hibridização com as diferentes técnicas utilizadas.

Para a técnica de EIS o procedimento de análise dos dados foi inicialmente estudado a fim de encontrar o modelo físico que melhor se ajustasse ao experimento, comparando o circuito Randles clássico com um circuito Randles modificado, onde o capacitor foi substituído por um elemento de fase constante buscando modelar melhor o sistema estudado. O que foi observado foi que para um mesmo conjunto de dados o circuito Randles modificado teve como resultado uma janela de variação dos valores de R_{ct} de 40,11%, enquanto que para o circuito Randles a janela de variação foi de 23,98%; o que fez com que o modelo modificado fosse o escolhido para trabalhar todos os dados seguintes.

Foi dado então início ao estudo da otimização da imobilização da amostra de fitas simples de DNA analisando soluções de diferentes frações molares de amostra e espaçador diluídas em buffer para que ocorra uma co-imobilização, método esse que promove um controle mais efetivo da densidade de amostra na superfície do eletrodo. As proporções testadas foram de 1:3, 1:4 e 1:5, e a curva da variação percentual do valor de R_{ct} em função das diferentes concentrações de fita complementar hibridizada foi utilizada para analisar a eficiência de hibridização. Os resultados mostraram que para a amostra em questão a proporção de 20%, que corresponde a 1:4 no buffer de imobilização levaram a uma maior variação de R_{ct} devido a hibridização.

Para os valores encontrados para a curva analítica construída, um limite de detecção de 10pM foi observado. Esse valor pode ser considerado alto em comparação com alguns estudos encontrados na literatura, entretanto esse sistema não possui nenhum tipo de amplificadores de sinal como nanopartículas, intercaladores redox ou amostras sem cargas, que ajudariam na detecção de concentrações menores de analito.

O sistema foi reproduzido em eletrodos de uma microbalança de quartzo a fim de comparar um mesmo analito de hibridização de fitas simples de DNA em um método de análise diferente. Inicialmente o experimento foi realizado utilizando uma proporção de ssDNA:tiol total de 1:4, que havia sido encontrada como otimizada para o sistema de EIS, para ver a resposta do sistema. Houve uma queda da frequência devido a hibridização das fitas complementares de DNA; entretanto

como os valores de otimização da proporção de ssDNA:tiol total na solução de imobilização reportados na literatura mostravam valores muito diferentes, foi testada então uma proporção de 1:50 e o resultado obtido foi uma variação de frequência muito maior em comparação à proporção de 1:4. Os valores testados para as proporções de ssDNA:tiol total na solução de imobilização para a QCM não permitem que haja uma conclusão a respeito da real proporção otimizada para esse método, uma vez que apenas foram adquiridos dois pontos da curva de como o sistema se comporta em função desse parâmetro, tornando-se assim uma análise mais aprofundada para a esse tipo de conclusão. Os resultados obtidos, entretanto, permitem uma avaliação da comparação entre os dois métodos de análise escolhidos.

A diferença encontrada em qual proporção de ssDNA:tiol total na solução de imobilização para as diferentes técnicas se deve ao fato de elas terem como base diferentes princípios físicos de detecção da hibridização no sistema. Os resultados encontrados com a QCM confirmam a importância de uma otimização da área de cobertura da superfície a fim de aumentar a eficiência de hibridização. Para a técnica de EIS, entretanto, os dados mostram que uma maior densidade de DNA na superfície é necessária para uma otimização do sinal impedométrico. As medidas impedométricas em biossensores dependem do equilíbrio entre diferentes fatores, tais como o efeito da carga superficial e mudanças de conformação do DNA acontecendo após a hibridização do alvo, o que faz com que a densidade de amostra de DNA na superfície do eletrodo para o qual a máxima hibridização ocorra não é necessariamente a densidade de superfície ideal para medições de EIS.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2005: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA 2004. 94p. il.
- [2] MARBLE, K.; BANERGEE, S.; GREENWALD, L. Colorectal carcinoma in young patients. *J Surg Oncol* 1992; 51: p 179-182.
- [3] DRUMOND, C.A.; FERRO, R.A.F.; NOGUEIRA, A.M.F.; PROFETA da LUZ, M.M.; CONCEIÇÃO, S.A.; SILVA, R.G.; LACERDA FILHO, A. Câncer colorretal em pacientes com idade inferior a 30 anos. *Rev Bras Coloproct jul./set. 2003; 23 (3): p 147-154.*
- [4] CUSACK, J.C.; GIACCO, G.G.; CLEARY, K. DAVIDSON, B.S.; IZZO, F.; SKIBBER, J.; YEN, J.; CURLEY, S.A. Survival factors in 186 patients younger than 40 years old with colorectal adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 1996; 183: p 105- 112.
- [5] BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Gestão e incorporação de Tecnologias em Saúde, "PET-CT na detecção de metástase hepática exclusiva potencialmente ressecável de câncer colorretal". Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC, abr-2014.
- [6] Eric M. Rohren, MD, PhD Timothy G. Turkington, PhD R. Edward Coleman, MD. Clinical Applications of PET in Oncology. *Radiology* 2004; 231:305–332
- [7] H. Ling, K. Pickard, C. Ivan, C. Isella, M. Ikuo, R. Mitter, R. Spizzo, M. D. Bullock, C. Braicu, V. Pileczki, K. Vincent, M. Pichler, V. Stiegelbauer, G. Hoefler, M. I. Almeida, A. Hsiao, X. Zhang, J. N. Primrose, G. K. Packham, K. Liu, K. Bojja, R. Gafa, L. Xiao, S. Rossi, J. H. Song, I. Vannini, F. Fanini, S. Kopetz, P. Zweidler-McKay, X. Wang, C. Ionescu, A. Irimie, M. Fabbri, G. Lanza, S. R. Hamilton, I. Berindan-Neagoe, E. Medico, A. H. Mirnezami, G. A. Calin, e M. S. Nicoloso, "The clinical and biological significance of MIR-224 expression in colorectal cancer metastasis", *Gut*, vol. 65, no 6, p. 977–989, jun. 2016.
- [8] HENEGHAN, H. M.; MILLER, N.; KERIN, M. J. Mirnas as biomarkers andtherapeutic targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 10, p.543–550, 2010.
- [9] M. FATIMA C. GUEDES DA SILVA, Voltametria Cíclica — Aplicações ao Estudo de Mecanismos de Reações Induzidas por Transferência Electronica

- [10] ZHANG, B. et al. micrnas as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, v. 302, p. 1–12, 2007
- [11] ESTRELA, P. *Essays in Biochemistry*. 1st. ed. [S.l.]: Portland Press, 2016. ISBN 978-1-85578-199-3
- [12] Batistuti, Marina Ribeiro. Detecção de alterações relacionadas ao câncer de mama através de sensores de carga ou de massa acoplados a monocamadas de DNA / Marina Ribeiro Batistuti. Thesis (Ph.D. - Program of Postgraduate in Physics applied to Medicine and Biology) - Faculty of Philosophy, Sciences and Literature da University of São Paulo, Ribeirão Preto - SP, 2017.
- [13] DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical dna sensors. *Nature Biotechnology*, v. 21, p. 1192 – 1199, 2003
- [14] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. 2nd. ed. [S.l.]: Wiley, 2000. ISBN 978-0-471-04372-0.
- [15] WANG, H.; PILON, L. Accurate simulations of electric double layer capacitance of ultramicroelectrodes. *J. Phys. Chem. C*, v. 115, p. 16711–16719, 2011.
- [16] STOJEK, Z. *Electroanalytical Methods*. 2nd. ed. [S.l.]: Springer, 2009. ISBN 978-3-642-02914-1
- [17] LOVE, J. C. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. *Chemical Reviews*, v. 4, p. 1103–1169, 2005.
- [18] RODAHL, M. et al. Simultaneous frequency and dissipation factor qcm measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. *Faraday Discuss*, v. 107, p. 229–246, 1997.
- [19] SAUERBREY, G. Verwendung von schwingquarzen zur wagung dunner schichten und zur mikrowagung. *Zeitschrift fur Physik*, v. 155, p. 206–222, 1959.
- [20] NOMURA, T.; MINEMURA, A. Behavior of a piezoelectric quartz crystal in an aqueous solution and the application to the determination of minute amount of cyanide. *Chemical Society of Japan*, v. 10, p. 1621–1625, 1980.
- [21] CARVALHAL, R. F.; FREIRE, R. S.; KUBOTA, L. T. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanalysis*, v. 17, p. 1251–1259, 2005.

- [22] TOMBELLI, S.; MASCINI, M.; TURNER, A. P. F. Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 17, p. 929–936, 2002.
- [23] STEEL, A. B. et al. Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: Effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophysical Journal*, v. 79, p. 975–981, 2000.
- [24] HOOGVLIET, J. C. et al. Electrochemical pre-treatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self assembly: A study in phosphate buffer pH 7.4. *Analytical Chemistry*, v. 72, p. 2016–2021, 2000.
- [25] Bruce, P. G., *Solid State Electrochemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- [26] J.R. Macdonald, Note on the parameterization of the constant-phase admittance element, *Solid State Ionics* 13 (1948) 147–149
- [27] STEEL, A. B.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J. Electrostatic interactions of redox cations with surface-immobilized and solution dna. *Bioconjugate chemistry*, v. 10, p. 419–423, 1999.
- [28] MACHADO, Pedro Alves. Estudo da atuação e sinergismo de inibidores de corrosão para o aço inoxidável austenítico 304 em meio de ácido peracético comercial 0,2%. 2014. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, University of São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/D.46.2014.tde-30092014-110547. Acesso em: 2018-03-30.
- [29] ROLON, Rodrigo Alejo Ramirez Parquet. Avaliação da Resistencia a Corrosão de Revestimentos Através de Técnicas Eletroquímicas. 2005. Trabalho de graduação apresentado ao Curso de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para a obtenção do título de Engenheiro de Materiais.
- [30] FRANCESCHETTI, D.R.; MACDONALD, J.R. Difusion of neutral and charged species under small-signal AC conditions. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v.101, n.3, p.307-316, 1979.
- [31] LLOPIS, J.; COLOM, F. Study of the impedance of a platinum electrode acting as anode. In: MEETING OF THE COMITÉ INTERNATIONAL DE THEMODYNAMIQUE ET DE CINÉTIQUE ÉLECTROCHEMIQUES, 8., Madrid. Proceedings ... London: Butterworths, 1956. Pp. 414-427.
- [32] N Formisano, P Jolly, N Bhalla, M Cromhout, SP Flannagan, R Fogel, JL Limson and P Estrela : Optimisation of an Electrochemical

Impedance Spectroscopy Aptasensor by Exploiting Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Signals , Sensors and Actuators B, vol 220, pp 369-375, December 2015.

[33] Edvardsson M., Rodahl M., Kasemo B., Höök F. A dual-frequency QCM-D setup operating at elevated oscillation amplitudes. Anal. Chem. 2005;77:4918–4926. doi: 10.1021/ac050116j.

[34] SAUERBREY, G. Verwendung von schwingquarzen zur wagung dünner schichten und zur mikrowagung. Zeitschrift für Physik, v. 155, p. 206–222, 1959 [35]

[35] Elena E. Ferapontova, , Eva M. Olsen, and Kurt V. Gothelf; An RNA "Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Detection of Theophylline in Serum". J. Am. Chem. Soc., 2008, 130 (13), pp 4256–4258

[36] Ying Liu†, Nazgul Tuleouva, Erlan Ramanculov, and Alexander Revzin; "Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Interferon Gamma Detection". Anal. Chem., 2010, 82 (19), pp 8131–8136

[37] Elaheh Farjami, Rui Campos, Jesper S. Nielsen, Kurt V. Gothelf, Jorgen Kjems, and Elena E. Ferapontova "RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Selective and Label-Free Analysis of Dopamine". Anal. Chem., 2013, 85 (1), pp 121–128

[38] Kongcheng Hu, Dongxiao Lan, Xuemei Li and Shusheng Zhang. "Electrochemical DNA Biosensor Based on Nanoporous Gold Electrode and Multifunctional Encoded DNA–Au Bio Bar Codes". Anal. Chem., 2008, 80 (23), pp 9124–9130

[39] Lauren R. Schoukroun-Barnes, Samuillah Wagan, and Ryan J. White* "Enhancing the Analytical Performance of Electrochemical RNA Aptamer-Based Sensors for Sensitive Detection of Aminoglycoside Antibiotics". Anal. Chem., 2014, 86 (2), pp 1131–1137

[40] Xiaoyan Wu, Yaqin Chai*, Pu Zhang, and Ruo Yuan* "An Electrochemical Biosensor for Sensitive Detection of MicroRNA-155: Combining Target Recycling with Cascade Catalysis for Signal Amplification". ACS Appl. Mater. Interfaces, 2015, 7 (1), pp 713–720

[41] I. Fonseca, L. Proença, e S. Capelo, "Cyclic voltammetry and unidirectional linear voltammerty: potentialities in the study of corrosion processes", Corrosão e Protecção de Materiais, vol. 34, no 1, p. 12–21, jun. 2015.

7 ANEXO I

Os resultados das variações dos valores absolutos de cada um dos componentes para a proporção de ssDNA:tiol total na solução de imobilização de 1:3 podem ser vistos a seguir.

Figura 7.1: Variações dos valores absolutos para Rct e para o elemento de Warburg conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:3.

Figura 7.2: Variações dos valores absolutos para o elemento de fase constante e para o resistor de entrada conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:3.

Figura 7.3: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:3.

Os resultados das variações dos valores absolutos de cada um dos componentes para a proporção de ssDNA:tiol total na solução de imobilização de 1:5 podem ser vistos a seguir.

Figura 7.4: Variações dos valores absolutos para Rct e para o elemento de Warburg conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:5.

Figura 7.5: Variações dos valores absolutos para o elemento de fase constante e para o resistor de entrada conforme adição de diferentes concentrações de tDNA na superfície do eletrodo previamente funcionalizado com ssDNA na proporção de ssDNA:tiol total de 1:5.

Figura 7.6: Comparação entre as diferentes variações percentuais em função da concentração de fitas complementares na solução de hibridização de todos os componentes do circuito Randles modificado que foi utilizado para ajustar os dados obtidos para a proporção de ssDNA:tiol total de 1:5.

8 ANEXO II

Participações em eventos científicos:

- Apresentação do trabalho intitulado "Biomedical device for detection of colorectal câncer focused on the hybridizations of microRNAs 21 and 224" no Oitavo Simpósio de Instrumentação e Imagens Médicas e Sétimo Simpósio de Processamento de Sinais (SPS), realizado na Universidade Federal do ABC, no Campus de São Bernardo do Campo, SP, Brasil, de 29 de novembro a 01 de dezembro de 2017.
- Apresentação do trabalho intitulado "Biosensor for microRNA colorectal câncer detection" no XL Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, realizado em Armação de Búzios, RJ, Brasil, de 27 a 31 de agosto de 2017.
- Apresentação do trabalho intitulado "Biossensor eletroquímico para detecção de microRNAs relacionados com câncer colorretal" no XXII Congresso Brasileiro de Física Médica, realizado no Centro de Convenções de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil, de 06 a 09 de setembro de 2017.