

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

Gustavo Freitas do Nascimento

**Desenvolvimento de dispositivos para o monitoramento
da bactéria *Fusobacterium nucleatum* para o diagnóstico
precoce de câncer colorretal**

São Carlos

2021

Gustavo Freitas do Nascimento

**Desenvolvimento de dispositivos para o monitoramento
da bactéria *Fusobacterium nucleatum* para o diagnóstico
precoce de câncer colorretal**

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior

Versão original

**São Carlos
2021**

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.

Nascimento, Gustavo Freitas do

Desenvolvimento de dispositivos para o monitoramento da bactéria *Fusobacterium nucleatum* para o diagnóstico precoce de câncer colorretal / Gustavo Freitas do Nascimento; orientador Osvaldo Novais de Oliveira Junior - versão corrigida -- São Carlos, 2021.

93 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Genossensor. 2. Eletrodos impressos. 3. Câncer colorretal. 4. Micropartículas magnéticas. 5. *Fusobacterium nucleatum*. I. Oliveira Junior, Osvaldo Novais de, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Freitas do Nascimento

Dissertação apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular..

Aprovado(a) em: 16/07/2021

Comissão Julgadora

Dr(a). Osvaldo Novais de Oliveira Junior

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Hideko Yamanaka

Instituição: (UNESP/Araraquara)

Dr(a). Antonio Riul Júnior

Instituição: (UNICAMP/Campinas)

Dedicado com carinho à memória da minha avó

Maria Izabel

que me criou e apoiou desde a infância.

*Ficaram as lembranças para contar
como foi sua vida.*

*E restam as saudades para lembrar
a falta que você fará.*

AGRADECIMENTOS

Este projeto recebeu o suporte e a ajuda necessária de diferentes áreas, das quais eu serei eternamente grato.

Eu sou profundamente grato ao meu orientador Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Junior, que acreditou em mim desde a graduação e me incentivou a ir além. Eu também gostaria de expressar minhas mais profunda gratidão à Dra. Gisela Ibáñez-Redín, pelo seu apoio, pela ajuda no laboratório e pelos seus imprescindíveis conselhos.

Eu expresso minha mais sincera gratidão à Dr. Elsa Materón por sua orientação, comentários pertinentes e sugestões foram indispensáveis para essa dissertação. Eu sou eternamente grato a ela por me introduzir à eletroquímica e por sempre demonstrar sua paixão pela ciência. Todos os meus amigos e colegas do laboratório em São Carlos, especialmente Rafael Francisco, Beatriz Tirich, Caroline Aoki, Paula Cavalcante, Angélica Santos e Louis Fellipe (Panamá) por sua ajuda e amizade. Obrigado pela sua paciência e tempo gasto comigo.

Eu gostaria de agradecer aos técnicos do laboratório, Dra. Débora Balogh, Bruno, Berto, Níbio e Ademir pela excelente infraestrutura e um excelente ambiente de trabalho fornecido. Um agradecimento especial aos integrantes do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Amor de Barretos que participaram no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigado pelas suas contribuições e pelo fornecimento das amostras dos pacientes;

A todos os funcionários do IFSC/USP, em especial a Ricardo Vital e Silvio Athayde pela sua colaboração e paciência durante todos estes anos;

Às agências de fomento, principalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa concedida;

Eu devo a minha mais profunda gratidão aos meus pais Daviane e Jurandi, meu irmão David, meus avós Raimunda e Antônio (sua ausência sempre será sentida, vô) e meus melhores maiores companheiros em São Carlos, Djaci Augusto e Edson Gonçalves (Pelé), que continuaram me incentivando e apoiando todo esse tempo, vocês tornaram esse sonho possível. Palavras nunca serão suficientes para demonstrar a minha gratidão. Muito Obrigado!

Finalmente, as incontáveis pessoas que conheci no decorrer de toda essa aventura, vocês fizeram minha vida muito mais feliz e seria impossível nomeá-los todos aqui.

"O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) de Abr/2019 a

Mar/2021. Código de financiamento 001"

*“Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’
Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Por que não?’”*
George Bernard Shaw

RESUMO

Nascimento, G. F. **Desenvolvimento de dispositivos para o monitoramento da bactéria *Fusobacterium nucleatum* para o diagnóstico precoce de câncer colorretal.** 2021. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Monitorar a presença de microrganismos em fluidos corporais é essencial para o diagnóstico de diversas doenças, como é o caso da *Fusobacterium nucleatum*, associada ao câncer colorretal. Para que esse monitoramento seja de baixo custo e implementável em sistemas públicos de saúde, novas metodologias precisam ser desenvolvidas. Neste trabalho, foram produzidos genossensores eletroquímicos com eletrodos de carbono impressos com micropartículas magnéticas para pré-concentrar a sequência de DNA da *Fusobacterium nucleatum*. Em condições otimizadas com voltametria de onda quadrada, o genossensor apresentou resposta sigmoide representada pela isoterma de adsorção de Langmuir-Freundlich para a sequência complementar (*target*) nas concentrações de 1,38 a 172,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com limite de detecção e de quantificação de 2,03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 6,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esse genossensor também foi capaz de detectar a sequência *target* em extrato celular de linhagens de células (SW620 e HT-29) de pacientes com câncer colorretal, com taxa de recuperação de 85 a 108%. Conclui-se que a metodologia proposta é uma alternativa para o diagnóstico e prognóstico de baixo-custo e não invasivo de câncer colorretal.

Palavras-chave: Genossensor. Eletrodos impressos. Câncer colorretal. Micropartículas magnéticas. *Fusobacterium nucleatum*.

ABSTRACT

Nascimento, G. F. **Low-cost disposable screen-printed carbon based electrochemical device for early diagnosis of colorectal cancer**. 2021. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Monitoring the presence of microorganisms in body fluids is essential for the early diagnosis of various disorders, as in the case of *Fusobacterium nucleatum* that is associated with colorectal cancer. If this monitoring is to be implemented in large scale in the public health system, low-cost methodologies need to be developed. In this work, we produced electrochemical genosensors made with screen-printed carbon electrodes which are employed with magnetic dynabeads to pre-concentrate and detect *Fusobacterium nucleatum*. Under optimized conditions, the genosensor exhibited a sigmoidal response in square wave voltammetry for the complementary sequence (target) of *Fusobacterium nucleatum* from 1.38 to 172.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with a detection limit of 2.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and limit of quantification of 6.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$. This genosensor was also capable of detecting the target in cell lysates (SW620 and HT-29), with recovery from 85 to 108%. The proposed methodology may represent an efficient, alternative method for low-cost and non-invasive diagnostic and prognostic of colorectal cancer.

Keywords: Genosensor. Screen-printed electrodes. Colorectal cancer. *Fusobacterium nucleatum*. Dynabeads. Biosensor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização do ciclo celular de células somáticas. (I) representa a etapa da interfase. (M) se refere à etapa mitótica	34
Figura 2 – Doenças orais e extra orais associadas com a <i>Fusobacterium nucleatum</i> em humanos	38
Figura 3 – Mecanismos pelos quais a <i>Fusobacterium nucleatum</i> contribui para a carcinogênese do CCR	39
Figura 4 – Princípio de funcionamento e componentes estruturais básicos de um biossensor	40
Figura 5 – Comparação entre as diferentes estratégias (a) com e (b) sem (<i>label-free</i>) marcadores para detectar analitos.	41
Figura 6 – (a) Estrutura química do intercalador azul de metileno (MB) e (b) mecanismo de interação do intercalador com as sequências de DNA	43
Figura 7 – (a) Estrutura química do mediador redox cloreto de hexaamino rutênio (Ru (III)) e (b) mecanismo de interação do mediador redox com as sequências de DNA	43
Figura 8 – Circuito equivalente para uma célula eletroquímica de 3 eletrodos - circuito equivalente de Randles	45
Figura 9 – (a) Modulação do potencial e (b) voltamograma da técnica de voltametria cíclica	47
Figura 10 – Modulação do potencial na técnica SWV	48
Figura 11 – Representação do sistema contendo um eletrodo de trabalho, auxiliar e referência	52
Figura 12 – Mecanismo de reação química para imobilizar biomoléculas com aminas primárias utilizando os cross-linkers EDC e NHS	53
Figura 13 – Protocolo de imobilização, bloqueio, hibridação com a sequência complementar e interação com o mediador redox Ru (III)	55
Figura 14 – Espectros FTIR das etapas de imobilização de ssDNA em MPs para a construção de um genossensor eletroquímico. Tempo de incubação com $8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ssDNA: 180 minutos. Depositaram-se $15 \mu\text{L}$ da solução na placa de Si e seca a vácuo, e após aberta a câmara para posicionamento da amostra esperou-se 15 minutos com fluxo de N_2 para obter os espectros. Concentração final de MPs de 4 mg mL^{-1}	58
Figura 15 – Espectros UV da sonda da <i>F. nucleatum</i> (a) espectro de solução contendo a sequência do primer do gene <i>nusG</i> para cálculo da concentração, verde; (b) espectro previsto no modelo Nearest-neighbor, azul	59

Figura 16 – Imagens de MEV para (a) SPCE, (b) MPs-SPCE, (c) MPs e (d) MPs depois da incubação com EDC/NHS. (e) histograma da distribuição de tamanho das MPs	60
Figura 17 – Estudo da velocidade de varredura de potenciais em SPCEs não modificados e SPCEs modificados com $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ MPs, obtidos em $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $Fe(C_5H_5)_2$ em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl , $v = 10 - 400 \text{ mV s}^{-1}$ (a) e (b) voltamogramas sem MPs e com MPs, respectivamente, (c) $i_p \times \nu^{\frac{1}{2}}$, (d) $\log i_p \times \log \nu$	63
Figura 18 – Voltamogramas por SWV em três eletrodos ($n = 3$) com os seguintes parâmetros: $f = 15 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E = 1 \text{ mV}$ em solução $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ru (III) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2	64
Figura 19 – SWV para os componentes eletroativos na construção do genossensor. Concentração final de MPs de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Incubação de 30 minutos em solução de $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ Ru (III), diluído em 10 mmol L^{-1} PBS pH 7.4. Concentração de $K_3Fe(CN)_6$ 10 mmol L^{-1} em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7.4	65
Figura 20 – Representação da estratégia de amplificação do sinal do mediador redox com sondas sacrificiais. (a) reação de redução do Ru (III); (b) reação de oxidação do Ru (III)	65
Figura 21 – Aumento do sinal eletroquímico da sonda redox cloreto de hexamino rutênio utilizando duas sondas sacrificiais: $[Fe(CN)_6]^{-3}$ e $[Fe(CN)_6]^{-4}$. Experimento realizado com a técnica de voltametria de onda quadrada, com os seguintes parâmetros: $f = 15 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E = 1 \text{ mV}$	66
Figura 22 – Efeito na resposta redox da concentração de ssDNA-MPs e dsDNA-MPs capturados nos eletrodos. Hibridização a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ em 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} $MgCl_2$ durante 30 minutos. SWV em três eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E = 1 \text{ mV}$ em 10 mmol L^{-1} de $K_3Fe(CN)_6$ em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2	67
Figura 23 – Efeito da temperatura na eficiência da hibridização das sequências complementares através da resposta do mediador redox. Hibridização a $45, 50, 55, 60$ e $65 \text{ }^\circ\text{C}$ em 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} $MgCl_2$ durante 30 minutos. SWV em três eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E = 1 \text{ mV}$ em 10 mmol L^{-1} de $K_3Fe(CN)_6$ em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2	68

- Figura 24 – Efeito do tempo de hibridização entre as sequências *probe* e *target* na resposta analítica do genossensor, analisada através da resposta do mediador redox. Hibridização realizada a 50 °C com 1,725 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do *target* em 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} MgCl_2 durante 5, 15 e 30 minutos. SWV em quatro eletrodos ($n = 4$) com os parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 0,01 mol L^{-1} PBS, pH 7,2 70
- Figura 25 – Efeito do tampão na eficiência de hibridização e conseqüentemente, na resposta analítica do genossensor, analisada através da resposta redox do mediador redox. Hibridização realizada a 50 °C com 2,76 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do *target* em diferentes tampões (1x SSC; 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} MgCl_2 ; 10 mmol L^{-1} PBS + 1 mmol L^{-1} MgCl_2) durante 30 minutos. SWV em 3 eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 0,01 mol L^{-1} PBS, pH 7,2. A concentração de Ru (III) foi 4 mmol L^{-1} em PBS 10 mmol L^{-1} . 71
- Figura 26 – Curvas de calibração obtidas a partir do espectro de corrente por concentração, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, das sequências: dsDNA referente à sequência complementar; ncDNA referente à sequência não-complementar e m4DNA referente à sequência com 4 *mismatches*. Hibridização realizada a 50 °C com diferentes concentrações de DNA em 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} MgCl_2 durante 30 minutos. SWV em 3 eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 0,01 mol L^{-1} PBS, pH 7,2 72
- Figura 27 – Resposta voltamétrica para 6,9 e 69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas linhagens celulares SW620 e HT-29 de câncer colorretal. Medidas realizadas com SWV. Parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 0,01 mol L^{-1} PBS, pH 7,2 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estatística mundial para alguns tipos de câncer, GLOBOCAN 2020.	31
Tabela 2 – Biomarcadores de câncer para exames clínicos	36
Tabela 3 – Sequências de DNA para os biossensores	52
Tabela 4 – Atribuição dos números de onda de FTIR aos grupos funcionais das moléculas utilizadas no genossensor	61
Tabela 5 – Parâmetros da equação de Sips para adsorção do Ru III nas sequências complementar e m4DNA	71
Tabela 6 – Limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade do genossensor para as sequências utilizadas	73
Tabela 7 – Resultados dos testes de recuperação para o <i>target</i> em extratos celulares de linhagens de câncer colorretal (SW620 e HT-29)	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
CCR	Câncer colorretal
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
NIH	Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos Estados Unidos
PSA	Antígeno Prostático Específico
AFP	α -fetoproteína
CA125	Antígeno de câncer 125
CA15-3	Antígeno de câncer 15-3
CA19-9	Antígeno de câncer 19-9
CEA	Antígeno Carcinoembrionário
hCG	Gonadotrofina Coriônica humana
CTCs	Células tumorais circulantes
CSCs	Células estaminais cancerígenas
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (Agência regulatória dos Estados Unidos)
Fn	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
TNF	Fatores de necrose tumoral
NK	Células exterminadoras naturais
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
AuNPs	Nanopartículas de ouro
MNPs	Nanopartículas magnéticas

QCM	Microbalança de cristal de quartzo
MB	Azul de metileno
Ru (III)	Cloreto de hexaamino rutênio
WE	Eletrodo de trabalho
RE	Eletrodo de referência
CE	Contra eletrodo
SELEX	Evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial
MPs	carboxi- <i>Dynabeads</i> magnéticas
SPEs	Eletrodos impressos
i	corrente redox
CV	Voltametria cíclica
E_i	Potencial inicial
E_f	Potencial final
E_{pa}	Potencial de oxidação
E_{pc}	Potencial de redução
A	Ampère
n	número de elétrons envolvidos numa reação redox
A_e	Área eletroativa do eletrodo
F	Constante de Faraday
D	Coefficiente de difusão das espécies eletroativas
C	Concentração
v	Velocidade de varredura
R	Constante dos gases
T	Temperatura
SWV	Voltametria de onda quadrada
PBS	Tampão fosfato salino

EDC	1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida
NHS	N-hidroxissuccinimida
SPCEs	Eletrodos impressos de carbono
USP	Universidade de São Paulo
M4	Sequência com 4 bases diferentes da sequência complementar
BLASTn	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local de nucleotídeos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
RSD	Desvio padrão relativo
ssDNA-MPs	Bio-conjugado da sequência 'sonda' imobilizada nas <i>Dynabeads</i>
dsDNA-MPs	Bio-conjugado ssDNA-MPs após incubação com a sequência complementar
S/N	Relação Sinal/Ruído
ncDNA-MPs	Bio-conjugado ssDNA-MPs após incubação com a sequência não complementar
m4DNA-MPs	Bio-conjugado ssDNA-MPs após incubação com a sequência M4

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Letra grega minúscula Alpha
β	Letra grega minúscula Beta
Δ	Letra grega maiúscula Delta
μ	Letra grega minúscula Mu
ν	Letra grega minúscula Nu
ε	Letra grega minúscula Epsilon

SUMÁRIO

1	MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	31
1.1	Motivações para o desenvolvimento de biossensores para câncer	31
1.2	Objetivos	32
1.2.1	Objetivo Geral	32
1.2.2	Objetivos específicos	32
2	INTRODUÇÃO	33
2.1	A descoberta do DNA	33
2.1.1	A importância da descoberta da molécula de DNA	33
2.2	Ciclo celular, câncer e câncer colorretal	34
2.3	Biomarcadores para CCR	35
2.4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	37
2.4.1	<i>F. nucleatum</i> como agente infeccioso	37
2.4.2	Mecanismo de carcinogênese da <i>F. nucleatum</i>	37
2.5	Aspectos gerais dos biossensores	39
2.6	Genossensores eletroquímicos para detecção de câncer	40
2.6.1	Genossensores baseados na utilização de marcadores (<i>labels</i>)	41
2.6.2	Genossensores sem marcadores (<i>label-free</i>)	42
2.6.2.1	Intercaladores	42
2.6.2.2	Eletrostáticos	42
2.7	Eletrodos impressos descartáveis	43
3	FUNDAMENTOS SOBRE GENOSSENSORES ELETROQUÍMICOS	45
3.1	Princípios de Eletroquímica	45
3.1.1	Células eletroquímicas	45
3.1.2	Técnicas eletroquímicas	46
3.1.2.1	Voltametria cíclica	46
3.1.3	Voltametria de onda quadrada	48
3.2	Modelos de adsorção	49
3.2.1	Langmuir	49
3.2.2	Freundlich	50
3.2.3	Langmuir-Freundlich	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Reagentes	51
4.2	Fabricação dos eletrodos pela técnica de <i>screen-printing</i>	51

4.3	Biomarcador para câncer colorretal.	51
4.3.1	Imobilização da sonda	52
4.3.2	Hibridização das sequências de DNA	54
4.4	Medidas eletroquímicas	54
4.4.1	Procedimento de estabilização eletroquímica do eletrodo	54
4.4.2	Medidas voltamétricas	55
4.4.3	Determinação da sequência alvo em amostras biológicas	56
4.5	Caracterização morfológica e espectroscópica	56
4.5.1	Microscopia eletrônica de varredura	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1	Caracterização espectroscópica do DNA e das ssDNA-MPs	57
5.2	Caracterização morfológica do SPCEs e MPs	59
5.3	Caracterização eletroquímica dos SPCEs	62
5.4	Componentes eletroativos	62
5.5	Amplificação do sinal eletroquímico do Ru (III)	64
5.6	Otimização da concentração de MPs	67
5.7	Otimização da temperatura de hibridização	68
5.8	Otimização do tempo para hibridização	69
5.9	Otimização do tampão para hibridização	69
5.10	Curva analítica	70
5.10.1	Detecção do <i>target</i> em amostras biológicas	73
6	CONCLUSÃO	75
6.1	Perspectivas futuras	76
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICES	91
	APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	93

APRESENTAÇÃO

Este projeto de mestrado foi realizado no período de Fev/2018 a Fev/2021, no Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo - USP em parceria com o Hospital de Amor de Barretos/SP. Sua concepção foi norteadada por dois fatores principais, quais sejam: i) necessidade de desenvolver métodos de diagnóstico de doenças com tecnologias simples e de baixo custo; ii) explorar a possibilidade de detecção de material genético de microrganismos para o diagnóstico precoce do câncer colorretal. A dissertação está dividida em 6 capítulos: No **CAPÍTULO 1** é apresentado o desafio do diagnóstico do câncer colorretal, com a motivação para o desenvolvimento de biossensores como ferramentas alternativas de diagnóstico. Uma introdução aos principais tópicos do trabalho é feita no **CAPÍTULO 2**, seguida de uma descrição das técnicas eletroquímicas para detecção e dos modelos de adsorção utilizados para explicar os resultados no **CAPÍTULO 3**. O **CAPÍTULO 4** é dedicado à metodologia, com os protocolos para fabricação dos biossensores e para as medidas de detecção. Os resultados e sua discussão são apresentados no **CAPÍTULO 5**, englobando caracterizações morfológicas, espectroscópicas e eletroquímicas, etapas de otimizações da construção do biossensor e determinação analítica do biomarcador para câncer colorretal. Neste trabalho, o biomarcador utilizado foi uma curta sequência do genoma da bactéria *Fusobacterium nucleatum*. Foram utilizadas amostras sintéticas e de pacientes, estas últimas fornecidas pelo Hospital de Amor de Barretos. O **CAPÍTULO 6** encerra a dissertação com as principais conclusões e as perspectivas para futuras aplicações e aperfeiçoamentos nas metodologias de diagnóstico usando biossensores.

1 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Motivações para o desenvolvimento de biossensores para câncer

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças degenerativas que possuem em comum a característica de crescimento descontrolado e desordenado de células anormais, podendo invadir outros órgãos e tecidos adjacentes. É a segunda enfermidade que mais causa mortes no mundo, superada apenas por doenças cardiovasculares. O câncer colorretal (CCR) é a neoplasia maligna mais comum do trato gastrointestinal, sendo a terceira maior causa de morte por câncer,¹ embora esse seja um dos cânceres mais evitáveis e tratáveis se detectado precocemente.² Só em 2020, o número de mortes por câncer em 2020 foi de aproximadamente 10 milhões e estima-se que até 2040 ocorra um aumento de novos casos e mortes relacionadas ao CCR de mais de 70%.³ As causas do CCR são diversas e incluem: obesidade, sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, má alimentação⁴ e infecções bacterianas.⁵ Em 2018, 13% dos novos casos de câncer diagnosticados foram atribuídos a algum tipo de infecção carcinogênica, incluindo *Helicobacter pylori*, papiloma vírus humano (HPV), vírus da hepatite B e vírus Epstein-Barr,⁶ A Tabela 1 mostra a taxa mundial de incidência e mortalidade para diversos tipos de cânceres em 2020.

Tabela 1 – Estatística mundial para alguns tipos de câncer, GLOBOCAN 2020.

Tipo de Câncer	Incidência (%)	Mortalidade (%)
Pulmão	22,4	18,0
Mama	47,8	13,6
Colorretal	19,5	9,0
Fígado	9,5	8,7
Próstata	30,7	7,7
Estômago	11,1	7,7

Fonte: Adaptada de SUNG *et al.*⁷

Métodos convencionais para detecção de CCR incluem o ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* - ELISA), imunocoloração, sigmoidoscopia, colonoscopia e a técnica *western blot*. Esses métodos apresentam excelente desempenho analítico, mas exigem grandes quantidades de amostras, extensas etapas técnicas e uso de equipamentos sofisticados por especialistas. Alguns são invasivos, com procedimentos incômodos para os pacientes; a colonoscopia, por exemplo, apresenta risco de perfuração do intestino.^{1,8,9} Há, portanto, uma demanda por dispositivos que possibilitem o diagnóstico de maneira rápida e precisa.¹⁰

A limitação dos métodos convencionais serve, portanto, de motivação para o desenvolvimento de metodologias alternativas de diagnóstico, que permitam a detecção do

CCR com procedimentos não invasivos, simples e econômicos. A detecção de biomarcadores utilizando biossensores eletroquímicos é uma alternativa econômica, rápida e fácil, em comparação com os métodos convencionais. Esses biossensores fornecem informações quantitativas utilizando elementos biológicos para o reconhecimento específico dos biomarcadores, acoplados diretamente a elementos transdutores, que convertem eventos biológicos em sinais mensuráveis.¹¹

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver genossensores eletroquímicos (voltamétricos) do tipo *label free* e de baixo custo utilizando sistemas descartáveis para detecção da *F. nucleatum*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Fabricar eletrodos impressos (do inglês *screen-printed electrodes* - SPEs) descartáveis;
- Caracterizar morfológica e eletroquimicamente a superfície dos eletrodos;
- Otimizar as etapas de imobilização da sequência de captura na superfície de MPs utilizando DNA sintético;
- Caracterizar e otimizar as etapas de hibridização entre a sequência de captura e alvo;
- Construir biossensores com parâmetros analíticos otimizados para detectar sequências de DNA bacterianas.

2 INTRODUÇÃO

2.1 A descoberta do DNA

O ano de 1869 marcou o início da pesquisa genética, quando o bioquímico suíço Johann Friedrich Miescher identificou o que ele nomeou de 'nucleína', pois acreditava-se que essa molécula era originária do núcleo celular de leucócitos (componentes do sistema imunológico). Mas somente 75 anos depois da sua descoberta, com a publicação em 1944 do artigo de Avery, MacLeod e McCarty, a molécula de DNA obteve a importância merecida. No artigo sugerem que o DNA é o portador de toda informação genética, e não as proteínas¹² como se acreditava na época. No fim da década de 1940, Chargaff *et al.* descobriram que a composição do DNA varia entre diferentes espécies, mas para a mesma espécie as bases nitrogenadas têm proporções fixas: a mesma quantidade de adenina e timina, assim como de guanina e citosina.^{13,14} Um ano depois confirmou-se que o DNA continha toda a informação genética necessária para organismos se desenvolverem e reproduzirem.¹⁵ Em 1953, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins, Francis Crick e James Watson propuseram o modelo de dupla-hélice para a estrutura do DNA com base em dados de difração de Raios X.¹⁶ Quase 10 anos depois da elucidação da estrutura do DNA, Eley e Spivey sugeriram que o DNA teria capacidade de conduzir corrente elétrica, e no ano seguinte Eley e Leslie propuseram que a condução de corrente é devida à sobreposição dos elétrons- π dos pares de bases guanina-citosina e adenina-timina.¹⁷ A partir de então, o DNA passou a ser explorado em diferentes áreas de pesquisa com o desenvolvimento da biotecnologia, engenharia genética e clonagem. São hoje obtidos produtos transgênicos, há uso terapêutico de células-tronco e vacinas baseadas em RNA mensageiro (mRNA) para combater a Covid-19, graças à sua descoberta. Pouco se discute a respeito, mas os experimentos de Miescher revolucionaram o mundo moderno.

2.1.1 A importância da descoberta da molécula de DNA

A impressão digital genética (do inglês *genetic fingerprint*) é uma característica intrínseca do DNA, que permite diferenciar indivíduos, ainda que sejam de uma mesma família. Foi possível aplicar esse 'perfil do DNA' em áreas diversas. Exemplos são as investigações criminais, comparando os perfis de suspeitos com as evidências de DNA detectadas nas cenas dos crimes, ferramenta para avaliar a probabilidade do envolvimento no crime,¹⁹ testes de paternidade²⁰ e em biossensores. Como foco dessa dissertação está a detecção de patógenos (vírus e bactérias) em alimentos e em amostras de pacientes²¹⁻²³ onde se empregam pequenas sequências de DNA em biossensores como ferramenta para diagnóstico clínico de doenças. Existem diversas outras aplicações que fogem ao escopo deste trabalho e, portanto, não serão mencionadas.

2.2 Ciclo celular, câncer e câncer colorretal

Diversas doenças humanas são provocadas por deficiências genéticas, isto é, alterações na sequência de nucleotídeos que compõem o genoma do indivíduo. Por consequência, a estrutura de proteínas é alterada, ocasionando anomalias anatômicas e fisiológicas. Dentre as doenças genéticas estão o albinismo, daltonismo, síndrome de Down, transtorno do espectro autista e diversos tipos de câncer.^{24,25} Esses erros genéticos, para o câncer em específico, ocorrem durante a etapa de divisão celular conhecida como mitose. Diariamente, milhões de células passam pela divisão celular, seja para suportar o crescimento de tecidos ou repor células danificadas. Para garantir a fidelidade e estabilidade genômica das células filhas, mecanismos de proteção foram desenvolvidos em diferentes etapas do ciclo celular.^{26,27} Ciclo celular é o nome dado a uma série de eventos que ocorrem em uma célula conforme ela cresce e se divide. Esse ciclo é dividido em duas etapas, a interfase e a mitose. A célula passa a maior parte do tempo na interfase, onde ela cresce, replica seu material genético e se prepara para a divisão celular. A interfase é dividida em quatro estágios, representados na Figura 1.²⁸

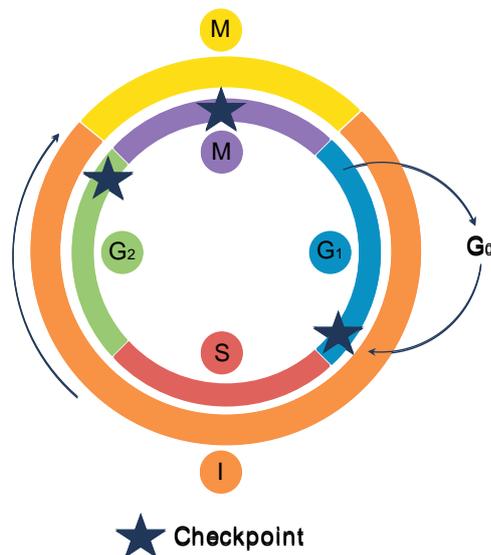


Figura 1 – Esquematização do ciclo celular de células somáticas. (I) representa a etapa da interfase. (M) se refere à etapa mitótica

Fonte: Adaptada de SAPKOTA.²⁸

- *G0* ou Repouso
É uma fase complementar a *G1*, quando a célula não recebe estímulos para a divisão;

costuma-se dizer que a célula está em estado quiescente e, portanto, se concentra em exercer suas funções vitais

- *G1* (GAP)

Nesse estágio, a célula cresce devido a estímulos para divisão, e inicia a síntese de RNAs e proteínas, desse modo se preparando para a replicação do DNA

- *S* (Síntese do DNA)

É nesse estágio que todo o DNA do núcleo é replicado

- *G2*

Com a separação dos centríolos no último estágio da Interfase, a célula se prepara para a divisão celular

Este processo inclui mecanismo para garantir que os erros durante a divisão celular, principalmente os danos ao DNA, sejam reparados. Em caso contrário, as células entram em um processo de morte celular programada, chamada de apoptose. A checagem de erros ocorre em chamados "*Checkpoints*" e, cada estágio da interfase e da mitose possuem *checkpoints* específicos. Mutações que causam o mau funcionamento ou ausência de proteínas regulatórias (nome dado às proteínas responsáveis pela identificação e correção dos danos no DNA) podem resultar na divisão celular sem controle. Tanto o ciclo celular quanto a apoptose são processos que ocorrem naturalmente em todas as células do corpo, sendo importantes para o equilíbrio e a manutenção da vida. Alterações em algum desses dois processos podem causar diversas doenças graves, uma delas é o câncer, como já citado.

2.3 Biomarcadores para CCR

De acordo com o Instituto Nacional de Saúde (agência governamental norte-americana, NIH), um biomarcador é "qualquer substância ou molécula biológica, que possa ser encontrada no sangue, outros fluidos corporais (plasma sanguíneo, suor, saliva, urina, fezes) e/ou tecidos, que possam ser precisamente detectados e medidos e, que sejam indicativos de processos biológicos normais ou anormais, de alguma condição ou doença. A presença e/ou diferença na concentração de biomarcadores tipicamente diferenciam um paciente portador de alguma patologia de pessoas saudáveis".²⁹ A Tabela 2 apresenta alguns biomarcadores para o câncer, e os testes clínicos para sua detecção.³⁰

Biomarcadores para o CCR, incluindo proteínas, DNA, RNA e moléculas derivadas de tumores, têm sido investigados principalmente em sangue e fezes.³¹ Alguns testes aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos utilizam enzimas hepáticas³² e marcadores tumorais (CEA e CA19-9). Porém, esses testes não são conclusivos; caso o resultado seja anormal, é necessário realizar outros exames, como a colonoscopia para o diagnóstico preciso. Concentrações altas de marcadores proteicos, como o CEA e CA19-9,

Tabela 2 – Biomarcadores de câncer para exames clínicos

Biomarcador	Tumor	Tipo de amostra/ Método de detecção
Antígeno Prostático Específico (PSA)	câncer de próstata	Soro sanguíneo/ Imunoensaio
α -fetoproteína (AFP)	Carcinomas hepáticos	Soro sanguíneo/ Imunoensaio
Antígeno de câncer 125 (CA125)	Câncer de ovário, tubas uterinas	Soro sanguíneo/ Imunoensaio
Antígeno de câncer 15-3 (CA15-3)	Câncer de mama	Soro sanguíneo, Linfonodos, Medula óssea/ ELISA, imunohistoquímica
Antígeno de câncer 19-9 (CA19-9)	Câncer de pâncreas, bexiga	Soro sanguíneo e urina/ ELISA
BRCA-1, BRCA-2 (genes) *	Câncer de mama	RT-PCR
Antígeno Carcinoembrionário (CEA)	Câncer colorretal	Soro sanguíneo/ ELISA
Gonadotrofina Coriônica humana (hCG) *	Câncer de células germinativas (ovário e testículo)	Soro sanguíneo/ ELISA
Fator de crescimento transformante $-\beta$	Tumores malignos	Soro sanguíneo/ ELISA
Células tumorais circulantes (CTCs)	Câncer de mama metastático, etc	Sangue/ Imunocitometria
Células estaminais cancerígenas (CSCs) **	Leucemia mielogênica aguda, melanoma, tumor cerebral, câncer e mama e próstata	Amostras de tecido/ Imunocitometria

Aplicação dos biomarcadores: * Diagnóstico; ** diagnóstico, prognóstico e terapêutico. Todos os outros biomarcadores são aplicados tanto ao diagnóstico quanto ao prognóstico das doenças associadas. RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Fonte: Adaptada de BHATT *et al.*³⁰

podem ser indicativos de CCR,³³ mas também de outros tipos de câncer e transtornos benignos. Isso impossibilita seu uso para o diagnóstico do CCR, sendo mais empregados no prognóstico.³⁴ Pode-se também detectar CCR a partir de alterações genéticas e epigenéticas, como mutações nos genes APC, p53, TGFBR, PIK3CA e metilações nos genes MLH1 e MSH2.³⁵ Estudos recentes mostram que, para o CCR em particular, a microbiota intestinal está relacionada com seu desenvolvimento, progressão e resposta ao tratamento quimioterápico,^{36,37} sendo a *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) prevalente em tecidos de CCR.⁵

2.4 *Fusobacterium nucleatum*

Apesar da enorme diversidade de bactérias, grande parte dos pesquisadores tem focado suas pesquisas em poucas linhagens, como as proteobactérias. Isso se deve a sua enorme importância para áreas médicas e tecnológicas, como agricultura. Há, entretanto, necessidade de expandir esses estudos pela diversidade de organismos e seu papel patogênico. O filo *Fusobacteria* é um exemplo de um táxon pouco estudado. Esse filo é dividido em duas famílias: a *Leptotrichiaceae* e o *Fusobacteriaceae*. Essas bactérias são gram-negativas, não esporulantes, anaeróbicas e em formato de haste, possuindo habilidades metabólicas únicas.³⁸ Nesse filo encontram-se espécies prevalentes no intestino (*Leptotrichia spp.*) e no trato urogenital de humanos (*Sneathia spp.*), além da mucosa oral de humanos e animais como macacos, ratos, cavalos e crocodilos. A presença desses organismos em tecidos saudáveis sugere que são constituintes naturais desses tecidos. Contudo, esses microrganismos têm sido isolados em amostras clínicas de outros tecidos doentes, sendo portanto considerados como patógenos oportunistas.^{39–41} Dentre as espécies capazes de colonizar humanos, a *F. nucleatum* é associada a doenças orais e extra-orais.

2.4.1 *F. nucleatum* como agente infeccioso

Apesar de a *F. nucleatum* possuir um relacionamento mutualístico com outras bactérias da microbiota oral, sua interação com tecidos humanos, seja oral ou extra-oral, vai de neutra a patogênica. Em doenças orais, como a periodontite, essa bactéria modula a resposta imune do paciente, aumentando a infectividade de outros microrganismos. Mais especificamente, a *F. nucleatum* induz a expressão dos peptídeos antimicrobiais β -defensina e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8), no epitélio oral.^{42,43} O papel desse organismo em infecções extra-orais é desconhecido, mas essa bactéria já foi isolada de amostras clínicas em várias doenças, incluindo apendicite, abscessos encefálicos, osteomielite, pericardite, corioamnionite e câncer.⁴⁴ Acredita-se que essa bactéria seja originária da cavidade oral e alcance outras regiões através do sistema circulatório.⁴⁵ A Figura 2 apresenta as principais infecções associadas com a *F. nucleatum*.

2.4.2 Mecanismo de carcinogênese da *F. nucleatum*

O conhecimento do papel de microrganismos em doenças como o câncer não é novo. Bactérias, vírus e parasitas são associados com o câncer. Por exemplo, o papilomavírus humano causa mutações e câncer de colo de útero em mulheres, e a ilha da patogenicidade *cag* da *Helicobacter pylori* gera um microambiente favorável para o desenvolvimento de tumores em neoplasias gástricas.⁴⁶ São vários os mecanismos de tumorigênese da *F. nucleatum*, muitos dos quais permanecem desconhecidos. A Figura 3 apresenta os mecanismos mais bem compreendidos para esse microrganismo. De maneira simples, o câncer pode ser considerado como um crescimento desordenado de células somáticas e a *F.*

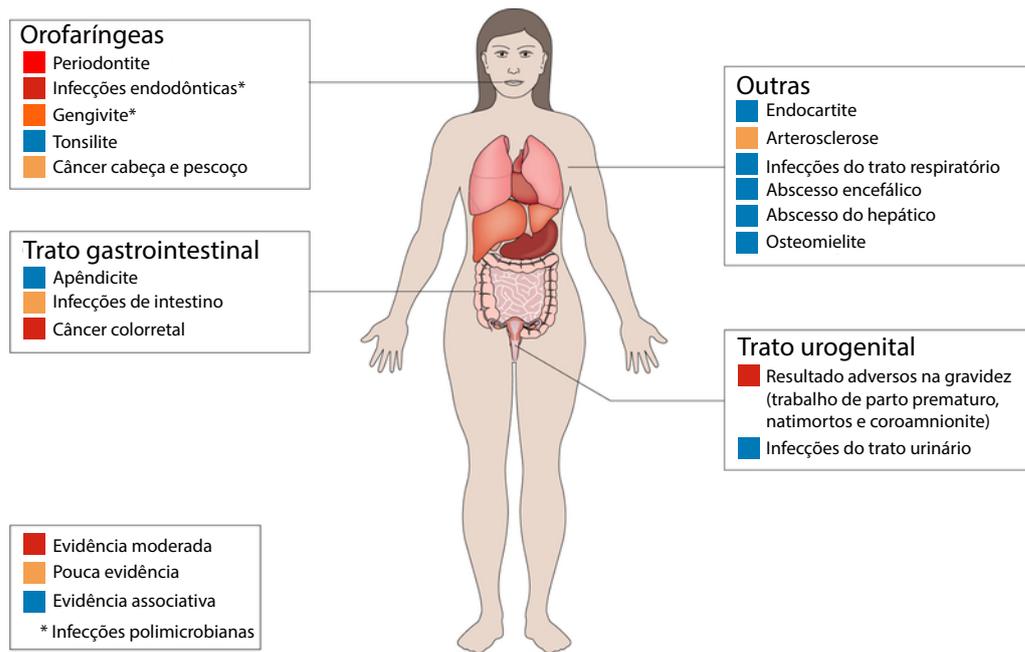


Figura 2 – Doenças orais e extra orais associadas com a *Fusobacterium nucleatum* em humanos

Fonte: Adaptada de BRENNAN; GARRETT.⁴⁴

nucleatum influencia nessa proliferação através da ativação da via Wnt, uma importante via de proliferação celular que muitas vezes encontra-se desregulada no câncer. A *FadA*, uma proteína da membrana externa da *F. nucleatum*, interage com *E*-caderina na membrana de células saudáveis, levando à ativação da β -catenina e ao aumento da expressão dos genes Wnt. Além disso, a ativação do receptor TLR4 por lipopolissacarídeos aumenta a produção de onco-microRNAs, como o miR21, e induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, interleucina-1 β e fatores de necrose tumoral (TNF). Isso cria um ambiente que acelera a progressão de tumores. Um terceiro mecanismo pelo qual a *F. nucleatum* modifica o microambiente local se dá pela evasão das respostas imunes anti-tumorais. A proteína *Fap2*, a mesma adesina que promove adesão e reconhecimento de células de colon pela *F. nucleatum*, reconhece o receptor humano chamado TIGIT, que é expresso na membrana de células exterminadoras naturais (NK) e outros linfócitos. Quando ativado, esse receptor inibe a função citotóxica dessas células e protege tanto a bactéria quanto as células tumorais adjacentes do sistema imune. Além disso, quando o CCR já foi identificado e tratado, a presença da *F. nucleatum* está relacionada com o desenvolvimento de quimiorresistência por pacientes, devido à supressão de microRNAs no processo de autofagia.⁴⁴

Devido à possibilidade de análise da *F. nucleatum* em amostras de fezes para o diagnóstico precoce e monitoramento do CCR de maneira não invasiva e indolor, é

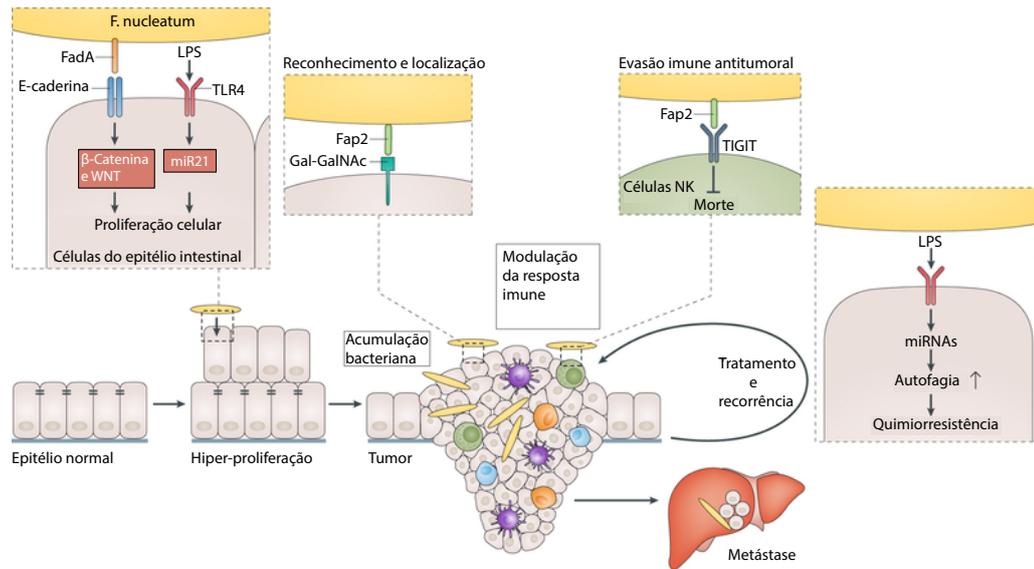


Figura 3 – Mecanismos pelos quais a *Fusobacterium nucleatum* contribui para a carcinogênese do CCR

Fonte: Adaptada de BRENNAN; GARRETT.⁴⁴

necessário estabelecer metodologias para sua detecção. Algumas metodologias já vêm sendo utilizadas para detecção dessa bactéria,⁴⁷ que geralmente envolvem a reação em cadeia da polimerase quantitativa (do inglês *quantitative polymerase chain reaction* - qPCR).^{48–50} Não há relatos do uso de sistemas mais simples, econômicos e rápidos, como os biossensores, para detecção da *F. nucleatum*. Sabe-se, porém, que estes dispositivos podem detectar bactérias, como ilustrado por Zhang, Huarng e Alocilja da Universidade de Michigan que construíram um biossensor para *Salmonella enterica*. Eles funcionalizaram nanopartículas de ouro (AuNPs) e magnéticas (MNPs) com sequências de DNA modificadas com grupos tióis, e obtiveram limite de detecção de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$.⁵¹

2.5 Aspectos gerais dos biossensores

Avanços tecnológicos permitiram desenvolver técnicas para monitorar eventos de interação entre biomoléculas tanto em solução como em substratos sólidos. Foram criados dispositivos capazes de transformar essa energia de interação entre biomoléculas em sinais mensuráveis, como as plataformas biossensores. Diferentemente de um sensor comum, um biossensor depende do bio-reconhecimento altamente seletivo e específico entre biomoléculas (por exemplo de uma sonda, do inglês *probe*) para detectar a substância de interesse (analito alvo, do inglês *target*). Por isso, os componentes básicos de um biossensor consistem em: camada de reconhecimento molecular, composta de enzimas, anticorpos, antígenos, oligonucleotídeos, células, organismos e/ou organelas, conectados a um transdutor de sinal acústico, calorimétrico, eletroquímico, óptico ou piezoelétrico,⁵² um

sistema de amplificação e um processador de sinal, que produzirá os resultados analisados por um software. A Figura 4 apresenta a estrutura básica de um biossensor.

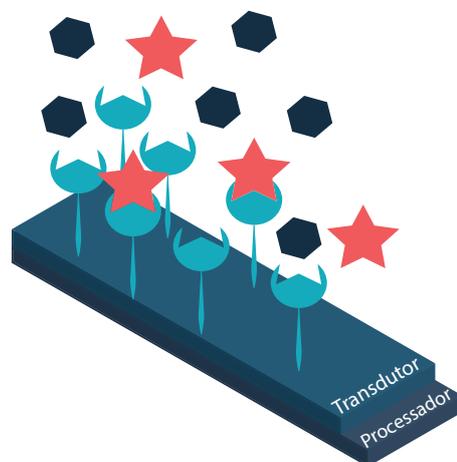


Figura 4 – Princípio de funcionamento e componentes estruturais básicos de um biossensor

Fonte: Elaborada pelo autor

O principal evento de sensoriamento é a formação do complexo sonda-alvo para que a interação gere um sinal preciso e reprodutível. Esse sinal pode ser detectado através de diferentes metodologias. Podem ser fabricados biossensores que funcionam com transdutores ópticos utilizando mudanças em propriedades da amostra produzidas por fenômenos ópticos, como absorção, fluorescência e índice de refração.⁵³ Há transdutores piezoelétricos capazes de detectar mudanças de massas na camada de reconhecimento molecular após a formação do complexo *probe-target*, utilizando microbalança de cristal de quartzo (do inglês *quartz crystal microbalance*, QCM)⁵⁴ ou cantilevers microfabricados.⁵⁵ Em transdutores térmicos, as mudanças na temperatura promovidas pela absorção de espécies no componente biológico são registradas e relacionadas com a entalpia e a quantidade de reagentes e produtos.⁵⁶ Os transdutores eletroquímicos relacionam a concentração de analito em solução com um sinal elétrico, gerado a partir da reação de oxidação/redução da espécie eletroativa na superfície do eletrodo. Essa última metodologia de detecção tem se provado eficiente para biossensores de DNA. Isso é devido à reação de redução/oxidação direta ou catalisada das bases, na seguinte ordem: guanina, adenina, citosina e timina, assim como de moléculas repórteres (ou *labels*), refletir a quantidade de DNA capturada.¹⁰

2.6 Genossensores eletroquímicos para detecção de câncer

Entre as diferentes formas para detectar biomarcadores, os biossensores eletroquímicos de DNA, também conhecidos como genossensores eletroquímicos, são considerados dos mais eficientes.⁵⁷ Esses dispositivos são capazes de detectar pequenas sequências de

oligonucleotídeos em baixíssimas concentrações, até atomolar ($10^{-18} \text{ mol L}^{-1}$), sem necessidade de amplificação por PCR, uma das maiores vantagens desse tipo de biossensor.⁵⁸ Nos genossensores, a camada de biorreconhecimento é composta por pequenas sequências de DNA capazes de interagir com o analito (*target*) via pareamento dos pares de bases. Existem duas estratégias para detectar o analito: genossensores sem marcadores (*label-free*) que não necessitam de marcadores eletroquímicos, radioativos e/ou óticos, e genossensores que empregam marcadores óticos e/ou eletroquímicos na detecção.

2.6.1 Genossensores baseados na utilização de marcadores (*labels*)

Devido à dificuldade de detecção de analitos biológicos baseados puramente em suas propriedades físico-químicas, biossensores frequentemente necessitam de marcadores, sejam eles enzimas,⁵⁹ marcadores fluorescentes⁶⁰ e/ou moléculas redox,⁶¹ interagindo com o *target*. Como resultado, o sinal medido corresponde à quantidade de moléculas do *label* ligadas às moléculas do *target*, representando a quantidade da última. Uma das principais desvantagens desse tipo de estratégia é o aumento do tempo para detecção e o aumento do custo, devido às etapas adicionais. Além disso, fazer a marcação com *labels* pode bloquear o sítio ativo de enzimas, interferindo na afinidade dos elementos de reconhecimento pelas moléculas alvo. Por exemplo, alguns genossensores utilizam uma estratégia de detecção do tipo sanduíche, onde uma sequência primária é responsável por capturar o analito da amostra (sequência complementar), enquanto uma terceira sequência de DNA (chamada de sequência de sinalização), marcada com um fluoróforo, é utilizada para detectar o analito. A Figura 5 apresenta as principais diferenças entre a estratégia de detecção de sensores que utilizam marcadores (*labels*) e sensores sem marcadores *label-free*.

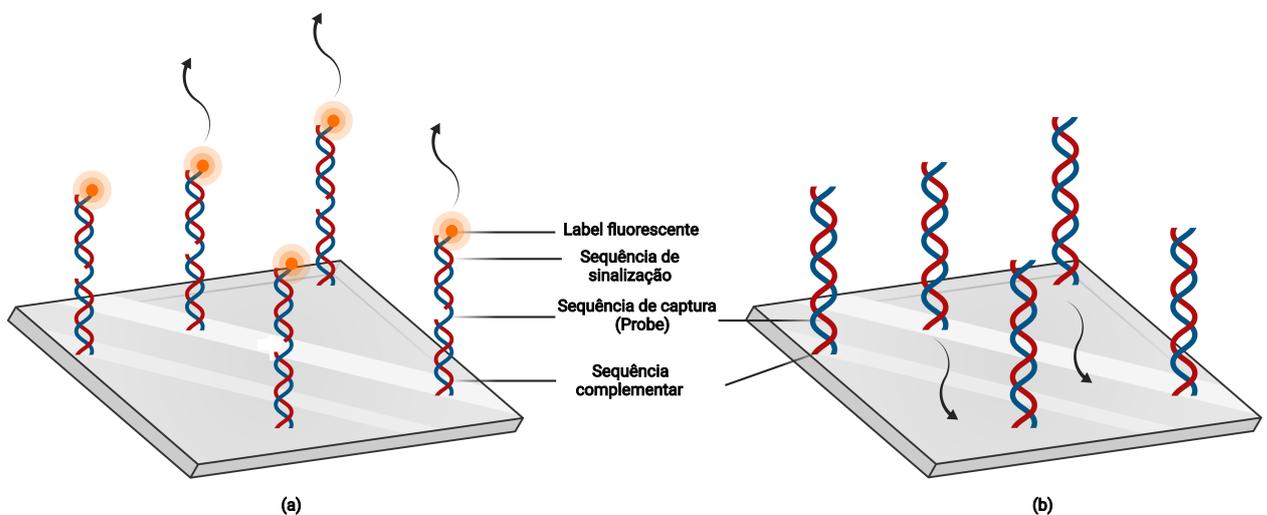


Figura 5 – Comparação entre as diferentes estratégias (a) com e (b) sem (*label-free*) marcadores para detectar analitos.

Fonte: Adaptada de CANDIANI *et al.*⁶²

2.6.2 Genossensores sem marcadores (*label-free*)

Genossensores do tipo *label-free* não necessitam de marcadores para a quantificação do analito. Ao invés disso, usam propriedades físicas intrínsecas dos analitos, tais como massa molecular, tamanho, carga, impedância elétrica ou índice de refração para detetar sua presença em amostras. Esse tipo de estratégia teve muitos avanços devido à sua capacidade de detecção rápida e de baixo-custo, utilizando pouco volume de amostra. Algumas estratégias *label-free* utilizam os chamados mediadores redox, pequenas moléculas eletroativas com algum tipo de afinidade pela camada de reconhecimento, para determinar a presença do analito. Dentre os mediadores redox que não formam ligações covalentes com moléculas de DNA, existem dois tipos que valem a pena destacar: Intercaladores e Eletrostáticos.

2.6.2.1 Intercaladores

Essas moléculas possuem regiões planares e aromáticas capazes de se inserir entre os planos dos pares de bases consecutivos do duplex de DNA. Esse tipo de interação só é possível devido ao empilhamento- π (do inglês, *π -stacking*) entre os anéis aromáticos das bases com a região aromática da molécula, permitindo a passagem de corrente elétrica pela dupla-hélice de DNA.⁶³ Esse tipo de moléculas apresenta comportamentos eletroquímicos distintos para fita simples e dupla, pois necessitam das interações de empilhamento- π dos pares de bases para conseguirem interagir com o DNA. A interação dos mediadores redox do tipo intercalador é mínima com a fita simples.⁶⁴ Os intercaladores de DNA mais conhecidos são azul de metileno (MB), brometo de etídeo, doxorubicina, daunomicina, etc. A Figura 6 apresenta a (a) estrutura química do azul de metileno e (b) a forma de interação com a dupla-hélice de DNA, sinalizando a hibridização.

2.6.2.2 Eletrostáticos

Uma nova classe de mediadores redox que vêm sendo empregados na detecção de DNA são os eletrostáticos. Eles não possuem afinidade pelo DNA e se ligam de modo não específico, através de interações eletrostáticas com o esqueleto de fosfato. Um exemplo é o cloreto de hexaamino rutênio (Ru (III)), que atua como um 'sinalizador' em experimentos para indicar a hibridização. Nesse tipo de estratégia, o DNA atua como suporte para levar as moléculas do mediador redox diretamente em contato com a superfície do eletrodo, mas não participa diretamente da transferência de elétrons. Dessa forma, quanto maior a quantidade de DNA na superfície do eletrodo, seja em fitas simples ou dupla-hélice, mais moléculas de Ru (III) estarão próximas da superfície e maior será o sinal elétrico gerado pela sua redução. A Figura 7 apresenta a (a) estrutura do cloreto de hexaamino rutênio e (b) a forma de interação com a dupla-hélice de DNA para detecção em experimentos de eletroquímica.^{65,66}

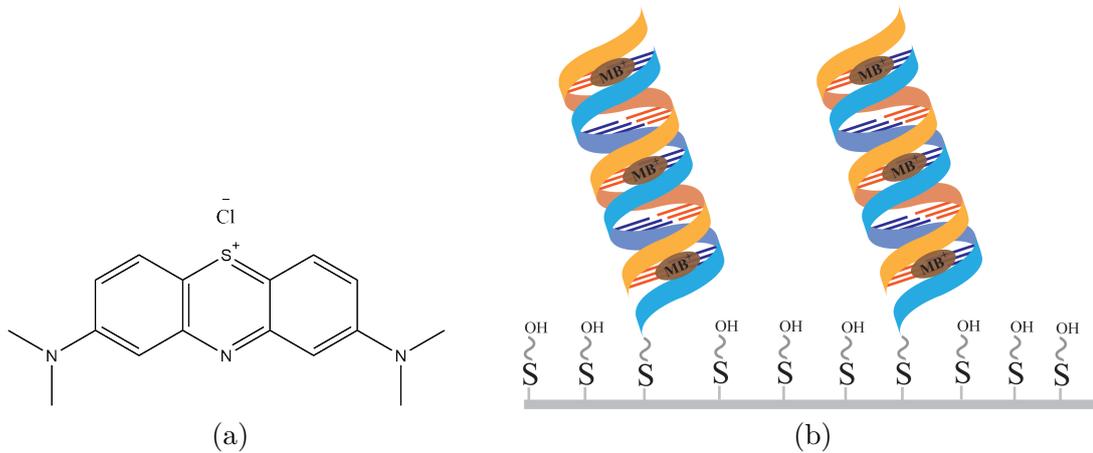


Figura 6 – (a) Estrutura química do intercalador azul de metileno (MB) e (b) mecanismo de interação do intercalador com as sequências de DNA

Fonte: Elaborada pelo autor

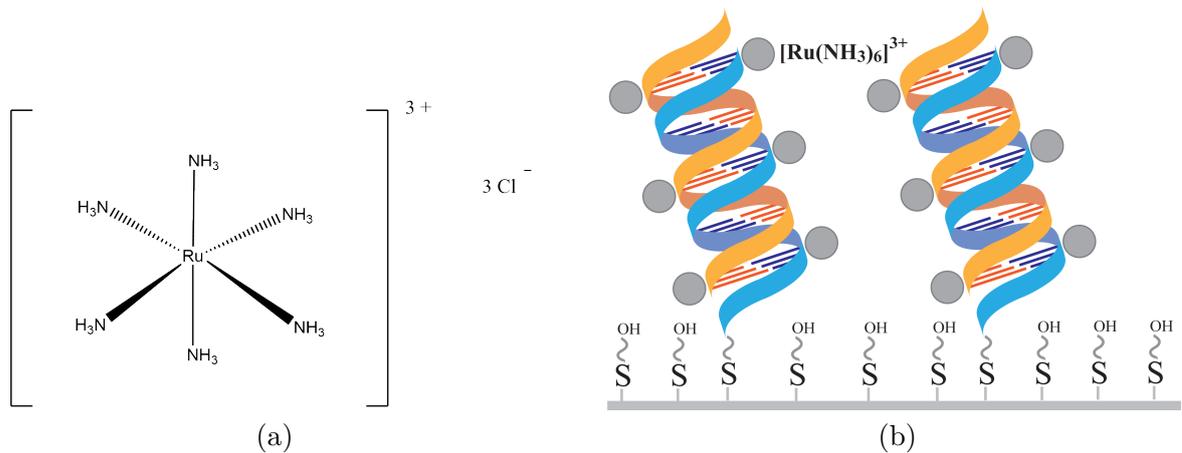


Figura 7 – (a) Estrutura química do mediador redox cloreto de hexaamino rutênio (Ru (III)) e (b) mecanismo de interação do mediador redox com as sequências de DNA

Fonte: Elaborada pelo autor

2.7 Eletrodos impressos descartáveis

A maioria dos eletrodos utilizados em biossensores é fabricada empregando-se técnicas tais como fotolitografia, impressão 3D e deposição química em fase de vapor, que requerem equipamentos e condições de trabalho especiais. A detecção de biomarcadores de câncer pode ser feita com eletrodos descartáveis de baixo custo.^{67,68} Estes dispositivos são produzidos sobre diversos tipos de substratos utilizando-se diferentes técnicas de fabricação, dentre as quais se destaca a impressão por serigrafia (do inglês *screen-printing*).

Essa técnica possui vantagens, tais como baixo custo, capacidade de produção em larga escala, facilidade de modificação da superfície do eletrodo para imobilização de sondas e reprodutibilidade. Além disso, pode ser usada para sistemas portáteis, descartáveis e miniaturizados. Eletrodos impressos são fabricados a partir da impressão de tintas condutoras na superfície de um substrato utilizando um molde, geralmente fabricado com um tecido ultrafino de poliéster recoberto com uma resina fotossensível. A tinta, que toma a forma do molde vazado, é posteriormente curada com tratamento térmico. Este procedimento pode ser realizado manualmente ou com impressoras automáticas ou semiautomáticas, que permitem obter dispositivos com excelente resolução de impressão e reprodutibilidade. Os eletrodos impressos podem também ser fabricados a partir de procedimentos mais simples e econômicos e sem impressoras. Afonso *et al.* utilizaram uma impressora de corte para fabricar os moldes de impressão,⁶⁹ como também o fizeram Uliana *et al.* para fabricar um dispositivo microfluídico descartável na detecção do biomarcador de câncer de mama ER α . A impressora de corte foi empregada na fabricação do canal microfluídico, resultando em um dispositivo descartável com custo de fabricação de US\$ 0,20, que permitiu detectar o biomarcador com limite de detecção de 10 $fg mL^{-1}$.⁷⁰ Uma das grandes vantagens dos eletrodos impressos está na facilidade da modificação da sua superfície com materiais como nanopartículas metálicas (Au, Pt, Ag, Pd e/ou outros),⁷¹ grafeno,⁷² óxido de grafeno,⁷³ nanotubos de carbono.⁷⁴ Essa funcionalização permite aumentar a área eletroativa e/ou melhorar propriedades catalíticas. A versatilidade dos eletrodos impressos e as modificações químicas são responsáveis pela sensibilidade e seletividade do biossensor.⁷⁵

Neste projeto, foram desenvolvidos biossensores eletroquímicos descartáveis e de baixo custo utilizando eletrodos de carbono impressos para detectar sequências específicas de DNA da bactéria *F. nucleatum*. A plataforma consiste de oligonucleotídeos imobilizados via grupos aminas na superfície de carboxi-*Dynabeads* magnéticas (MPs, micropartículas magnéticas) para a pré-concentração da amostra, redução dos interferentes na superfície do eletrodo e amplificação do sinal analítico.⁷⁶

3 FUNDAMENTOS SOBRE GENOSENSORES ELETROQUÍMICOS

Genossensores possuem uma configuração em que cadeias simples de DNA (do inglês *single-strand DNA*, ssDNA) são imobilizadas na superfície de eletrodos e nanomateriais. A estrutura uniforme do DNA permite que a montagem da região de biorreconhecimento seja simples. Para prevenir a adsorção inespecífica de outras espécies, pequenas moléculas, chamadas de espaçadores (moléculas utilizadas para dar mais liberdade para a sequência de DNA, resolvendo o problema do impedimento estérico entre moléculas próximas e também bloquear sítios ativos livres.), são geralmente co-imobilizadas. A captura do *target* ocorre na interface, e o desempenho do biossensor depende de se manter a afinidade inerente pela sequência complementar do DNA (do inglês *complementary DNA*, cDNA).¹⁰

3.1 Princípios de Eletroquímica

3.1.1 Células eletroquímicas

As medidas eletroquímicas são normalmente realizadas em um sistema composto por três eletrodos, um eletrodo de trabalho (WE) onde ocorre a reação de oxirredução, um eletrodo de referência (RE), que possui um potencial (E) conhecido, e um contra-eleto (CE). A célula eletroquímica pode ser modelada como um circuito elétrico equivalente, apresentado na Figura 8. Os eletrodos são imersos em solução para a realização das medidas. O potencial é aplicado entre o RE e o WE, o RE possui alta impedância para impedir o fluxo de corrente para manter o potencial aplicado constante. A corrente redox (i) é medida entre o CE e o WE.⁷⁷

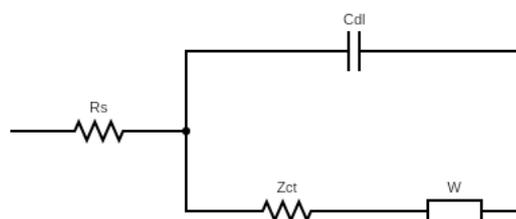


Figura 8 – Circuito equivalente para uma célula eletroquímica de 3 eletrodos - circuito equivalente de Randles

Fonte: Elaborada pelo autor

onde C_{dl} representa a capacitância da dupla-camada elétrica, formada pelo acúmulo de moléculas de solvente e de íons de carga oposta à superfície do eletrodo, na sua interface. Z_{ct} se refere à impedância da transferência de carga da reação redox para o eletrodo, W

representa a impedância de Warburg, que surge devido à difusão da molécula eletroativa do *bulk* da solução para a interface e R_s é a resistência da solução, determinada pela força iônica da solução e a geometria da célula.⁷⁸

3.1.2 Técnicas eletroquímicas

Cada técnica utilizada neste trabalho será descrita nesta seção, e as aplicações serão apresentadas no Capítulo 5. As técnicas eletroquímicas podem ser divididas em condutométricas, com medida das diferenças nas propriedades condutivas dos eletrodos; potenciométricas, onde o potencial entre dois eletrodos é medido; impedimétricas, que medem a impedância (ambas resistência e reatância) e amperométricas/voltamétricas, nas quais a corrente que flui entre os eletrodos é medida.

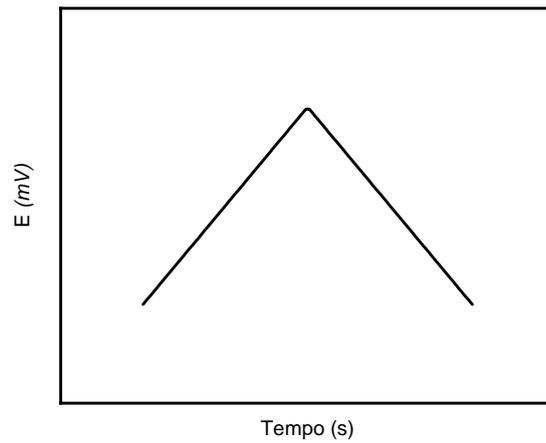
3.1.2.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (do inglês *Cyclic voltammetry*, CV) é utilizada para a caracterização eletroquímica do comportamento de analitos eletroativos. É uma técnica de varredura na qual o potencial é varrido linearmente entre dois valores, o potencial inicial (E_i) e o potencial final (E_f).⁷⁷ Suponha que a varredura de potencial inicie em potenciais negativos, onde somente correntes não-faradaicas, de carga ou descarga da capacitância da dupla camada elétrica, fluirão. Quando o potencial aumenta e se aproxima do potencial de oxidação (E_{pa}) da espécie eletroativa, a corrente faradaica começará a fluir. Conforme o potencial continue a ficar mais positivo, a concentração da espécie eletroativa diminui e também a corrente faradaica. Assim, ao passar pelo E_{pa} a taxa de transferência de massas do analito atingirá um valor máximo para regenerar as espécies oxidáveis na superfície do eletrodo. Quando o potencial começar a varrer em direção a potenciais negativos, a espécie reduzida começará a oxidar em valores próximos ao potencial de redução (E_{pc}). Em processos de transferência de elétrons, o eletrodo pode atuar como doador, no caso de redução ou como aceptor, no caso de oxidação das espécies. A Figura 9 ilustra a modulação do potencial durante a voltametria cíclica.

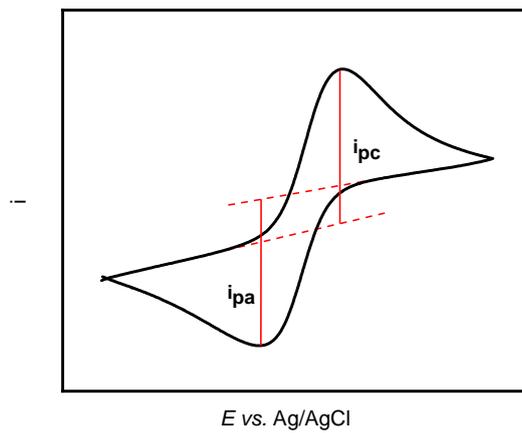
A voltametria cíclica também pode ser utilizada para determinar a área eletroativa do eletrodo através da Equação 3.1, que descreve a influência da velocidade de varredura na corrente de pico gerada pela reação redox para processos controlados por difusão.

$$i_p = 0,4463 \ nFA_eC\left(\frac{nF\nu D}{RT}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (3.1)$$

- i_p = corrente de pico em ampères (A)
- n = número de elétrons envolvidos na reação
- A_e = área eletroativa do eletrodo (cm^2)



(a)



(b)

Figura 9 – (a) Modulação do potencial e (b) voltamograma da técnica de voltametria cíclica

Fonte: Elaborada pelo autor

- F = constante de Faraday ($C \text{ mol}^{-1}$)
- D = coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
- C = concentração (mol cm^{-3})
- ν = velocidade de varredura $V \text{ s}^{-1}$
- R = constante dos gases ($J \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
- T = temperatura (K)

Também é possível estudar a reversibilidade de um sistema, quando a reação acontece em ambos os sentidos da varredura do potencial. Um sistema reversível tem que satisfazer os seguintes requisitos:⁷⁹

- I_p proporcional a $v^{\frac{1}{2}}$
- $E_{pa} - E_{pc} = \frac{59}{n} mV$
- $\left| \frac{I_{pa}}{I_{pc}} \right| = 1$

No sistema reversível é possível determinar o número de elétrons transferidos na reação eletroquímica do ou para o eletrodo. No caso de sistemas irreversíveis, quando o sentido da varredura é invertido, o pico de corrente não aparece no voltamograma.⁷⁹

3.1.3 Voltametria de onda quadrada

Técnicas voltamétricas englobam um grande grupo de técnicas eletroquímicas, onde processos não espontâneos de transferência de cargas (elétrons ou íons) são induzidos por potenciais elétricos externos aplicados ao sistema. Com técnicas voltamétricas geralmente se caracterizam as espécies eletroativas e determina-se um analito de interesse. A voltametria de onda quadrada (do inglês *Square-wave voltammetry*, SWV) é versátil e reduz o efeito da corrente não-faradaica (de carga e/ou descarga da dupla camada elétrica), melhorando a sensibilidade das medidas.⁸⁰ Na SWV o potencial é varrido como uma escada de potencial combinado com pequenos pulsos, como mostrado na Figura 10.

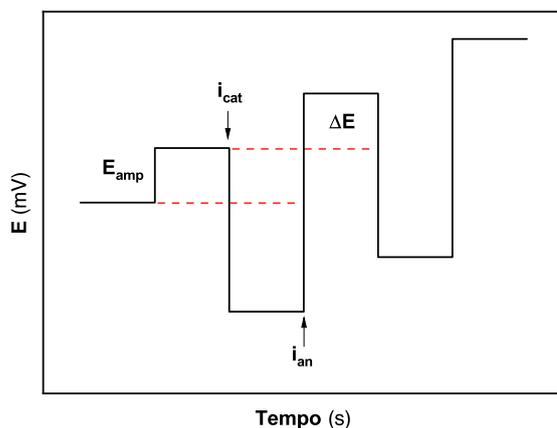


Figura 10 – Modulação do potencial na técnica SWV

Fonte: Adaptada de MIRCESKI; SKRZYPEK; STOJANOV.⁸⁰

Para facilitar a interpretação, considere a variação de potencial durante um ciclo. Durante essa variação de potencial, dois pulsos de mesmo potencial, porém opostos, são

aplicados. A ideia por trás da aplicação de dois pulsos opostos é fazer com que a reação eletroquímica ocorra em ambos os sentidos, anódico e catódico, com o intuito de melhorar a sensibilidade da técnica. A corrente é medida ao final de cada pulso (i_{an} e i_{cat}), tornando possível obter o voltamograma de i_{net} por potencial, onde $i_{net} = i_{cat} - i_{an}$. As principais justificativas para determinar as duas correntes são que o gráfico da i_{net} tem um pico bem definido, enquanto as componentes anódicas e catódicas possuem a forma de uma onda ou mais complicada. A forma de pico da i_{net} é vantajosa no contexto analítico, já que fornece parâmetros como amplitude e largura do pico. Além disso, a intensidade da resposta é muito maior do que com as componentes separadas.

3.2 Modelos de adsorção

Processos de adsorção são conhecidos há muito tempo, sendo que recentemente passaram a ser utilizados em diversas áreas; em ensaios farmacológicos, para modelar a interação entre enzimas-substrato,^{81,82} na descontaminação de poluentes em soluções aquosas⁸³⁻⁸⁵ ou meios gasosos,^{86,87} e em biossensores. Neste último caso, é o processo de adsorção o resultado da interação entre a camada de reconhecimento (biomolécula) e a molécula-alvo.^{88,89} A adsorção pode ser por quimissorção e fisissorção, dependendo da força de interação entre o adsorbato e o substrato.⁹⁰ A quimissorção ocorre quando há ligações covalentes (irreversíveis) entre o substrato (adsorvente) e o adsorbato, enquanto a fisissorção ocorre com interações eletrostáticas (reversível) e outras interações físicas, como as de van der Waals. Na quimissorção muitas vezes forma-se uma monocamada do adsorvente, e na fisissorção podem-se formar multicamadas do adsorvente no adsorbato.

3.2.1 Langmuir

Grandes esforços foram feitos para modelar esses processos de adsorção, sendo que Henry, Langmuir e Freundlich foram pioneiros. O modelo mais simples foi proposto por Langmuir,⁹¹ em que a adsorção acontece com a formação de uma monocamada de adsorbato com incidência contínua de moléculas na superfície e a correspondente dessorção de moléculas da superfície, sem a acumulação de moléculas. Em outras palavras, as taxas de adsorção e dessorção devem ser as mesmas. A isoterma de Langmuir representa a quantidade de material adsorvido em relação à concentração do adsorbato em solução, descrita pela Equação 3.2

$$q = \frac{Q_{SAT} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3.2)$$

onde q representa a quantidade adsorvida por massa de adsorvente (mg/g), C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio, Q_{SAT} é a capacidade máxima de adsorção (mg/g) e K_L é chamado de constante de Langmuir.

3.2.2 Freundlich

O modelo proposto por Freundlich considera o processo de adsorção não-ideal e reversível. Diferentemente do proposto por Langmuir, no modelo de Freundlich podem-se formar multicamadas, levando em conta também a heterogeneidade da superfície. Isto é, os sítios ativos, a afinidade dos sítios e a energia desses sítios não são uniformemente distribuídos. Desse modo, os sítios com maior afinidade pelo adsorbato serão ocupados primeiro, ocorrendo uma queda na energia dos sítios até que o processo de adsorção esteja completo.⁹² A equação que descreve esse modelo está apresentada na Equação 3.3.

$$q = K_F C^n \quad (3.3)$$

3.2.3 Langmuir-Freundlich

Uma combinação de ambas isotermas, Langmuir e Freundlich, foi proposta por Sips, em 1948. Esse modelo considera a heterogeneidade dos sítios e é capaz de solucionar o problema de altas concentrações de adsorbato do modelo de Freundlich. Em baixas concentrações, o modelo é reduzido para o modelo de Freundlich, enquanto que em altas concentrações, o modelo prevê a formação de uma monocamada, semelhante ao de Langmuir. A equação desse modelo está apresentada na Equação 3.4.

$$q = \frac{Q_{SAT} (K_S C_e)^n}{1 + (K_S C_e)^n} \quad (3.4)$$

Onde q representa a quantidade adsorvida por massa de adsorvente (mg/g), C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio, K_S é chamado de constante de afinidade da interação adsorbato-adsorvente e n é o índice de heterogeneidade. Quando $n = 1$, os sítios são considerados homogêneos, enquanto $n < 1$ indica a heterogeneidade do sistema.⁹³⁻⁹⁵

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes

As sequências de ácidos nucleicos foram compradas da Exxtend (Campinas, Brasil). O tampão fosfato salino (PBS) 10 mmol L^{-1} pH 7,4, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), N-hidroxissuccinimida (NHS), ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES), cloreto de hexamino rutênio (Ru (III)) e etanolamina foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). As tintas de carbono (C2030519P4, Gwent Electronic) e Ag (90701) foram compradas da SunChemical, Gwent group (Reino Unido) e da Ticon (São Paulo, Brasil), respectivamente. Dynabeads (MPs) carboxiladas com $1 \mu\text{m}$ de tamanho foram obtidas da Thermofisher (EUA). Ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio foram adquiridos da Synth (Diadema, SP). Esmalte de unha e folhas de poliéster comerciais foram adquiridos numa papelaria local.

4.2 Fabricação dos eletrodos pela técnica de *screen-printing*

Os eletrodos foram fabricados em parceria com o laboratório do Prof. Ronaldo Censi Faria na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Para desenhar o layout do eletrodo, utilizou-se o software Silhouette Studio. Os eletrodos foram recortados em folhas de vinil com uma impressora de corte da Silhouette®, formando uma máscara negativa. Essa máscara foi, então, transferida para o substrato, nesse caso folhas transparentes de poliéster. A tinta de carbono (grafite pirolítico) foi depositada manualmente sobre a máscara e o substrato com uma régua plástica, sendo curada em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 minutos. Em seguida, a tinta de prata (Ag) foi depositada sobre a tinta de carbono, somente na área correspondente ao eletrodo de referência e novamente passou por um processo de cura em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Para delimitação da área dos eletrodos de trabalho foram usados esmaltes de unhas comerciais, secos à temperatura ambiente antes do uso. A máscara negativa foi removida com cuidado para não danificar os eletrodos fabricados.⁹⁶⁻⁹⁹ A Figura 11 apresenta o layout para a fabricação dos eletrodos impressos de carbono (do inglês screen-printed carbon electrodes, SPCE)s.

4.3 Biomarcador para câncer colorretal.

A ideia de utilizar uma bactéria, como a *F. nucleatum*, como biomarcador para CCR surgiu da parceria entre o Grupo de Polímeros "Prof. Bernhard Gross", da Universidade de São Paulo (USP), e o Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, do Hospital de Amor de Barretos. Pesquisadores do Hospital forneceram o conhecimento necessário para a identificação das sequências de interesse para os dispositivos analíticos que permitissem



Figura 11 – Representação do sistema contendo um eletrodo de trabalho, auxiliar e referência

Fonte: Elaborada pela autor

um diagnóstico precoce do CCR. As sequências da sonda, da sequência complementar, da sequência não-complementar e da sequência com 4 erros de pareamento (do inglês, *mismatch*) (M4) utilizadas nesta dissertação estão na Tabela 3. A sonda foi desenhada para detectar o gene *nusG* da bactéria *F. nucleatum*. Foi sugerido que utilizássemos como possível sonda a sequência do iniciador reverso (do inglês *reverse primer*). Segundo a ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local de nucleotídeos (do inglês *Nucleotide basic local alignment search tool*, BLASTn), essa sequência apresenta alta especificidade para a *F. nucleatum*, enquanto outras sequências apresentam alinhamentos com outras espécies de bactérias, como a *Fusobacterium hwasookii* e *Fusobacterium periodonticum*, além de bactérias de outros gêneros. Por esse motivo, decidiu-se utilizar o *reverse primer* como sonda.

Tabela 3 – Sequências de DNA para os biossensores

Nome	Sequência (5' - 3')	T_m (°C)
Reverse primer (Probe)	Amino - TTTTTTGTTGACTTTACAGAAGGAGATTA	56,7
Complementar	TAATCTCCTTCTGTAAAGTCAAC	52,4
Não-complementar	AGTTCTGGTATGACATGAAAGAA	52,4
M4	TAGTCTACTTCAGTAAAGTCGAC	54,2

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.1 Imobilização da sonda

O processo de funcionalização de MPs com biomoléculas geralmente ocorre de três maneiras diferentes: Adsorção física, 'aprisionamento' físico e por ligações covalentes.

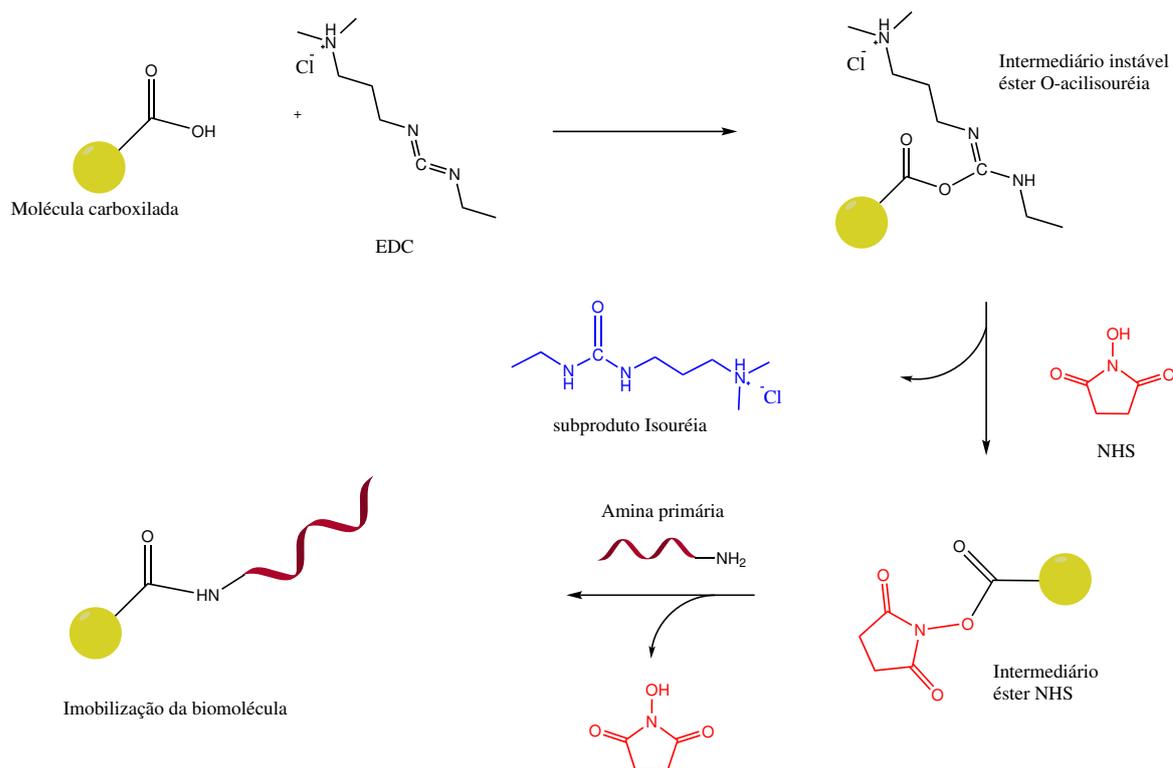


Figura 12 – Mecanismo de reação química para imobilizar biomoléculas com aminas primárias utilizando os cross-linkers EDC e NHS

Fonte: Elaborada pelo autor

Muitas metodologias foram desenvolvidas para imobilização covalente de biomoléculas em superfícies, com destaque para o uso de 'cross-linkers' como EDC e NHS.^{100–102} Nessa metodologia, primeiro ocorre a ativação dos grupos funcionais (ácidos carboxílicos) da superfície das MPs e depois o acoplamento de biomoléculas por ligações químicas. A Figura 12 apresenta o mecanismo químico para a imobilização de sequências de DNA aminadas.

As MPs foram diluídas até a concentração de 1 mg ml^{-1} e manteve-se essa concentração durante a imobilização. Para remover o solvente de estocagem da solução, as MPs passam primeiro por uma lavagem em 25 mmol L^{-1} tampão MES pH 5,0. Para ativação dos grupos carboxílicos, usou-se $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ de EDC, e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NHS em 25 mmol L^{-1} tampão MES pH 5,0, onde as MPs foram incubadas por 30 minutos. Em seguida as MPs foram lavadas com $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,4 para remover resíduos de EDC/NHS. Sequências de DNA marcadas com grupos aminas foram diluídas em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,4 até a concentração de $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e incubadas com as partículas magnéticas por uma noite (overnight) em temperatura ambiente, sob leve agitação. A razão pela qual o tampão para imobilização das sequências de DNA tem concentração maior que o tampão das outras etapas é que a densidade superficial da sonda depende da

força iônica do tampão.¹⁰³ Isso ocorre porque a força iônica é capaz de neutralizar as cargas do DNA, permitindo um alto grau de empacotamento do DNA na superfície das MPs. O protocolo adotado é uma adaptação do protocolo de imobilização sugerido pelo fabricante Thermofisher (Dynabeads MyOne™ Carboxylic Acid, June 2013). As MPs foram, então, magneticamente separadas das sequências não imobilizadas e incubadas por 30 minutos em solução de 1 mmol L^{-1} etanolamina diluída em 25 mmol L^{-1} tampão fosfato pH 7,2. Em seguida foram separadas magneticamente e passaram por outra etapa de lavagem em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,4 com 0.05% de SDS para remoção de sequências adsorvidas e resíduos de etanolamina. Assim, formaram-se os bio-conjugados de ssDNA-MPs.

4.3.2 Hibridização das sequências de DNA

Para realizar a hibridização, as sequências complementar, não-complementar e M4 foram diluídas em 25 mmol L^{-1} tampão fosfato enriquecido com 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 até as concentrações desejadas. As ssDNA-MPs foram incubadas com as sequências de interesse e aquecidas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho-maria por 30 minutos. Em seguida, elas foram separadas magneticamente e passaram por uma nova etapa de lavagem em PBS com 0.05% de SDS. As dsDNA-MPs foram, então, incubadas com o mediador redox $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ru (III) por mais 30 minutos, sendo em seguida separadas e lavadas 2x em PBS para remover resíduos de Ru (III) adsorvidos inespecificamente nas partículas. A solução das dsDNA-MPs marcadas foi diluída em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,2 até a concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. A Figura 13 apresenta o protocolo, desde imobilização até hibridização no funcionamento do genossensor. A etanolamina foi ocultada por motivos de clareza.

O limite de detecção (LOD) de uma curva analítica pode ser definido como a concentração do analito em que o sinal (y) difere significativamente do sinal do branco (y_B). O limite de detecção das curvas analíticas foi determinado como recomendado pela literatura, considerando o intervalo linear da dependência com a concentração.

$$LOD = y_B + 3S_B \quad (4.1)$$

onde y_B é a corrente do grupo controle e S_B o desvio padrão das medidas. O limite de quantificação foi determinado do mesmo modo, mas considerando 10 vezes o desvio padrão do branco.

4.4 Medidas eletroquímicas

4.4.1 Procedimento de estabilização eletroquímica do eletrodo

Antes das medidas eletroquímicas, os eletrodos são submetidos a um procedimento para dessorção de impurezas variando o potencial entre $-0,7$ e $0,0 \text{ V}$ vs Ag em solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7,2 com a técnica de SWV por 10 ciclos. Esse processo ajuda a estabilizar a linha de base e remover quaisquer impurezas restantes adsorvidas na superfície

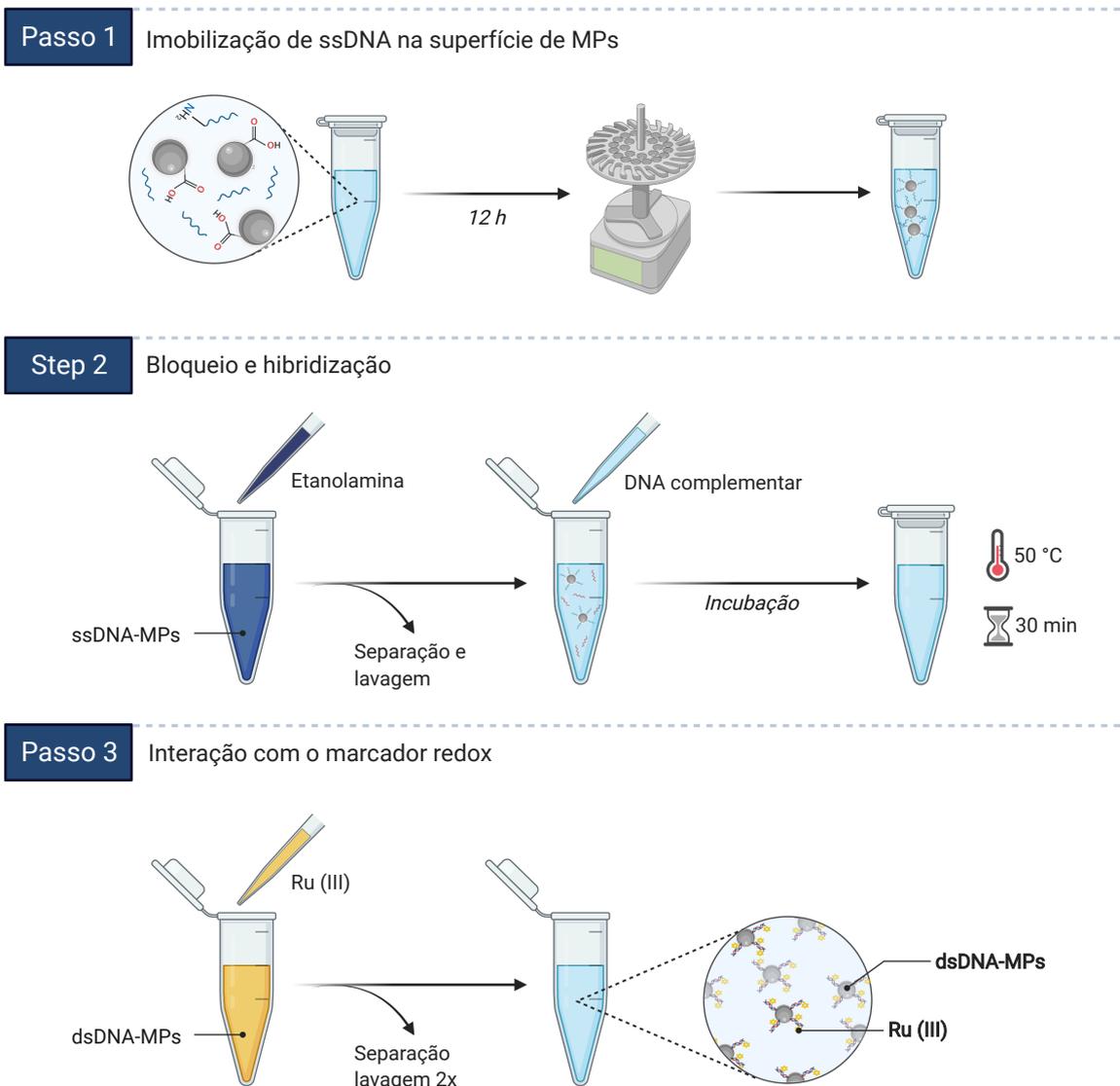


Figura 13 – Protocolo de imobilização, bloqueio, hibridização com a sequência complementar e interação com o mediador redox Ru (III)

Fonte: Elaborada pelo autor

do eletrodo. Após o processo de limpeza eletroquímica, o eletrodo é lavado com água Milli-Q e seco em jato de N_2 .

4.4.2 Medidas voltamétricas

Para as medidas, um ímã de mesma área geométrica do eletrodo de trabalho é fixado atrás do WE com uma fita dupla-face. O ímã gera um campo magnético capaz de atrair as MPs até a superfície do eletrodo para a reação redox do Ru (III). Após seco, o eletrodo com o ímã é posicionado no suporte e, pelo método de gota, $100 \mu L$ de solução das MPs são depositados sobre os eletrodos de modo lento e controlado, para

que as MPs tenham tempo suficiente de serem atraídas até a interface. Após 1 minuto e 30 segundos, a solução foi removida com uma pequena porção de papel higiênico de modo que as MPs permaneçam na superfície do eletrodo. Foram adicionados 100 μL de solução de 10 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$) em 0,01 mol L^{-1} PBS pH 7,2. As medidas foram feitas com um potenciostato Autolab, controlado pelo software Nova 2.1. A estratégia de utilização do ferricianeto de potássio visa à amplificação do sinal eletroquímico gerado pela reação de oxirredução do Ru (III), como será apresentado em maiores detalhes na seção 5.5.

4.4.3 Determinação da sequência alvo em amostras biológicas

A resposta analítica do genossensor foi avaliada com amostras biológicas (Comitê de ética n° 1.447.041), utilizando as linhagens celulares HT-29 e SW-620, fornecidas pelo Centro de Oncologia Molecular do Hospital de Amor. Antes da análise, as amostras foram diluídas 100x em 0,025 mol L^{-1} PB + 0,001 mol L^{-1} MgCl_2 e enriquecidas com a sequência alvo. As ssDNA-MPs foram incubadas com 100 μL das amostras por 30 minutos e aquecidas a 50 $^\circ\text{C}$. Para obter os voltamogramas de SWV das amostras biológicas, utilizou-se tampão PBS com 0.05% do surfactante SDS para a remoção de moléculas biológicas indesejadas que estejam adsorvidas.

4.5 Caracterização morfológica e espectroscópica

4.5.1 Microscopia eletrônica de varredura

A superfície do WE foi caracterizada com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento ZEISS Sigma. Os experimentos de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (do inglês, *Fourier transform infra-red spectroscopy*, *FTIR*) foram realizados usando um espectrômetro Thermo Nicolet Nexus 470 (Thermo Fisher, EUA). Os experimentos de espectroscopia no ultravioleta (UV) foram realizados com um NanoDrop One Microvolume UV-VIS (Thermo Fisher, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização espectroscópica do DNA e das ssDNA-MPs

Realizou-se a caracterização espectroscópica para comprovar a reação de imobilização de ssDNA na superfície das MPs. Utilizou-se a técnica de FTIR, permitindo a identificação dos grupos funcionais e ligações químicas. A Figura 14 apresenta os espectros para o DNA livre, MPs, e MPs após ativação dos grupos carboxílicos por EDC/NHS e MPs após incubação com a sonda. A Tabela 4 mostra a atribuição de cada um dos picos no espectro. Tanto o aparecimento de novos picos e o desaparecimento de outros podem ser indicativos da imobilização do DNA. Os picos referentes aos grupos PO_2 em baixos números de onda (967, 1101 e 1274 cm^{-1}) podem pertencer tanto ao fosfato das cadeias de DNA quanto ao tampão PBS. Também em baixos números de onda observa-se o pico em 854 cm^{-1} , tanto no DNA livre quanto nas ssDNA-MPs, comprovando a presença de sequências de DNA na superfície. Em 1346 cm^{-1} aparece o pico devido à flexão do grupo O-H dos açúcares das cadeias de DNA e das moléculas de NHS. O pico em 1524 cm^{-1} é referente ao estiramento do N-O da estrutura intermediária durante a ativação dos grupos carboxílicos. O pico em 2125 cm^{-1} é atribuído às vibrações de estiramento da carbodiimida, do EDC. Observam-se vibrações dos grupos de EDC e do NHS tanto nas MPs em etapas anteriores e posteriores à incubação com DNA. Isso sugere que ainda restam sítios ativos livres, ou que não reagiram com a amina das cadeias de DNA, daí a necessidade de realizar o bloqueio com etanolamina. No espectro de EDC/NHS MPs há picos pouco intensos na região de 1700 e 1737 cm^{-1} , referentes a vibrações de C=O de ésteres e amidas. Em altos números de onda (2800 e 2900 cm^{-1}) há o estiramento do C-H, em todos os espectros. Conclui-se dessa análise que a ativação dos grupos carboxílicos das MPs e imobilização das ssDNA foram bem sucedidas.

Um dos pontos-chave na construção de biossensores com sequências de DNA é a determinação correta da concentração e da pureza do DNA enviado pelo fabricante. Para essa quantificação, a técnica mais comum é a espectroscopia no ultravioleta (UV). O modelo mais preciso, denominado de *k-nearest-neighbor model*, *kNN*, para determinar o coeficiente de extinção molar (ϵ) do DNA no comprimento de onda máximo (λ_{max}), leva em conta a composição das bases e a estrutura secundária, resultante da interação entre bases adjacentes. A determinação da concentração é feita com a lei de Beer-Lambert, segundo a qual a absorbância (A) é proporcional ao coeficiente de extinção molar (ϵ , $L mol^{-1} cm^{-1}$), à espessura do caminho percorrido pela radiação UV (l) e à concentração (C , $mol L^{-1}$) do analito, como expresso na Equação 5.1.

$$A_{\lambda_{max}} = \epsilon \cdot l \cdot C \quad (5.1)$$

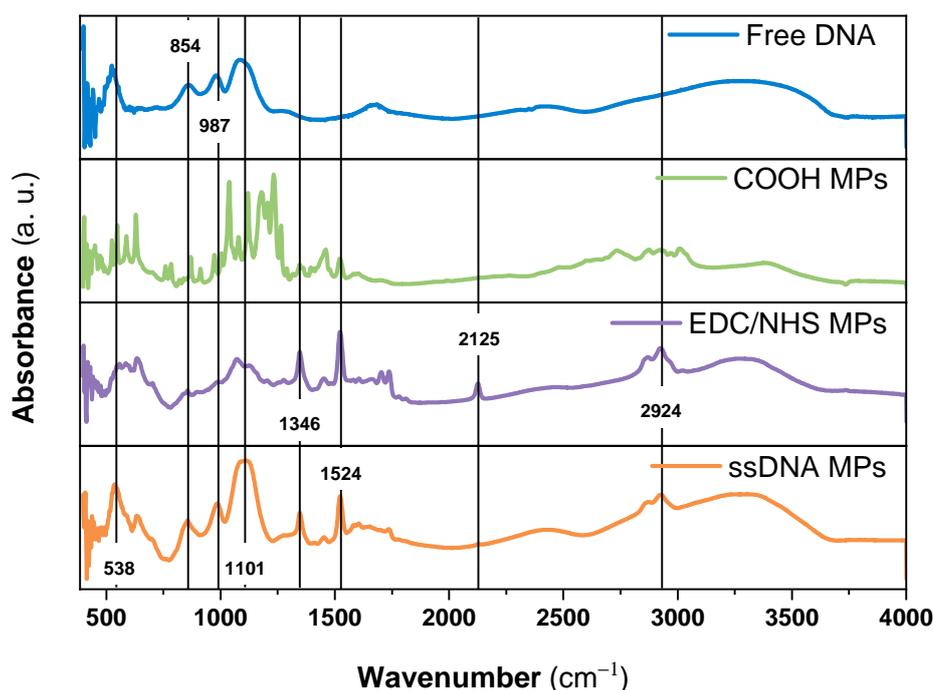


Figura 14 – Espectros FTIR das etapas de imobilização de ssDNA em MPs para a construção de um genossensor eletroquímico. Tempo de incubação com $8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ssDNA: 180 minutos. Depositaram-se $15 \mu\text{L}$ da solução na placa de Si e seca a vácuo, e após aberta a câmara para posicionamento da amostra esperou-se 15 minutos com fluxo de N_2 para obter os espectros. Concentração final de MPs de 4 mg mL^{-1}

Fonte: Elaborada pelo autor

O cálculo do ε foi realizado com um estudo comparativo entre diversos modelos preditivos de Tataurov, You e Owczarzy,¹⁰⁴ que fornece uma planilha em Excel contendo o algoritmo para o cálculo teórico de ε . Através de um simples rearranjo da Equação 5.1 e com o coeficiente de extinção teórico $\varepsilon = 311\,900 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ no comprimento $\lambda_{max} = 257,4 \text{ nm}$, é possível determinar a concentração da sonda utilizada ($C = 8,6 \mu\text{g mL}^{-1}$). A especificação do fabricante era que a concentração da sonda é de $8,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. O modelo utilizado é tão robusto que as curvas de absorvância teórica e experimental quase coincidiram, como observado na Figura 15.

Para determinar a pureza da solução, foram utilizadas as relações entre a absorvância em 230 nm, 260 nm e 280 nm. A relação A_{260}/A_{280} é um indicativo da presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes na amostra. Os valores de referência para essa razão estão em torno de 1,6 em pH 7,4. A razão $260/230$ indica a presença de sais, trizol (reagente utilizado para extração de DNA) e guanidina, e os valores de referência estão entre 1,8 e 2,0 em pH 7,4.¹⁰⁵ As razões obtidas para a sonda foram $A_{260}/A_{280} = 1,75$

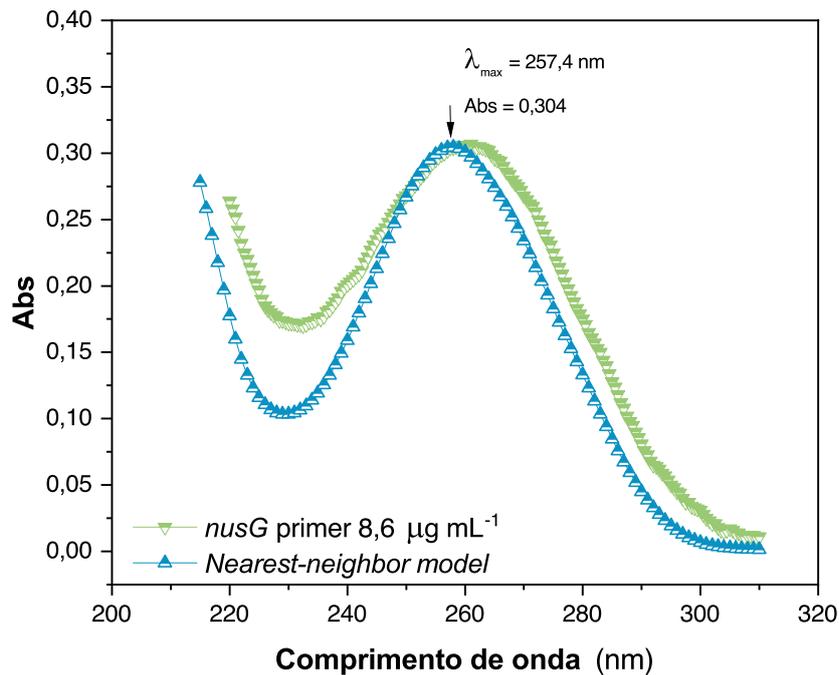


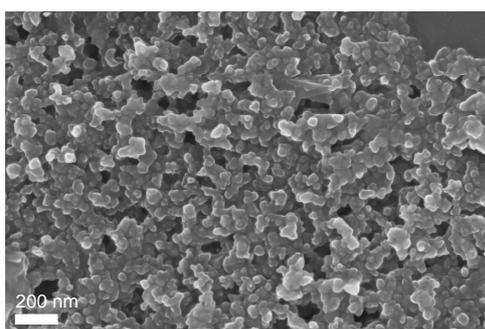
Figura 15 – Espectros UV da sonda da *F. nucleatum* (a) espectro de solução contendo a sequência do primer do gene *nusG* para cálculo da concentração, verde; (b) espectro previsto no modelo Nearest-neighbor, azul

Fonte: Elaborada pelo autor

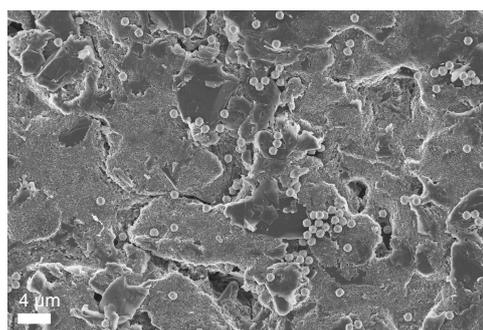
e $A_{260}/A_{230} = 1,78$, sendo possível concluir que os valores estão próximos aos valores de pureza recomendados. Assim, fica descartada a necessidade de purificação da solução.

5.2 Caracterização morfológica do SPCEs e MPs

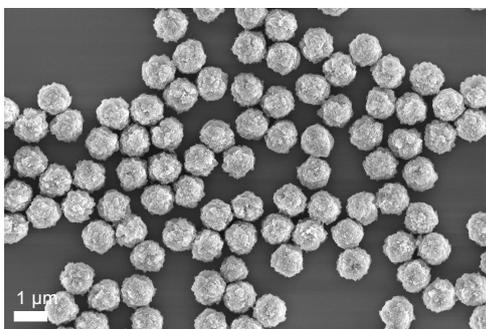
As propriedades eletroquímicas de SPCEs dependem de sua estrutura e composição. Por exemplo, a rugosidade dos eletrodos de trabalho aumenta a área eletroativa. Grupos funcionais na superfície dos eletrodos podem ser utilizados para ancorar biomoléculas e polímeros, através de ligações covalentes ou interações eletrostáticas. Portanto, para estudar as mudanças morfológicas provocadas pelas diferentes etapas de desenvolvimento do genossensor, avaliou-se por MEV a morfologia dos SPCEs e MPs-SPCEs. Na Figura 16 são apresentadas as imagens de microscopia eletrônica para o (a) SPCE, (b) MPs-SPCEs e (c) MPs. A tinta condutora apresentou uma superfície rugosa, composta por agregados de partículas de carbono de diferentes tamanhos e formas indefinidas. Da Figura 16c observam-se MPs com aparência esférica e morfologia homogênea. O cálculo do tamanho das MPs com o software ImageJ indicou uma solução monodispersa com aproximadamente $0,95 \mu\text{m}$, similar ao indicado pela fabricante *Thermofisher*, de $1 \mu\text{m}$.



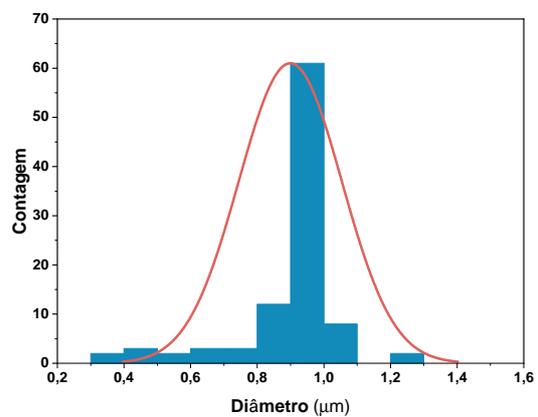
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 16 – Imagens de MEV para (a) SPCE, (b) MP-SPCE, (c) MPs e (d) MPs depois da incubação com EDC/NHS. (e) histograma da distribuição de tamanho das MPs

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4 – Atribuição dos números de onda de FTIR aos grupos funcionais das moléculas utilizadas no genossensor

	Wavenumber (cm^{-1})				References
	free DNA	COOH MP _s	EDC/NHS MP _s	ssDNA-MP _s	
C-H stretching mode		~2900 and 2800	~2900 and 2800	~2900 and 2800	106
C = O esters			1737		
C = O amide			1700		
-N=C=N-			2118		
COO^- symmetric stretching		1531			
N-O stretching			1531	1530	
COO^- asymmetric stretching		1455			
OH bending			1346	1343	
PO_2 asymmetric stretching				1274 (shoulder)	107
PO_2 symmetric stretching	1101			1101	
P-O-P bending	987			987	108
Deoxyribose phosphate	854			854	

Fonte: Elaborada pelo autor

5.3 Caracterização eletroquímica dos SPCEs

A caracterização eletroquímica dos SPCEs foi iniciada com voltametria cíclica utilizando a sonda eletroquímica ácido ferroceno monocarboxílico. As figuras 17a e 17b mostram os voltamogramas para os SPCEs e MPs-SPCEs (SPCEs modificados com $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ MPs, magneticamente capturados na superfície do eletrodo de trabalho com um ímã de neodímio) em solução de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $Fe(C_5H_5)_2$ em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl para as velocidades de varredura de 10 a 500 mV s^{-1} . O estudo de voltametria cíclica em diferentes velocidades de varredura serviu para avaliar o comportamento da corrente de pico. Os voltamogramas possuem um par de picos bem definidos, mas não há aumento da separação dos potenciais anódico e catódico. Há um aumento da intensidade da corrente em função da funcionalização dos SPCEs com MPs, indicando que essa funcionalização favorece a transferência de elétrons entre o eletrodo e o eletrólito.^{109,110} Para todos os SPCEs e MP-SPCEs foram observadas relações lineares entre i_p e $\nu^{\frac{1}{2}}$. O coeficiente angular das curvas no gráfico 17d está bem próximo ao valor teórico de 0,5, indicando um processo de transferência de massas puramente difusional.¹¹¹ Admitindo-se o controle difusional e com a Equação 3.1, é possível calcular a área eletroativa do eletrodo considerando-se $n = 1$, $D = 3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $C = 1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A área geométrica do eletrodo é $7,06 \text{ mm}^2$, enquanto a área eletroativa obtida foi $3,80 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ e $4,50 \pm 0,02 \text{ mm}^2$, para o eletrodo sem MPs e com MPs, respectivamente, representando um acréscimo de 18,4% na área eletroativa dos SPCEs. A diferença entre a área geométrica e eletroativa se deve principalmente à presença de componentes da tinta de carbono que não são bons condutores elétricos, de modo que acabam reduzindo a intensidade da corrente elétrica.

Para validar o processo de fabricação dos eletrodos, realizou-se um estudo de reprodutibilidade com 3 eletrodos diferentes, utilizando $60 \mu\text{L}$ da solução de $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ru (III) em medidas de SWV. Os voltamogramas na Figura 18 mostram não haver diferença significativa na corrente de pico medida, indicando a alta reprodutibilidade do processo de fabricação dos eletrodos. O desvio padrão relativo (do inglês *relative standard deviation*, RSD) foi 4,89%, abaixo do valor internacionalmente aceito, que é de 5%. Esse resultado confirma a eficiência e viabilidade do processo manual de *screen-printing* desses eletrodos.

5.4 Componentes eletroativos

Como já mencionado na subseção 2.6.2.2, o mediador redox Ru (III) interage com as fitas de DNA por interações eletrostáticas, pois não possui regiões planares e aromáticas para intercalar entre os pares de bases da hélice de DNA. Uma das maiores desvantagens desse tipo de estratégia de detecção é que o sinal eletroquímico gerado pela reação redox do Ru (III) é baixo, dificultando sua quantificação precisa. Por esse motivo, utilizou-se uma segunda estratégia, dessa vez para a amplificação desse sinal

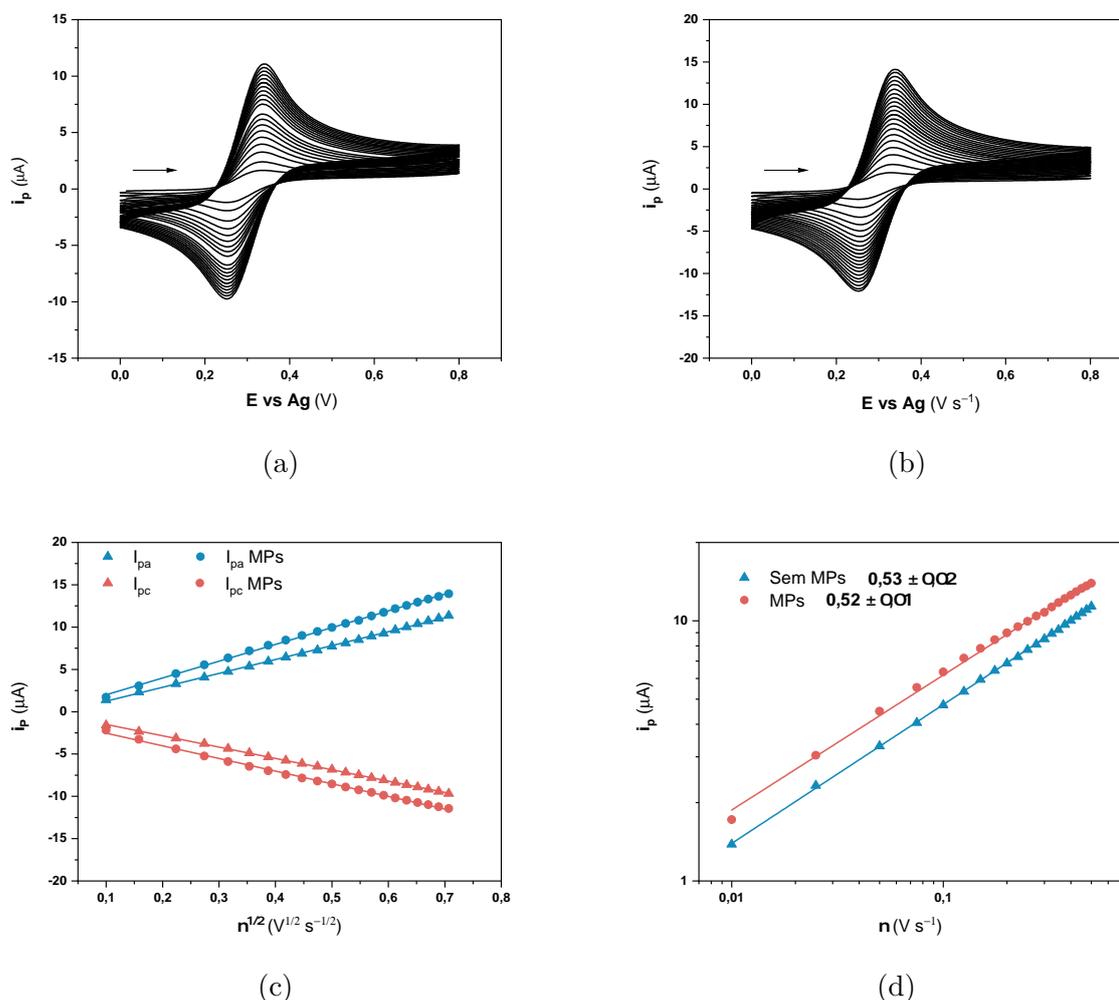


Figura 17 – Estudo da velocidade de varredura de potenciais em SPCEs não modificados e SPCEs modificados com $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ MPs, obtidos em $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $Fe(C_5H_5)_2$ em $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl , $\nu = 10 - 400 \text{ mV s}^{-1}$ (a) e (b) voltamogramas sem MPs e com MPs, respectivamente, (c) $i_p \times \nu^{1/2}$, (d) $\log i_p \times \log \nu$

Fonte: Elaborada pelo autor

eletroquímico utilizando $K_3Fe(CN)_6$.¹¹²⁻¹¹⁴ Diversos trabalhos utilizam o Ru (III) para a detecção de DNA com nanopartículas (NPs),¹¹⁵⁻¹¹⁷ sempre com foco no uso de AuNPs. Até o momento, não há trabalhos publicados combinando essa estratégia de detecção com partículas magnéticas. Assim, a primeira etapa consistiu em estudar o comportamento eletroquímico dos componentes eletroativos. A determinação dos potenciais de oxirredução dos componentes foi realizada com a técnica de SWV, cujos voltamogramas são mostrados na Figura 19a. As MPs carboxiladas não apresentam caráter eletroativo na janela de potencial estudada, uma característica essencial para um bom desempenho analítico, uma vez que o sinal redox das MPs poderia prejudicar a determinação analítica do Ru (III).

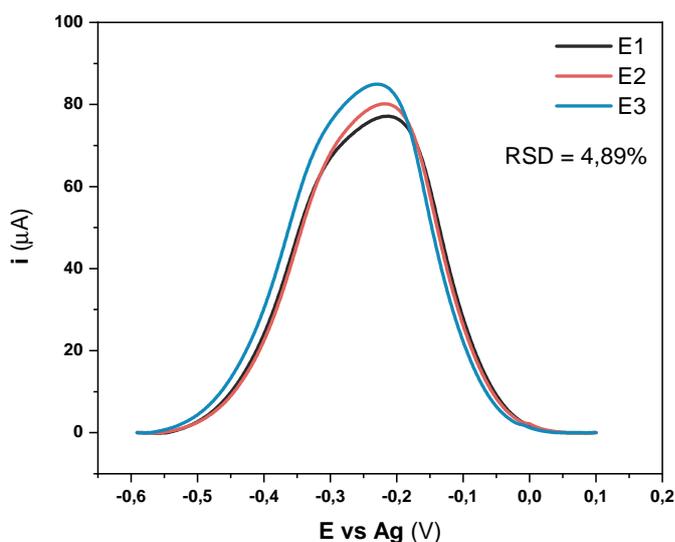


Figura 18 – Voltamogramas por SWV em três eletrodos ($n = 3$) com os seguintes parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em solução $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ de Ru (III) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2

Fonte: Elaborada pelo autor

O Ru (III) apresenta sinal redox em aproximadamente $-0,3 \text{ V}$, enquanto o potencial de oxirredução do $K_3Fe(CN)_6$ é de cerca $+0,1 \text{ V}$, ou seja, não existe sobreposição de potenciais entre os mediadores redox (Ru (III) e $K_3Fe(CN)_6$). Como o $K_3Fe(CN)_6$ será usado em uma estratégia acoplada para amplificação do sinal do Ru (III), é essencial que os picos de oxirredução dos mediadores não dificultem a determinação um do outro. Sendo o objetivo detectar o Ru (III) e como não há sobreposição de potenciais, empregou-se a janela de potencial de $-0,7$ a 0 V . Por fim, é possível concluir que o bloqueio dos sítios não-reativos com etanolamina não altera significativamente o valor da corrente de pico, uma vez que após 12 horas de imobilização, espera-se que a grande maioria dos sítios tenha reagido com os grupos amina das moléculas de DNA. Essa discussão foi baseada nos resultados da Figura 19.

5.5 Amplificação do sinal eletroquímico do Ru (III)

Realizou-se um estudo para a amplificação do sinal do mediador redox. Para tanto, incubou-se 1 mg mL^{-1} de ssDNA-MPs em $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ da solução de Ru (III) por 30 minutos. Após a incubação, foram realizadas duas etapas de lavagem em 10 mmol L^{-1} PBS. Como estratégia de amplificação, foram testadas duas sondas eletroquímicas: ferricianeto de potássio ($K_3Fe(CN)_6$, eletrólito suporte 1) e ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$, eletrólito suporte 2), que atuam doando ou aceitando elétrons do Ru (III), dependendo do

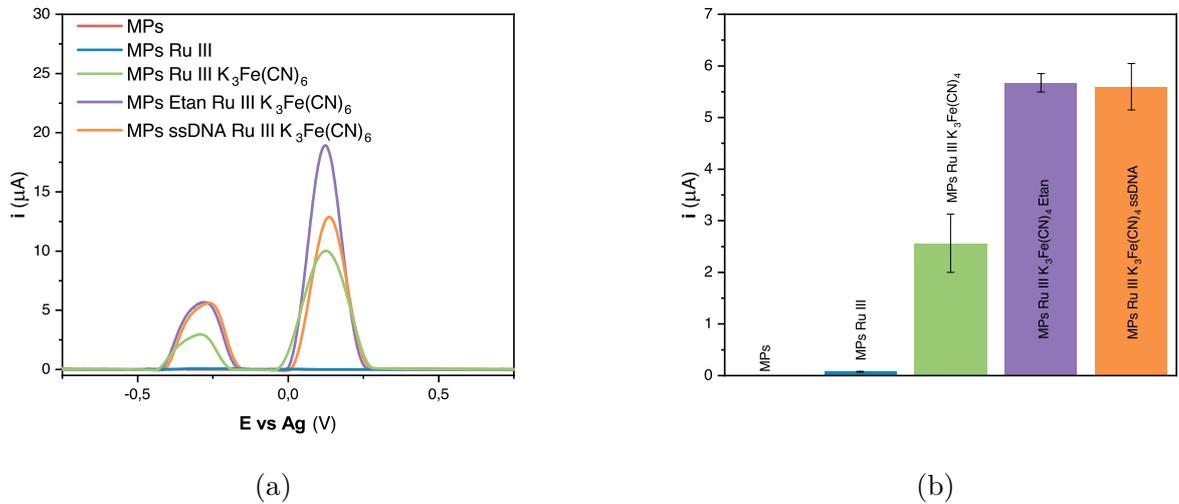


Figura 19 – SWV para os componentes eletroativos na construção do genossensor. Concentração final de MPs de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Incubação de 30 minutos em solução de $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ Ru (III), diluído em 10 mmol L^{-1} PBS pH 7.4. Concentração de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mmol L^{-1} em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS pH 7.4

Fonte: Elaborada pelo autor

processo. A estratégia de amplificação está esquematizada na Figura 20.

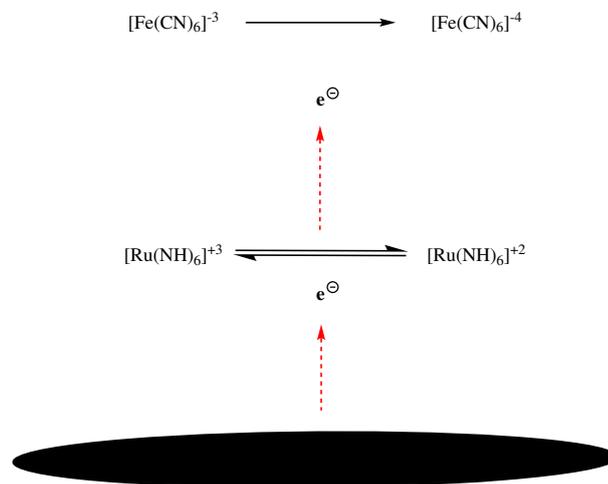


Figura 20 – Representação da estratégia de amplificação do sinal do mediador redox com sondas sacrificiais. (a) reação de redução do Ru (III); (b) reação de oxidação do Ru (III)

Fonte: Elaborada pelo autor

Resumidamente, o que ocorre nesse sistema é que o aceptor primário de elétrons ($[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{+3}$) é atraído magneticamente para a superfície do eletrodo, em proporção à quantidade de ácido nucleico imobilizado nas MPs. Quando o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ é utilizado, o

Ru (III) é regenerado quimicamente pelo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$, formando um ciclo redox, o que amplifica o sinal eletroquímico significativamente. Em detalhes, na reação de redução o cloreto de hexamino rutênio em sua forma oxidada Ru (III) interage eletrostaticamente com o fosfato do DNA, carregado negativamente. Com a aplicação do potencial, existe um fluxo de elétrons do eletrodo para o Ru (III), reduzindo-o a Ru (II). O Ru (II) é então re-oxidado a Ru (III) na presença do eletrólito suporte $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$, reduzindo a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ para $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. A reação de oxidação acontece de modo similar; com a aplicação do potencial o Ru (II) na superfície das MPs é oxidado para Ru (III). Na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$, o Ru (II) é regenerado pelas sondas sacrificiais. A Figura 21 mostra que o sinal com a solução da sonda sacrificial 1 é significativamente maior, com amplificação de aproximadamente 24 vezes em relação ao valor sem utilização das sondas sacrificiais, nesse caso em tampão PBS. Também houve aumento de sinal com o eletrólito suporte 2, mas não tão grande. É possível notar que quando as duas sondas suportes encontram-se na mesma solução acontece interferência entre elas. Isso é percebido no aumento do desvio padrão na comparação com outras condições. Portanto, optou-se por utilizar somente a sonda $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ em solução para a amplificação nas medidas subsequentes.

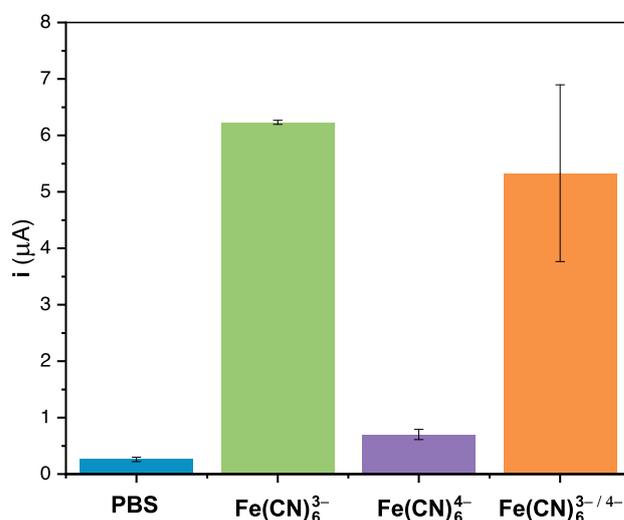


Figura 21 – Aumento do sinal eletroquímico da sonda redox cloreto de hexamino rutênio utilizando duas sondas sacrificiais: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Experimento realizado com a técnica de voltametria de onda quadrada, com os seguintes parâmetros: $f = 15 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E = 1 \text{ mV}$

Fonte: Elaborada pelo autor

5.6 Otimização da concentração de MPs

O efeito da concentração de micropartículas no comportamento eletroquímico dos eletrodos foi investigado incubando-se MPs com $6,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ da sonda de DNA por 12 h, sob leve agitação. Em seguida realizou-se o protocolo para a hibridização das sequências, com $1,725 \mu\text{g mL}^{-1}$ do *target*. As soluções controle (sem a sequência complementar hibridizada, c) e da sequência complementar hibridizada (dsDNA-MPs) foram marcadas com a sonda redox, como previamente descrito. A Figura 22 indica um aumento da corrente com a hibridização das sequências para todas as concentrações de MPs testadas. Analisando o eixo em vermelho, representando a relação sinal-ruído (do inglês *signal-noise*, S/N), pode-se inferir que, apesar de as concentrações mais altas ($0,25$ e $0,50 \text{ mg mL}^{-1}$) apresentarem, estatisticamente, o maior sinal redox, a relação S/N deles foi baixa. Ou seja, o ruído foi alto para essas medidas. Por outro lado, a relação S/N foi maior para a concentração $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, a despeito de um sinal redox menor do que em outras concentrações. Isso ocorre porque uma maior concentração de MPs pode bloquear a superfície, prejudicando a transferência de elétrons entre o mediador redox e o eletrodo de trabalho. Portanto, para os subseqüentes experimentos, adotou-se a concentração de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ de MPs capturadas magneticamente.

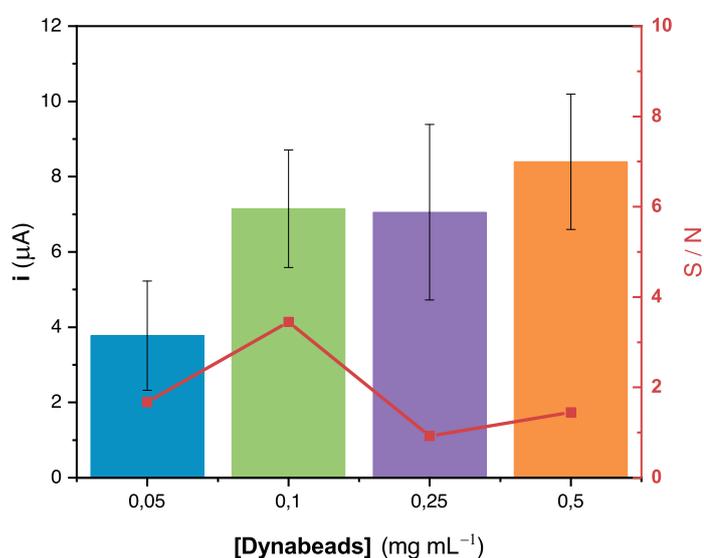


Figura 22 – Efeito na resposta redox da concentração de ssDNA-MPs e dsDNA-MPs capturados nos eletrodos. Hibridização a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ em $25 \text{ mmol L}^{-1} \text{ PB} + 1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgCl}_2$ durante 30 minutos. SWV em três eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15 \text{ Hz}$, $A = 100 \text{ mV}$ e $\Delta E = 1 \text{ mV}$ em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2

Fonte: Elaborada pelo autor

5.7 Otimização da temperatura de hibridização

Avaliou-se o efeito da temperatura na eficiência da hibridização das sequências *probe* e *target* através da resposta eletroquímica gerada pela reação redox do Ru (III). Foram realizadas medidas para cinco temperaturas em torno da T_m das sequências, a saber: 45, 50, 55, 60 e 65 °C. Adotou-se o tempo de 30 minutos para a incubação das ssDNA-MPs com 1,725 $\mu\text{g mL}^{-1}$ da sequência *target* em banho-maria, sendo a temperatura do banho medida com um termômetro de *Hg* submerso na água. Monitorou-se a diferença entre a corrente controle e da corrente das dsDNA-MPs, nas diferentes temperaturas. A Figura 23 mostra um aumento significativo na corrente com o aumento de temperatura de 45 a 55 °C. Para as outras temperaturas há um possível desfavorecimento energético para a formação da dupla hélice na superfície das MPs, resultando numa corrente menor. Nos experimentos subsequentes e etapas de construção do biossensor, adotou-se a temperatura de 50 °C para a hibridização, que apresenta um dos maiores sinais redox e menor desvio padrão, e com o maior coeficiente S/N dentre as temperaturas testadas.

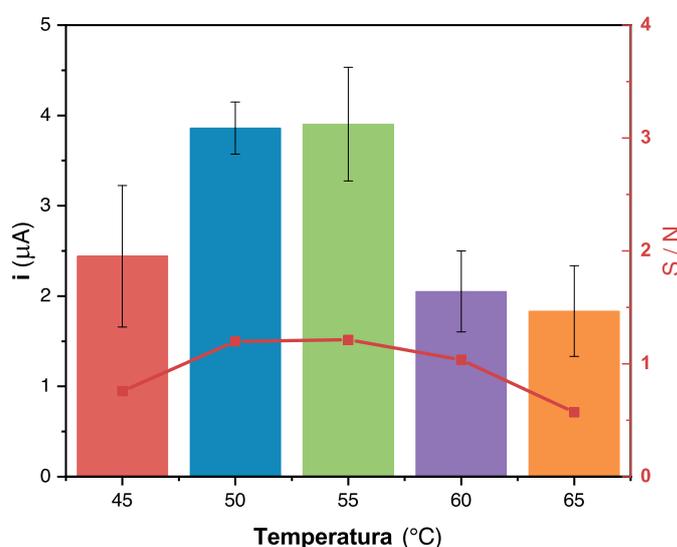


Figura 23 – Efeito da temperatura na eficiência da hibridização das sequências complementares através da resposta do mediador redox. Hibridização a 45, 50, 55, 60 e 65 °C em 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} MgCl_2 durante 30 minutos. SWV em três eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 0,01 mol L^{-1} PBS, pH 7,2

Fonte: Elaborada pelo autor

5.8 Otimização do tempo para hibridização

Assim como o estudo anterior, este serve para otimizar o processo de hibridização do genossensor. O foco é na otimização do tempo de hibridização da *probe* imobilizada na superfície das MPs com a sequência *target*. Isso é relevante porque híbridos complementares se formam rapidamente, mas o tempo afeta a sensibilidade e seletividade do sensor. A Figura 24 mostra a construção do biossensor e marcação com a sonda redox Ru (III), realizados como descrito na subseção 4.3.1 e subseção 4.3.2, utilizando-se $1,725 \mu\text{g mL}^{-1}$ do *target* em fosfato 25 mmol L^{-1} enriquecido com 1 mmol L^{-1} de MgCl_2 . As soluções contendo o ssDNA-MPs e o *target* foram incubadas em banho-maria por 5, 15 e 30 minutos. A temperatura do banho foi de 50°C , como escolhido anteriormente. Percebe-se que não há variação significativa da corrente de pico entre o controle (solução contendo o conjugado ssDNA-MPs marcado com Ru (III) não submetida à hibridização com a sequência complementar) e a medida realizada com 5 e 15 minutos de hibridização. A maior diferença ocorre em 30 minutos, em que a eficiência de hibridização é maior, assim como o sinal analítico da sonda redox. Portanto, adotou-se o tempo de 30 minutos para os próximos experimentos. Tempos maiores que 30 minutos não foram estudados, já que o objetivo da metodologia era um diagnóstico rápido (tempos menores que 60 minutos). Além disso, tempos de hibridização prolongados, isto é, maiores que 30 minutos, não melhoram significativamente a hibridização e podem afetar a reprodutibilidade desse tipo de dispositivo.^{37,118,119}

5.9 Otimização do tampão para hibridização

Como último estudo de otimização antes da determinação analítica do *target*, foi estudada a influência do tampão na eficiência de hibridização entre as sequências complementares e o seu papel na resposta analítica do dispositivo, uma vez que a literatura apresenta diferentes tampões para essa finalidade. Para tanto, avaliou-se o efeito de três tampões: citrato de sódio (SSC); tampão fosfato fortalecido com cloreto de magnésio ($25 \text{ mmol L}^{-1} + 1 \text{ mmol L}^{-1}$) e tampão fosfato salino fortalecido com cloreto de magnésio ($10 \text{ mmol L}^{-1} + 1 \text{ mmol L}^{-1}$). O protocolo para a hibridização foi o mesmo adotado das outras vezes: temperatura do banho-maria de 50°C durante 30 minutos e a concentração da sequência complementar foi de $2,76 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já se sabe que a força iônica do tampão influencia a densidade de sonda na superfície de eletrodos.¹⁰³ Em tampões com baixa força iônica, os íons em solução não são suficientes para blindar as cargas do DNA, causando adsorção que dificulta o acesso do *target* aos pares de bases complementares na *probe*. Como o DNA possui cargas negativas devido ao esqueleto de fosfato, é interessante adicionar cargas positivas como Mg^+ em solução para promover a neutralização dessas cargas e remover possíveis adsorções inespecíficas do DNA na superfície das MPs, deixando-o mais exposto para a interação com a sequência complementar. A Figura 25 mostra o resultado

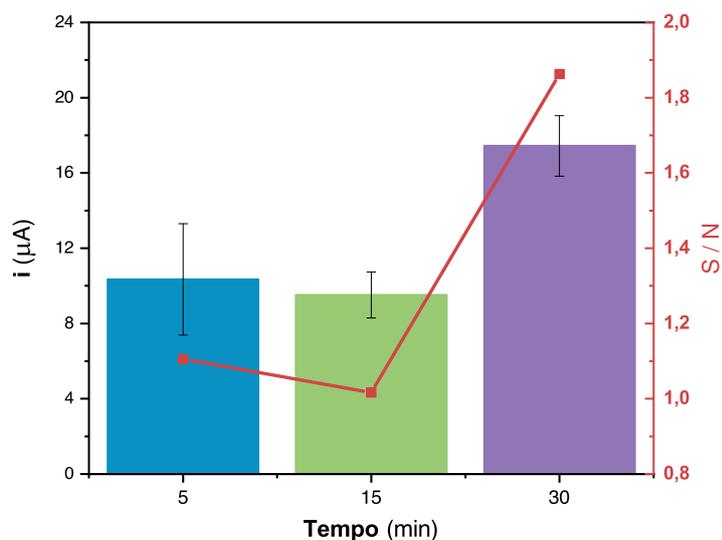


Figura 24 – Efeito do tempo de hibridização entre as sequências *probe* e *target* na resposta analítica do genossensor, analisada através da resposta do mediador redox. Hibridização realizada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $1,725\ \mu\text{g mL}^{-1}$ do *target* em $25\ \text{mmol L}^{-1}$ PB + $1\ \text{mmol L}^{-1}$ MgCl_2 durante 5, 15 e 30 minutos. SWV em quatro eletrodos ($n = 4$) com os parâmetros: $f = 15\ \text{Hz}$, $A = 100\ \text{mV}$ e $\Delta E = 1\ \text{mV}$ em $10\ \text{mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,01\ \text{mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2

Fonte: Elaborada pelo autor

dessa etapa, onde se observa que, devido às maiores concentrações de íons de Na^+ e K^+ , o PBS apresentou a maior eficiência para a detecção do *target* e, portanto, será utilizado como tampão para a hibridização.

5.10 Curva analítica

A curva analítica permite estudar o processo de adsorção do Ru (III) nas fitas de DNA através de modelos teóricos. A Figura 26 apresenta a modelagem das curvas de calibração para as três sequências utilizadas: complementar, dsDNA; não-complementar, ncDNA e a sequência com 4 *mismatches*, M_4DNA , obtidos pelo modelo de Langmuir-Freundlich. Um dos parâmetros mais importantes desse modelo é o Q_{SAT} , que indica a quantidade máxima de uma substância que pode ser adsorvida. Observa-se saturação do sinal eletroquímico em $(0,84 \pm 0,01)\ \mu A$ para a dsDNA, enquanto para a M_4DNA esse valor é inferior, na faixa de $(0,7 \pm 0,2)\ \mu A$. Esse resultado confirma que quando a sonda está hibridizada com o *target*, uma maior quantidade do mediador Ru (III) interage com as sequências de DNA na superfície das MPs, evidenciado pelo maior valor de corrente na sua oxirredução, em comparação com as outras sequências. Além dos pontos de saturação, outro parâmetro do modelo de Langmuir-Freundlich é o fator de adsorção, que indica quão

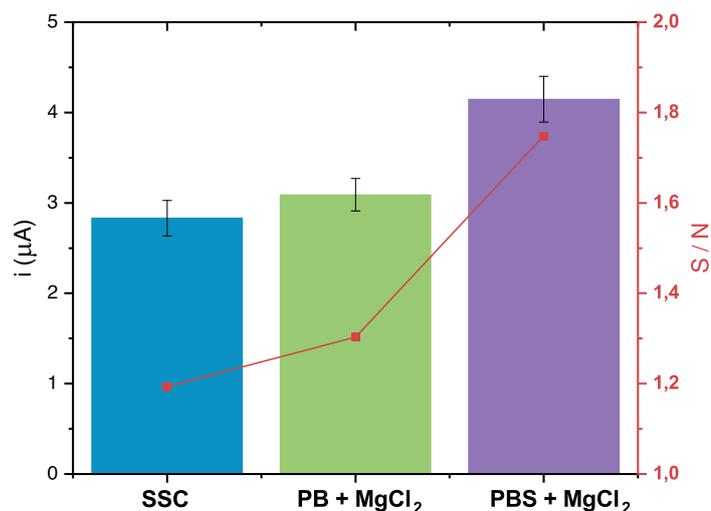


Figura 25 – Efeito do tampão na eficiência de hibridização e conseqüentemente, na resposta analítica do genossensor, analisada através da resposta redox do mediador redox. Hibridização realizada a $50\text{ }^\circ\text{C}$ com $2,76\ \mu\text{g mL}^{-1}$ do *target* em diferentes tampões ($1\times$ SSC; $25\ \text{mmol L}^{-1}$ PB + $1\ \text{mmol L}^{-1}$ MgCl_2 ; $10\ \text{mmol L}^{-1}$ PBS + $1\ \text{mmol L}^{-1}$ MgCl_2) durante 30 minutos. SWV em 3 eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15\ \text{Hz}$, $A = 100\ \text{mV}$ e $\Delta E = 1\ \text{mV}$ em $10\ \text{mmol L}^{-1}$ de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,01\ \text{mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2. A concentração de Ru (III) foi $4\ \text{mmol L}^{-1}$ em PBS $10\ \text{mmol L}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor

homogêneos são os sítios de interação. Obteve-se n igual a $0,57 \pm 0,08$ e $0,8 \pm 0,6$ para dsDNA e M_4DNA , respectivamente, indicando uma adsorção heterogênea para as duas sequências. A Tabela 5 apresenta os parâmetros da equação de Sips para as sequências. Ressalta-se que a sequência não-complementar não pode ser modelada por nenhum tipo de modelo de adsorção, então foi feito o ajuste linear.

Tabela 5 – Parâmetros da equação de Sips para adsorção do Ru III nas sequências complementar e M_4DNA

Sequência	Parâmetros				Modelo
	Q_{SAT}	K_S	n	R^2	
dsDNA	$0,84 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,08$	0,99	Langmuir-Freundlich
M_4DNA	$0,7 \pm 0,1$	$0,02 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,6$	0,97	Langmuir-Freundlich

Fonte: Elaborada pelo autor

A sensibilidade, o limite de detecção e o limite de quantificação para as sequências complementar e M_4 estão na Tabela 6. A partir das curvas de calibração, os limites de

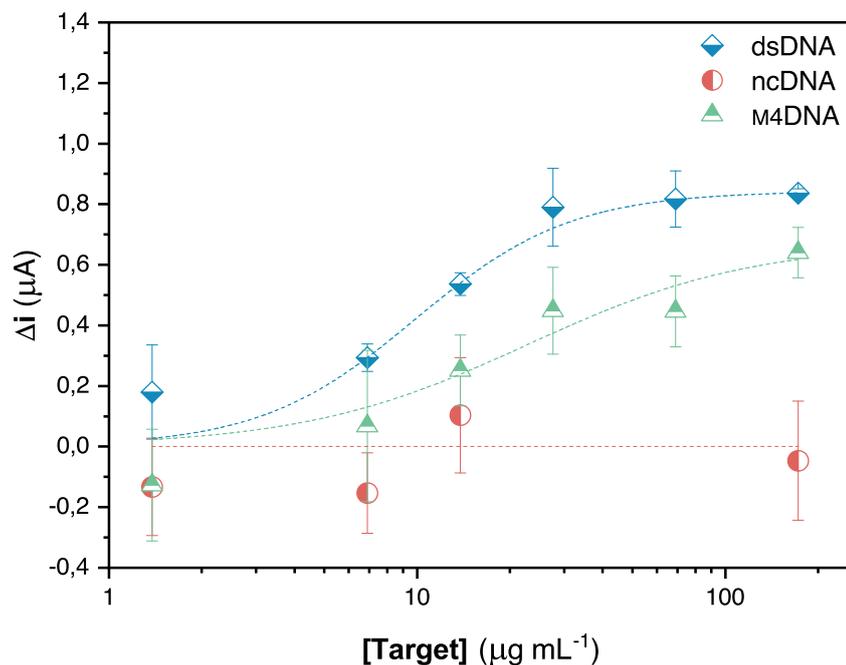


Figura 26 – Curvas de calibração obtidas a partir do espectro de corrente por concentração, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, das sequências: dsDNA referente à sequência complementar; ncDNA referente à sequência não-complementar e M4DNA referente à sequência com 4 *mismatches*. Hibridização realizada a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ com diferentes concentrações de DNA em 25 mmol L^{-1} PB + 1 mmol L^{-1} MgCl_2 durante 30 minutos. SWV em 3 eletrodos ($n = 3$) com os parâmetros: $f = 15\text{ Hz}$, $A = 100\text{ mV}$ e $\Delta E = 1\text{ mV}$ em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $0,01\text{ mol L}^{-1}$ PBS, pH 7,2

Fonte: Elaborada pelo autor

detecção e quantificação foram calculados da resposta da corrente. Os limites de detecção variam de $2,03$ a $4,52\ \mu\text{g mL}^{-1}$, e o limite de quantificação de $6,78$ a $15,05\ \mu\text{g mL}^{-1}$ para as sequências complementar e M4, respectivamente. Como esperado, tanto o limite de detecção quanto o limite de quantificação foram menores para a sequência complementar do que para a M4, assim como a sensibilidade foi maior para a sequência complementar. Supõe-se que erros de pareamento exercem uma interferência negativa na interação do Ru (III) com as fitas de DNA, seja atrapalhando que fitas adjacentes se hibridizem devido à criação de 'loops' na dupla-hélice ou a repulsão eletrostática entre moléculas de Ru (III) que se aproximam com a formação desses loops. O limite de detecção do genossensor não é comparável com biossensores desenvolvidos com outras metodologias, por exemplo biossensores com marcadores eletroquímicos (6 nmol L^{-1}),⁸⁹ AuNPs (2000 pmol L^{-1}),¹²⁰ anticorpo conjugado peroxidase de rábano (Ab-HRP, 3 pmol L^{-1}) e¹²¹ $\text{Fe}_3\text{O}_4 - \text{Au}@\text{Ag}$ NPs ($12,6\text{ attomol L}^{-1}$).¹²² Porém, uma das principais vantagens dessa metodologia é a capacidade de detecção do analito em matrizes complexas com a utilização de MPs para a

pré-concentração da amostra, uma vez que biossensores com metodologias similares não tiveram êxito.⁸⁹ Ademais, percebe-se que o genossensor apresenta boa seletividade, já que é capaz de distinguir entre o *target* e a sequência M4, que possuem somente 17% de diferença entre si. Ressalte-se, também, que já existem genossensores capazes de detectar o erro de pareamento de apenas um único par de bases.¹²³⁻¹²⁷ Na maioria dos casos, esses biossensores são produzidos com extensas etapas de amplificação de sinal, utilizam técnicas sofisticadas e/ou marcadores, o que acaba por encarecer demasiadamente a metodologia.

Tabela 6 – Limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade do genossensor para as sequências utilizadas

Sequência	Parâmetro		
	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Sensibilidade (10^{-8} , $\mu\text{A } \mu\text{g}^{-1} \text{ mL}$)
dsDNA	2,03	6,78	$3,8 \pm 0,3$
M4	4,52	15,05	$1,8 \pm 0,5$

Fonte: Elaborada pelo autor

5.10.1 Detecção do *target* em amostras biológicas

Os estudos de otimização, detecção do *target* e seus interferentes em amostras sintéticas são importantes para construir biossensores. Para validar a metodologia desenvolvida, foi realizada a detecção do analito em extratos celulares de linhagens celulares de câncer colorretal SW620 (linhagem de células metastáticas) e HT-29 (linhagem de células originárias de pólipos colorretais) enviados pelo Hospital de Amor de Barretos. Para tanto, os extratos foram enriquecidos com o *target* nas concentrações de $6,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $69 \mu\text{g mL}^{-1}$, e diluídos no tampão de hibridização. Na Figura 27 são mostradas as variações da corrente redox para as amostras em comparação às obtidas em PBS. Os níveis do *target* recuperados foram semelhantes para as duas linhagens nas concentrações testadas, com exceção da menor concentração para a linhagem SW620, que apresentou a pior taxa de recuperação como mostra a Tabela 7. Apesar da taxa de recuperação insatisfatória na linhagem SW620 para baixas concentrações do analito, essa linhagem é de câncer em estágio IV (metastático). Portanto, não apresenta relevância clínica para o diagnóstico precoce. Ainda assim, é importante examinar o desempenho analítico do genossensor em tais tipos de amostras, uma vez que ainda não se sabe a influência da *F. nucleatum* em metástases e nem se a bactéria é capaz de migrar para outros órgãos junto com o tumor. Saliente-se que tais resultados de recuperação já eram esperados, uma vez que a metodologia proposta é baseada na interação eletrostática, de modo que o pH do meio ou proteínas carregadas possam influenciar no resultado, sendo necessária a aplicação de tratamentos estatísticos para obter resultados com maior confiança. Dito isso, esses

resultados indicam o potencial da utilização dessa metodologia para a detecção da *F. nucleatum* em amostras de pacientes como uma ferramenta para o diagnóstico precoce.

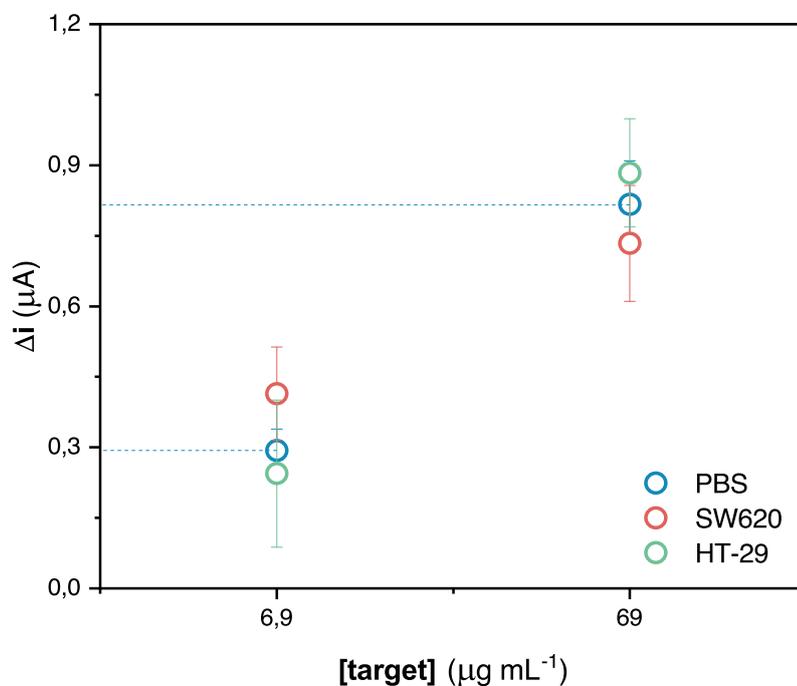


Figura 27 – Resposta voltamétrica para 6,9 e 69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ nas linhagens celulares SW620 e HT-29 de câncer colorretal. Medidas realizadas com SWV. Parâmetros: $f = 15$ Hz, $A = 100$ mV e $\Delta E = 1$ mV em 10 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em 0,01 mol L^{-1} PBS, pH 7,2

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 7 – Resultados dos testes de recuperação para o *target* em extratos celulares de linhagens de câncer colorretal (SW620 e HT-29)

Amostra	Concentração do <i>target</i>		Recuperação (%)
	Adicionado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
SW620	6,9	9,7	141 \pm 45
	69	62,0	89 \pm 15
HT-29	6,9	5,9	85 \pm 16
	69	74,7	108 \pm 14

Fonte: Elaborada pelo autor

6 CONCLUSÃO

Nesta dissertação foi desenvolvida uma metodologia eletroquímica simples, de baixo custo e descartável para a detecção de material genético da *Fusobacterium nucleatum* em matrizes complexas. O genossensor foi constituído de eletrodos de carbono impressos (SPCEs) e micropartículas magnéticas (MPs) com pequenas sequências de DNA imobilizadas. A aplicabilidade do genossensor para análises clínicas foi comprovada com detecção do biomarcador em células cancerosas de câncer colorretal, numa evidência que a metodologia pode ser empregada para diagnóstico precoce da doença. Esse desempenho do genossensor só foi possível a partir de um estudo sistemático de otimização, em que foram testados diferentes parâmetros analíticos em medidas de voltametria de onda quadrada. Em particular, foram realizadas diversas etapas de otimização, como a otimização da concentração de MPs capturadas na superfície do eletrodo, temperatura e tempo de hibridização e escolha do melhor tampão para hibridização. As etapas de caracterização óptica e eletroquímica foram importantes para compreender os mecanismos de interação entre os componentes do dispositivo, característica essencial para os procedimentos de otimização. Dos estudos com voltametria cíclica observou-se uma transferência de elétrons mais eficiente com a utilização de MPs, resultando no aumento da área eletroativa do eletrodo. Com espectrometria no infravermelho confirmou-se a formação das ligações covalentes entre os grupos carboxílicos das MPs e o grupo amina das sequências de DNA, comprovando sua imobilização na superfície das MPs. Como a sensibilidade é um requisito essencial para metodologias de diagnóstico de doenças, foi realizado um estudo para a amplificação do sinal eletroquímico do mediador redox Ru (III). Além disso, a escolha pela utilização de MPs para pré-concentração e redução do efeito de interferentes mostrou-se apropriada para permitir a determinação analítica do *target* em extratos celulares de câncer colorretal (SW620 e HT-29). É relevante considerar que quaisquer biomoléculas carregadas poderiam sequestrar o Ru (III), inviabilizando sua detecção precisa.

A principal contribuição desta dissertação foi o desenvolvimento de genossensores de baixo custo. Para efeito de comparação, os dispositivos aqui desenvolvidos apresentam custos de aproximadamente R\$ 36,22, que devem ser comparados com os custos de uma colonoscopia, cerca de R\$ 600,00, e de um exame de RT-PCR R\$ 280,00, uma redução de custos de 16,6 vezes em relação à colonoscopia e de 7,7 vezes em relação à RT-PCR. Além disso, a maior vantagem dos genossensores está na simplicidade de manipulação das amostras, que não requerem equipamentos sofisticados e pessoal especializado para realizar o pré-tratamento de amostras (extração de DNA e digestão com enzimas de restrição). Neste aspecto, é importante ressaltar que os genossensores aqui desenvolvidos podem ser concebidos como sistemas de produção em massa para a testagem rápida e não-invasiva,

característica importante em situações de pandemia como a que o Brasil vive. Ressalte-se, também, que a *F. nucleatum* não é capaz de desenvolver o câncer, de modo que a sua detecção não é, por si só, um indicativo da presença da doença. Sabe-se, contudo, que existe uma relação entre a presença da *Fusobacterium nucleatum* e o desenvolvimento de CCR, já que essa bactéria vem sendo isolada em amostras de pacientes doentes. Desse modo, um genossensor que detecte essa bactéria pode ser uma ferramenta importante para o planejamento de eventual intervenção (tratamento com antibióticos ou cirurgias) e/ou uma previsão de evolução do quadro clínico (prognóstico).

Da possibilidade de detecção com medida direta da hibridização como nos genossensores, sem necessidade de marcação das sequências, podem ser propostos novos trabalhos para diagnóstico precoce da CCR. Por exemplo, a hibridização também pode ser detectada por técnicas de impedância elétrica¹²⁸ e ópticas,^{129,130} de maneira que a otimização realizada para obter um genossensor eficiente pode ser aproveitada com essas outras técnicas. Uma outra extensão do presente trabalho seria o teste do genossensor com amostras de pacientes saudáveis, principalmente porque o desempenho analítico do dispositivo em amostras de pacientes pode diferir do obtido em amostras sintéticas. Note-se, a propósito, que nos testes com as células SW620 e HT-29 realizados neste trabalho apareceu um efeito da matriz, pois este extrato de células contém altas concentrações de soro fetal bovino (10%), 2 mmol L⁻¹ glutamina, 1% penicilina/estreptomicina, o que se refletiu numa determinação imprecisa da concentração do biomarcador. Tais efeitos podem ser ainda mais relevantes para o uso em larga escala dos genossensores. Com a experiência recente de trabalhos com genossensores e outros tipos de biossensores, essas limitações podem ser eliminadas com o uso de técnicas estatísticas e computacionais, especialmente aprendizado de máquina.¹²⁰ Essa abordagem computacional permite estabelecer padrões nos resultados dos genossensores, minimizando efeitos da variabilidade intrínseca de amostras biológicas.

Mencione-se, por fim, que a plataforma de sensoriamento apresentada não é exclusiva para o biomarcador utilizado. Ela pode ser reproduzida tanto com diferentes transdutores (ópticos, eletro-ópticos, etc), como já mencionado, quanto com diferentes sequências de DNA (biomarcadores). Além do mais, os resultados indicam que a metodologia desenvolvida é promissora para sua integração com a tecnologia PCR, destinada à detecção de sequências de DNA em concentrações mínimas.

6.1 Perspectivas futuras

Como perspectivas para futuras aplicações clínicas, espera-se que a metodologia desenvolvida permita armazenar diversas biomoléculas imobilizadas nas MPs (aproximadamente 4 °C) para ser facilmente empregadas para diagnósticos. Estas MPs permitiriam reconhecer uma região específica do genoma de bactérias e separar, por meio de suas propriedades magnéticas, o analito de interesse dentro da amostra com minimização dos

efeitos de matriz. Um possível trabalho futuro é empregar os genossensores para a análise de amostras de fezes de pacientes, num sistema de diagnósticos não-invasivos. Poderão, também, ser testadas outras metodologias para tratar as amostras de células lisadas, sem as altas concentrações de soro fetal bovino. Uma possibilidade seria utilizar soro humano em baixas concentrações durante cultivo celular. O dispositivo é promissor para uso em testes rápidos, para detectar tanto a ausência quanto a presença de biomarcadores ou patógenos.

REFERÊNCIAS

- 1 LIM, J. M. *et al.* Electrochemical peptide sensor for diagnosing adenoma-carcinoma transition in colon cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 98, p. 330–337, 2017. DOI: 10.1016/j.bios.2017.07.013.
- 2 BIBBINS-DOMINGO, K. *et al.* Screening for colorectal cancer: Us preventive services task force recommendation statement. **Jama**, American Medical Association, v. 315, n. 23, p. 2564–2575, 2016. DOI: 10.1001/jama.2016.5989.
- 3 ARNOLD, M. *et al.* Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. **Gut**, BMJ Publishing Group, v. 66, n. 4, p. 683–691, 2017. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
- 4 COLORECTAL Cancer Risk Factors. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>. Acesso em: 14 de Abril 2021.
- 5 BULLMAN, S. *et al.* Analysis of fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 358, n. 6369, p. 1443–1448, 2017. DOI: 10.1126/science.aal5240.
- 6 MARTEL, C. de *et al.* Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. **Lancet Global Health**, Elsevier, v. 8, n. 2, p. e180–e190, 2020. DOI: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
- 7 SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA**, Wiley Online Library, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI: 10.3322/caac.21660.
- 8 CHOI, J.-W. *et al.* Proteomic and cytokine plasma biomarkers for predicting progression from colorectal adenoma to carcinoma in human patients. **Proteomics**, Wiley Online Library, v. 13, n. 15, p. 2361–2374, 2013. DOI: 10.1002/pmic.201200550.
- 9 ISLAM, F. *et al.* An electrochemical method for sensitive and rapid detection of fam134b protein in colon cancer samples. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00206-8.
- 10 DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical dna sensors. **Nature Biotechnology**, Nature Publishing Group, v. 21, n. 10, p. 1192–1199, 2003. DOI: 10.1038/nbt873.
- 11 LABUDA, J. *et al.* Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms, and methodology (iupac technical report). **Pure and Applied Chemistry**, De Gruyter, v. 82, n. 5, p. 1161–1187, 2010. DOI: 10.1351/PAC-REP-09-08-16.
- 12 AVERY, O. T.; MACLEOD, C. M.; MCCARTY, M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. **Journal of experimental medicine**, Rockefeller University Press, v. 79, n. 2, p. 137–158, 1944. DOI: 10.1084/jem.79.2.137.

- 13 CHARGAFF, E. *et al.* The composition of the desoxypentose nucleic acids of thymus and spleen. **Journal of Biological Chemistry**, Elsevier, v. 177, n. 1, p. 405–416, 1949.
- 14 CHARGAFF, E. Structure and function of nucleic acids as cell constituents. **Federation Proceedings**, v. 10, n. 3, p. 654–659, 1951.
- 15 HERSHEY, A. D.; CHASE, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. **Journal of General Physiology**, The Rockefeller University Press, v. 36, n. 1, p. 39–56, 1952. DOI: 10.1085/jgp.36.1.39.
- 16 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953. DOI: 10.1038/171737a0.
- 17 ELEY, D.; SPIVEY, D. Semiconductivity of organic substances. part 9.—nucleic acid in the dry state. **Transactions of the Faraday Society**, Royal Society of Chemistry, v. 58, p. 411–415, 1962. DOI: 10.1039/TF9625800411.
- 18 ELEY, D.; LESLIE, R. Conduction in nucleic acid components. **Nature**, Nature Publishing Group, v. 197, n. 4870, p. 898–898, 1963. DOI: 10.1038/197898a0.
- 19 MURPHY, E. Forensic dna typing. **Annual Review of Criminology**, Annual Reviews, v. 1, p. 497–515, 2018. DOI: /10.1146/annurev-criminol-032317-092127.
- 20 BUTLER, J. M. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. **Journal of Forensic Sciences**, Wiley Online Library, v. 51, n. 2, p. 253–265, 2006. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x.
- 21 ILIE, M. *et al.* Optimization of egfr mutation detection by the fully-automated qpcr-based idylla system on tumor tissue from patients with non-small cell lung cancer. **Oncotarget**, Impact Journals, LLC, v. 8, n. 61, p. 103055, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.21476.
- 22 RASOOLY, A.; HEROLD, K. E. Food microbial pathogen detection and analysis using dna microarray technologies. **Foodborne Pathogens and Disease**, Mary Ann Liebert, v. 5, n. 4, p. 531–550, 2008. DOI: 10.1089/fpd.2008.0119.
- 23 SPIESS, B. *et al.* Dna microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Am Soc Microbiol, v. 45, n. 11, p. 3743–3753, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00942-07.
- 24 GENETIC Disorders. 2021. Disponível em: <https://www.genome.gov/For-Patients-and-Families/Genetic-Disorders>. Acesso em: 14 de Abril 2021.
- 25 AUSTRALIAN Government. Genetic Disorders. 2021. Disponível em: <https://www.healthdirect.gov.au/genetic-disorders>. Acesso em: 14 de Abril 2021.
- 26 ALBERTS, B. *et al.* Molecular biology of the cell. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, SCANDINAVIAN UNIV PRESS, v. 32, n. 2, p. 125–125, 2003.
- 27 HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 246, n. 4930, p. 629–634, 1989. DOI: 10.1126/science.2683079.

-
- 28 SAPKOTA, A. **Cell Cycle - definition, phases, regulation and checkpoints**. 2020. Disponível em: <https://microbenotes.com/cell-cycle/>. Acesso em: 06 de Abril de 2021.
- 29 HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. **Molecular Oncology**, Wiley Online Library, v. 6, n. 2, p. 140–146, 2012. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.01.010.
- 30 BHATT, A. N. *et al.* Cancer biomarkers-current perspectives. **Indian Journal of Medical Research**, v. 132, n. 2, p. 129–149, 2010.
- 31 LECH, G. *et al.* Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. **World Journal of Gastroenterology**, Baishideng Publishing Group Inc, v. 22, n. 5, p. 1745, 2016. DOI: 10.3748/wjg.v22.i5.1745.
- 32 VALDERRAMA-TREVIÑO, A. I. *et al.* Hepatic metastasis from colorectal cancer. **Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology**, Jaypee Brothers Medical Publishing, v. 7, n. 2, p. 166, 2017. DOI: 10.5005/jp-journals-10018-1241.
- 33 CHEN, C.-C. *et al.* Is it reasonable to add preoperative serum level of cea and ca19-9 to staging for colorectal cancer? **Journal of Surgical Research**, Elsevier, v. 124, n. 2, p. 169–174, 2005. DOI: 10.1016/j.jss.2004.08.013.
- 34 BEHBEHANI, A. *et al.* Prognostic significance of cea and ca 19–9 inc colorectal cancer in kuwait. **International Journal of Biological Markers**, SAGE Publications Sage UK: London, England, v. 15, n. 1, p. 51–55, 2000.
- 35 ARMAGHANY, T. *et al.* Genetic alterations in colorectal cancer. **Gastrointestinal Cancer Research: GCR**, International Society of Gastrointestinal Oncology, v. 5, n. 1, p. 19, 2012.
- 36 ABED, J. *et al.* Fap2 mediates fusobacterium nucleatum colorectal adenocarcinoma enrichment by binding to tumor-expressed gal-galnac. **Cell Host & Microbe**, Elsevier, v. 20, n. 2, p. 215–225, 2016. DOI: 10.1016/j.chom.2016.07.006.
- 37 YU, T. *et al.* Fusobacterium nucleatum promotes chemoresistance to colorectal cancer by modulating autophagy. **Cell**, Elsevier, v. 170, n. 3, p. 548–563, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.07.008.
- 38 ZHAO, J.-S.; MANNO, D.; HAWARI, J. *Psychrilyobacter atlanticus* gen. nov., sp. nov., a marine member of the phylum fusobacteria that produces h₂ and degrades nitramine explosives under low temperature conditions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Microbiology Society, v. 59, n. 3, p. 491–497, 2009. DOI: 10.1099/ijs.0.65263-0.
- 39 MCCOY, A. N. *et al.* Fusobacterium is associated with colorectal adenomas. **PloS One**, Public Library of Science, v. 8, n. 1, p. e53653, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0053653.
- 40 KOSTIC, A. D. *et al.* Fusobacterium nucleatum potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. **Cell Host & Microbe**, Elsevier, v. 14, n. 2, p. 207–215, 2013. DOI: 10.1016/j.chom.2013.07.007.
- 41 ITO, M. *et al.* Su2020 fusobacterium nucleatum is associated with clinical and molecular features in colorectal serrated pathway. **Gastroenterology**, Elsevier, v. 148, n. 4, p. S–576, 2015. DOI: 10.1002/ijc.29488.

- 42 KRISANAPRAKORNKIT, S. *et al.* Inducible expression of human β -defensin 2 by fusobacterium nucleatum in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. **Infection and Immunity**, Am Soc Microbiol, v. 68, n. 5, p. 2907–2915, 2000. DOI: 10.1128/IAI.68.5.2907-2915.2000.
- 43 MIMA, K. *et al.* Fusobacterium nucleatum and t cells in colorectal carcinoma. **JAMA Oncology**, American Medical Association, v. 1, n. 5, p. 653–661, 2015. DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.1377.
- 44 BRENNAN, C. A.; GARRETT, W. S. Fusobacterium nucleatum—symbiont, opportunist and oncobacterium. **Nature Reviews Microbiology**, Nature Publishing Group, v. 17, n. 3, p. 156–166, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0129-6.
- 45 ABED, J. *et al.* Colon cancer-associated fusobacterium nucleatum may originate from the oral cavity and reach colon tumors via the circulatory system. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 10, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00400.
- 46 HATAKEYAMA, M. Helicobacter pylori caga and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. **Cell Host & Microbe**, Elsevier, v. 15, n. 3, p. 306–316, 2014. DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.008.
- 47 METZGAR, D. *et al.* Broad-spectrum biosensor capable of detecting and identifying diverse bacterial and candida species in blood. **Journal of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, v. 51, n. 8, p. 2670–2678, 2013. DOI: 10.1128/JCM.00966-13.
- 48 CASTELLARIN, M. *et al.* Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. **Genome Research**, Cold Spring Harbor Lab, v. 22, n. 2, p. 299–306, 2012. DOI: 10.1101/gr.126516.111.
- 49 YAMAMURA, K. *et al.* Human microbiome fusobacterium nucleatum in esophageal cancer tissue is associated with prognosis. **Clinical Cancer Research**, AACR, v. 22, n. 22, p. 5574–5581, 2016. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1786.
- 50 KOMIYA, Y. *et al.* Patients with colorectal cancer have identical strains of fusobacterium nucleatum in their colorectal cancer and oral cavity. **Gut**, BMJ Publishing Group, v. 68, n. 7, p. 1335–1337, 2019. DOI: 10.1136/gutjnl-2018-316661.
- 51 ZHANG, D.; HUANG, M. C.; ALOCILJA, E. C. A multiplex nanoparticle-based bio-barcoded dna sensor for the simultaneous detection of multiple pathogens. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 26, n. 4, p. 1736–1742, 2010. DOI: 10.1016/j.bios.2010.08.012.
- 52 NIRSCHL, M.; REUTER, F.; VÖRÖS, J. Review of transducer principles for label-free biomolecular interaction analysis. **Biosensors**, Molecular Diversity Preservation International, v. 1, n. 3, p. 70–92, 2011. DOI: 0.3390/bios1030070.
- 53 GAUGLITZ, G. Direct optical sensors: principles and selected applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Springer, v. 381, n. 1, p. 141–155, 2005. DOI: 10.1007/s00216-004-2895-4.

-
- 54 PATOLSKY, F.; LICHTENSTEIN, A.; WILLNER, I. Electronic transduction of dna sensing processes on surfaces: amplification of dna detection and analysis of single-base mismatches by tagged liposomes. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 123, n. 22, p. 5194–5205, 2001. DOI: 10.1021/ja0036256.
- 55 FRITZ, J. *et al.* Translating biomolecular recognition into nanomechanics. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 288, n. 5464, p. 316–318, 2000. DOI: 10.1126/science.288.5464.316.
- 56 RAMANATHAN, K.; DANIELSSON, B. Principles and applications of thermal biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 16, n. 6, p. 417–423, 2001. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00124-5.
- 57 HUANG, Y. *et al.* Disease-related detection with electrochemical biosensors: a review. **Sensors**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 17, n. 10, p. 2375, 2017. DOI: 10.3390/s17102375.
- 58 TOPKAYA, S. N. *et al.* Electrochemical dna biosensor for detecting cancer biomarker related to glutathione s-transferase p1 (gstp1) hypermethylation in real samples. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 31, n. 1, p. 516–522, 2012. DOI: 10.1016/j.bios.2011.11.029.
- 59 HERNÁNDEZ-SANTOS, D. *et al.* Enzymatic genosensor on streptavidin-modified screen-printed carbon electrodes. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 76, n. 23, p. 6887–6893, 2004. DOI: 10.1021/ac048892z.
- 60 CSÁKI, A.; MÖLLER, R.; FRITZSCHE, W. Gold nanoparticles as novel label for dna diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Taylor & Francis, v. 2, n. 2, p. 187–193, 2002. DOI: 10.1586/14737159.2.2.187.
- 61 FURST, A. L.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrocatalysis in dna sensors. **Polyhedron**, Elsevier, v. 84, p. 150–159, 2014. DOI: 10.1016/j.poly.2014.07.005.
- 62 CANDIANI, A. *et al.* Label-free dna biosensor based on a peptide nucleic acid-functionalized microstructured optical fiber-bragg grating. **Journal of Biomedical Optics**, International Society for Optics and Photonics, v. 18, n. 5, p. 057004, 2013. DOI: 10.1117/1.JBO.18.5.057004.
- 63 ZWANG, T. J.; TSE, E. C.; BARTON, J. K. Sensing dna through dna charge transport. **ACS Chemical Biology**, ACS Publications, v. 13, n. 7, p. 1799–1809, 2018. DOI: 10.1021/acscchembio.8b00347.
- 64 RAFIEE-POUR, H.-A.; BEHPOUR, M.; KESHAVARZ, M. A novel label-free electrochemical mirna biosensor using methylene blue as redox indicator: application to breast cancer biomarker mirna-21. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 77, p. 202–207, 2016. DOI: 10.1016/j.bios.2015.09.025.
- 65 DAS, J. *et al.* Dna clutch probes for circulating tumor dna analysis. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 138, n. 34, p. 11009–11016, 2016. DOI: 10.1021/jacs.6b05679.

- 66 CAMPOS, R.; FERAPONTOVA, E. E. Electrochemistry of weakly adsorbed species: Voltammetric analysis of electron transfer between gold electrodes and ru hexaamine electrostatically interacting with dna duplexes. **Electrochimica Acta**, Elsevier, v. 126, p. 151–157, 2014. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.07.083.
- 67 JENSEN, G. C. *et al.* Inkjet-printed gold nanoparticle electrochemical arrays on plastic. application to immunodetection of a cancer biomarker protein. **Physical Chemistry Chemical Physics**, Royal Society of Chemistry, v. 13, n. 11, p. 4888–4894, 2011. DOI: 10.1039/C0CP01755H.
- 68 TANG, C. K.; VAZE, A.; RUSLING, J. F. Fabrication of immunosensor microwell arrays from gold compact discs for detection of cancer biomarker proteins. **Lab on a Chip**, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 2, p. 281–286, 2012. DOI: 10.1039/C1LC20833K.
- 69 AFONSO, A. S. *et al.* Simple and rapid fabrication of disposable carbon-based electrochemical cells using an electronic craft cutter for sensor and biosensor applications. **Talanta**, Elsevier, v. 146, p. 381–387, 2016. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.09.002.
- 70 ULIANA, C. V. *et al.* Fully disposable microfluidic electrochemical device for detection of estrogen receptor alpha breast cancer biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 99, p. 156–162, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2017.07.043.
- 71 RAMA, E. C.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; COSTA-GARCIA, A. Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructured screen-printed carbon electrodes. **Sensors and Actuators B**, Elsevier, v. 201, p. 567–571, 2014. DOI: 10.1016/j.snb.2014.05.044.
- 72 PING, J. *et al.* Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 34, n. 1, p. 70–76, 2012. DOI: 10.1016/j.bios.2012.01.016.
- 73 JIAN, J.-M. *et al.* Fast and sensitive detection of pb2+ in foods using disposable screen-printed electrode modified by reduced graphene oxide. **Sensors**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 13, n. 10, p. 13063–13075, 2013. DOI: 10.3390/s131013063.
- 74 FANJUL-BOLADO, P. *et al.* Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes. **Analytica Chimica Acta**, Elsevier, v. 638, n. 2, p. 133–138, 2009. DOI: 10.1016/j.aca.2009.02.019.
- 75 BERGAMINI, M. F. **Eletrodos impressos modificados com poli-histidina aplicados na construção de sensores eletroquímicos para crômio(VI) e fármacos**. 2007. 210 p. Tese (Doutorado em Química) — Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- 76 ROCHA-SANTOS, T. A. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier, v. 62, p. 28–36, 2014. DOI: 10.1351/PAC-REP-09-08-16.
- 77 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and applications**. 2nd. ed. USA: Wiley, 2000.

- 78 LISDAT, F.; SCHÄFER, D. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Springer, v. 391, n. 5, p. 1555–1567, 2008. DOI: 10.1007/s00216-008-1970-7.
- 79 ELGRISHI, N. *et al.* A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. **Journal of Chemical Education**, ACS Publications, v. 95, n. 2, p. 197–206, 2018. DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00361.
- 80 MIRCESKI, V.; SKRZYPEK, S.; STOJANOV, L. Square-wave voltammetry. **ChemTexts**, v. 4, n. 17, 2018. DOI: 10.1007/s40828-018-0073-0.
- 81 KENAKIN, T. P. Drug-receptor theory. *In*: KENAKIN, T. P. (ed.). **A pharmacology primer**. 3rd. ed. Cambridge: Academic Press, 2009. p. 43–60.
- 82 BÉNAROUCHE, A. *et al.* Studying gastric lipase adsorption onto phospholipid monolayers by surface tensiometry, ellipsometry, and atomic force microscopy. *In*: GELB, M. H. (ed.). **Enzymology at the membrane interface: interfacial enzymology and protein-membrane binding**. Cambridge: Academic Press, 2017. v. 583, p. 255–278.
- 83 SAHU, O.; SINGH, N. Significance of bioadsorption process on textile industry wastewater. *In*: ISLAM, S. ul; BUTOLA, B. (ed.). **The impact and prospects of green chemistry for textile technology**. Sawston: Woodhead Publishing, 2019. p. 367–416.
- 84 PAL, P. Chapter 3 - adsorption method of arsenic separation from water. *In*: PAL, P. (ed.). **Groundwater arsenic remediation**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2015. p. 71–104.
- 85 AZIZIAN, M. F.; NELSON, P. O. Lead sorption, chemically enhanced desorption, and equilibrium modeling in an iron-oxide-coated sand and synthetic groundwater system. *In*: JENNE, E. A. (ed.). **Adsorption of metals by geomedia**. San Diego: Academic Press, 1998. p. 165–180.
- 86 PASHIN, J. C. Coal as a petroleum source rock and reservoir rock. *In*: SUÁREZ-RUIZ, I.; CRELLING, J. C. (ed.). **Applied coal petrology**. Burlington: Elsevier, 2008. p. 227–262.
- 87 BÉNARD, P.; CHAHINE, R. Carbon nanostructures for hydrogen storage. *In*: WALKER, G. (ed.). **Solid-state hydrogen storage**. Sawston: Woodhead Publishing, 2008. p. 261–287.
- 88 SOARES, A. C. **Filmes nanoestruturados aplicados em biossensores para detecção precoce de câncer de pâncreas**. 2017. 135 p. Tese (Doutorado em Química) — Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.
- 89 CINTI, S. *et al.* Experimental comparison in sensing breast cancer mutations by signal on and signal off paper-based electroanalytical strips. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 92, n. 2, p. 1674–1679, 2019. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02560.
- 90 SIMS, R. A.; HARMER, S. L.; QUINTON, J. S. The role of physisorption and chemisorption in the oscillatory adsorption of organosilanes on aluminium oxide. **Polymers**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 11, n. 3, p. 410, 2019. DOI: 10.3390/polym11030410.

- 91 LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, ACS Publications, v. 40, n. 9, p. 1361–1403, 1918. DOI: 10.1021/ja02242a004.
- 92 ZELDOWITSCH, J. Adsorption site energy distribution. **Acta Physicochimica URSS**, v. 1, n. 1, p. 961–973, 1934.
- 93 SAADI, R. *et al.* Monolayer and multilayer adsorption isotherm models for sorption from aqueous media. **Korean Journal of Chemical Engineering**, Springer, v. 32, n. 5, p. 787–799, 2015. DOI: 10.1007/s11814-015-0053-7.
- 94 TZABAR, N.; BRAKE, H. ter. Adsorption isotherms and sips models of nitrogen, methane, ethane, and propane on commercial activated carbons and polyvinylidene chloride. **Adsorption**, Springer, v. 22, n. 7, p. 901–914, 2016. DOI: 10.1007/s10450-016-9794-9.
- 95 AL-GHOUTI, M. A.; DA'ANA, D. A. Guidelines for the use and interpretation of adsorption isotherm models: A review. **Journal of Hazardous Materials**, Elsevier, v. 393, p. 122383, 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122383.
- 96 OLIVEIRA, R. A. D. *et al.* Disposable microfluidic immunoarray device for sensitive breast cancer biomarker detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, ACS Publications, v. 9, n. 33, p. 27433–27440, 2017. DOI: 10.1021/acsami.7b03350.
- 97 OLIVEIRA, T. R. de *et al.* Fast and flexible strategy to produce electrochemical paper-based analytical devices using a craft cutter printer to create wax barrier and screen-printed electrodes. **Talanta**, Elsevier, v. 195, p. 480–489, 2019. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.11.047.
- 98 ANDREOTTI, I. A. de A. *et al.* Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Elsevier, v. 840, p. 109–116, 2019. DOI: 10.1016/j.jelechem.2019.03.059.
- 99 FAVA, E. L. *et al.* New disposable electrochemical paper-based microfluidic device with multiplexed electrodes for biomarkers determination in urine sample. **Electroanalysis**, Wiley Online Library, v. 32, n. 5, p. 1075–1083, 2020. DOI: 10.1002/elan.201900641.
- 100 SAM, S. *et al.* Semiquantitative study of the edc/nhs activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. **Langmuir**, ACS Publications, v. 26, n. 2, p. 809–814, 2010. DOI: 10.1021/la902220a.
- 101 FISCHER, M. Amine coupling through edc/nhs: a practical approach. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 627, p. 55–73, 01 2010. DOI: 10.1007/978-1-60761-670-2_3.
- 102 BARTCZAK, D.; KANARAS, A. G. Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot edc/sulfo-nhs coupling. **Langmuir**, ACS Publications, v. 27, n. 16, p. 10119–10123, 2011. DOI: 10.1021/la2022177.
- 103 BATISTUTI, M. R. **Detecção de alterações relacionadas ao câncer de mama através de sensores de carga ou massa acoplados a monocamadas de DNA**. 2017. 124 p. Tese (Doutorado em Química) — Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

- 104 TATAUROV, A. V.; YOU, Y.; OWCZARZY, R. Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids. **Biophysical Chemistry**, Elsevier, v. 133, n. 1-3, p. 66–70, 2008. DOI: 10.1016/j.bpc.2007.12.004.
- 105 FARIA, H. A. M. **Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos vírus da zika e da dengue**. 2016. 119 p. Tese (Doutorado em Física Aplicada) — Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.
- 106 SIGMA-ALDRICH. **IR Spectrum Table & Chart**. 2020. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html#ir-table-by-compound>. Acesso em: 16 de Novembro 2020.
- 107 SEREC, K. *et al.* Effect of magnesium ions on the structure of dna thin films: an infrared spectroscopy study. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press, v. 44, n. 17, p. 8456–8464, 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw696.
- 108 MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. Changes in the infrared microspectroscopic characteristics of dna caused by cationic elements, different base richness and single-stranded form. **PLOS ONE**, Public Library of Science, v. 7, n. 8, p. e43169, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0043169.
- 109 HSING, I.-M.; XU, Y.; ZHAO, W. Micro-and nano-magnetic particles for applications in biosensing. **Electroanalysis**, Wiley Online Library, v. 19, n. 7-8, p. 755–768, 2007. DOI: 10.1002/elan.200603785.
- 110 JIANRONG, C. *et al.* Nanotechnology and biosensors. **Biotechnology Advances**, Elsevier, v. 22, n. 7, p. 505–518, 2004. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2004.03.004.
- 111 MAZZARACCHIO, V. *et al.* Inside the different types of carbon black as nanomodifiers for screen-printed electrodes. **Electrochimica Acta**, Elsevier, v. 317, p. 673–683, 2019. DOI: 10.1016/j.electacta.2019.05.117.
- 112 LAPIERRE, M. A. *et al.* Electrocatalytic detection of pathogenic dna sequences and antibiotic resistance markers. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 75, n. 22, p. 6327–6333, 2003. DOI: 10.1021/ac0349429.
- 113 DAS, J. *et al.* An ultrasensitive universal detector based on neutralizer displacement. **Nature Chemistry**, Nature Publishing Group, v. 4, n. 8, p. 642–648, 2012. DOI: 10.1038/nchem.1367.
- 114 LABIB, M.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. **Chemical Reviews**, ACS Publications, v. 116, n. 16, p. 9001–9090, 2016. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00220.
- 115 HASHKAVAYI, A. B.; RAOOF, J. B. Design an aptasensor based on structure-switching aptamer on dendritic gold nanostructures/fe₃o₄@ sio₂/dabco modified screen printed electrode for highly selective detection of epirubicin. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 91, p. 650–657, 2017. DOI: 10.1016/j.bios.2017.01.025.
- 116 MOCCIA, M. *et al.* Paper-based electrochemical peptide nucleic acid (pna) biosensor for detection of mirna-492: a pancreatic ductal adenocarcinoma biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 165, p. 112371, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112371.

- 117 XU, S. *et al.* An electrochemical biosensor for the detection of pb 2+ based on g-quadruplex dna and gold nanoparticles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Springer, v. 410, n. 23, p. 5879–5887, 2018. DOI: 10.1007/s00216-018-1204-6.
- 118 TICHONIUK, M.; LIGAJ, M.; FILIPIAK, M. Application of dna hybridization biosensor as a screening method for the detection of genetically modified food components. **Sensors**, Molecular Diversity Preservation International, v. 8, n. 4, p. 2118–2135, 2008. DOI: 10.3390/s8042118.
- 119 CHEN, D. *et al.* Rapid and ultrasensitive electrochemical detection of circulating tumor dna by hybridization on the network of gold-coated magnetic nanoparticles. **Chemical Science**, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 14, p. 5196–5201, 2021. DOI: 10.1039/D1SC01044A.
- 120 RODRIGUES, V. C. *et al.* Electrochemical and optical detection and machine learning applied to images of genosensors for diagnosis of prostate cancer with the biomarker pca3. **Talanta**, Elsevier, v. 222, p. 121444, 2021. DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121444.
- 121 ALZATE, D. *et al.* Genosensors for differential detection of zika virus. **Talanta**, Elsevier, v. 210, p. 120648, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120648.
- 122 YE, Y. *et al.* Ultrasensitive electrochemical genosensor for detection of camv35s gene with fe_3o_4 -au@ ag nanoprobe. **Talanta**, Elsevier, v. 206, p. 120205, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120205.
- 123 KELLEY, S. O. *et al.* Single-base mismatch detection based on charge transduction through dna. **Nucleic Acids Research**, Oxford University Press, v. 27, n. 24, p. 4830–4837, 1999. DOI: 10.1093/nar/27.24.4830.
- 124 KOHLI, P. *et al.* Dna-functionalized nanotube membranes with single-base mismatch selectivity. **Science**, American Association for the Advancement of Science, v. 305, n. 5686, p. 984–986, 2004. DOI: 10.1126/science.1100024.
- 125 SOSNOWSKI, R. G. *et al.* Rapid determination of single base mismatch mutations in dna hybrids by direct electric field control. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, National Acad Sciences, v. 94, n. 4, p. 1119–1123, 1997. DOI: 10.1073/pnas.94.4.1119.
- 126 HAN, J.; WU, J.; DU, J. Fluorescent dna biosensor for single-base mismatch detection assisted by cationic comb-type copolymer. **Molecules**, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 24, n. 3, p. 575, 2019. DOI: 10.3390/molecules24030575.
- 127 LIU, R. *et al.* Surface plasmon resonance biosensor for sensitive detection of microrna and cancer cell using multiple signal amplification strategy. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier, v. 87, p. 433–438, 2017. DOI: 10.1016/j.bios.2016.08.090.
- 128 MA, H. *et al.* An impedance-based integrated biosensor for suspended dna characterization. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2013. DOI: 10.1038/srep02730.
- 129 CHEN, J. *et al.* Detection of escherichia coli in drinking water using t7 bacteriophage-conjugated magnetic probe. **Analytical Chemistry**, ACS Publications, v. 87, n. 17, p. 8977–8984, 2015. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b02175.

130 RAMAKRISHNAN, P.; TABOR, J. J. Repurposing synechocystis pcc6803 uirs-uirr as a uv-violet/green photoreversible transcriptional regulatory tool in e. coli. **ACS Synthetic Biology**, ACS Publications, v. 5, n. 7, p. 733–740, 2016. DOI: 10.1021/acssynbio.6b00068.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1. MATERON, ELSA M. ; **NASCIMENTO, GUSTAVO F.** ; SHIMIZU, FLAVIO M. ; CÂMARA, AMANDA S. ; SANDRINO, BIANCA ; FARIA, RONALDO C. ; OLIVEIRA, OSVALDO N. Role of sphingomyelin on the interaction of the anticancer drug gemcitabine hydrochloride with cell membrane models. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES, v. 196, p. 111357, 2020.
2. IBÁÑEZ-REDÍN, GISELA ; MATERON, ELSA M. ; FURUTA, ROBERTO H. M. ; WILSON, DEIVY ; **DO NASCIMENTO, GUSTAVO FREITAS** ; MELENDEZ, MATIAS E. ; CARVALHO, ANDRÉ L. ; REIS, RUI MANUEL ; OLIVEIRA, OSVALDO N. ; GONÇALVES, DÉBORA. Screen-printed electrodes modified with carbon black and polyelectrolyte films for determination of cancer marker carbohydrate antigen 19-9. MICROCHIMICA ACTA, v. 187, p. 1, 2020.
3. IBÁÑEZ-REDÍN, G; JOSHI, N; **FREITAS DO NASCIMENTO, G**; WILSON, D; MELENDEZ, M, CARVALHO, A; REIS, R; GONÇALVES, D; OLIVEIRA JR. O.N. Determination of p53 biomarker using an electrochemical immunoassay based on layer- by-layer films with $NiFe_2O_4$ nanoparticles. Microchimica Acta, v. 187, n. 619, p. 1–10, 2020.
4. MATERON, ELSA M. ; SHIMIZU, FLAVIO M. ; FIGUEREDO, KEVIN ; **NASCIMENTO, GUSTAVO F.** ; GERALDO, VANANELIA P. N. ; OLIVEIRA, OSVALDO N. ; FARIA, RONALDO C. Glutathione-s-transferase hinders interaction between anticancer drugs and Langmuir monolayers representing tumor cell membranes. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES (SUBMETIDO).
5. MATERON, E M; IBÁÑEZ-REDÍN, G G; **NASCIMENTO, G F**, Wong, A; Freitas, T A; OLIVEIRA, O N; FARIA, R C. Electrochemical detection of methotrexate in cancer cells and serum samples using unmodified screen-printed carbon electrodes and a cationic surfactant. BIOANALYSIS (SUBMETIDO).