UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO: MESTRADO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE

EVELLYN GONÇALVES DE SOUZA

CATALÃO – GO
2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E

DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[X] Dissertação [ ] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: EVELLYN GONÇALVES DE SOUZA

Título do trabalho: DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Evellyn Gonçalves de Souza

Assinatura da autora

Ciente e de acordo:

Assinatura da orientadora

Data: 12/09/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
REGIONAL CATALÃO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO: MESTRADO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE

Aluna: Evellyn Gonçalves de Souza
Orientadora: Profª. Drª. Adriana Freitas Neves
Co-orientador: Prof°. Dr°. Leonardo Santos Andrade.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação: Mestrado em Química da Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química.

CATALÃO – GO
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

SOUZA, EVELLYN GONÇALVES DE
DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE [manuscrito] / EVELLYN GONÇALVES DE SOUZA. - 2017.
xv, 56 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. ADRIANA FREITAS NEVES; co orientador Dr. LEONARDO SANTOS ANDRADE.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós Graduação em Química, Catalão, 2017.
Bibliografia.
Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. dengue. 2. aptâmero. 3. ferroceno. 4. voltametria cíclica. 5. quitosana. I. NEVES, ADRIANA FREITAS, orient. II. Título.

CDU 54

Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

Relatório de Defesa de Dissertação
Candidata: **Evellyn Gonçalves de Souza**

Aos 17/08/2017 às 14 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: **"Uso de Técnicas Eletroquímicas e de Biologia Molecular para o Desenvolvimento de um Aptassensor para Detecção do Vírus da Dengue".** apresentada pela candidata: **Evellyn Gonçalves de Souza**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	**Função**	**Instituição**
Profa. Dra. Adriana Freitas Neves	Presidente	UFG – Catalão
Profa. Dra. Pabline Marinho Vieira	Titular	IF Goiano – Catalão
Profa. Dra. Maria Rita de Cássia Santos	Titular	UFG – Catalão

Resultado Final: APROVADA.

Parecer da Comissão Julgadora:

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu Milana Jacob da Silva representante do Programa de Pós Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Profa. Dra. Adriana Freitas Neves

Profa. Dra. Pabline Marinho Vieira

Profa. Dra. Maria Rita de Cássia Santos

Representante do PPG Milana Jacob da Silva

( ) Não houve alteração no título. (X) Houve. O novo título passa a ser:

DESENVOLVIMENTO DE UM APTASSENSOR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA DENGUE.

Dedico este trabalho a Deus por sempre me manter firme e de pé nesta caminhada.

Aos meus pais Sirley e Roberval por acreditar em meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ser a fortaleza diária em minha vida, que me levantou em meio a tantas crises emocionais e psicológicas me mantendo forte para a batalha.

Aos Arcanjos que me protegeram, guiaram e me iluminaram afastando mim toda influência maligna.

Aos meus pais Sirley e Roberval que me geraram para o mundo me aconselhando para que a todo instante eu me sentisse capaz de concluir esta etapa.

Ao meu irmão que em meio a tantos desafios e correria diária me mostrou quão grande eu poderia ser para que pudesse alcançar este título.

Ao meu namorado por todo exemplo de humildade, fé e capacidade de persistência diária, que me mostrou sempre que o crescimento interior seria enorme.

A todos os meus amores (avós, tios, primos e amigos) que estiveram presentes durante este período de formação e que depositaram suas expectativas na esperança que esse momento se concretizaria.

À minha amiga, irmã de fé e parceira Evelise, pelos conselhos, por me ouvir e compreender que a caminhada seria árdua, mas, com Deus seria possível vencer. É, e vencemos!

À minha orientadora Adriana Freitas Neves, pela paciência, confiança e ensinamentos em mim depositados, por ser incentivadora para superação de todos os desafios.

À Vânia, Ana Lúcia, Tereza, Romilda, Marly, Geisy, Neila e Heliana por alegrarem e adoçarem os dias amargos e frios, sempre com um café, um sorriso e uma boa conversa.

Ao meu coorientador Leonardo Santos Andrade pela orientação e ensinamentos a mim repassados.

Aos amigos que aqui conheci e que passaram pelos mesmos momentos de dificuldades.

Aos meus amigos de caronas por todos os risos e companhias nas horas de viagens.

À Amanda, Rívia e Kamila agradeço muito pelos momentos de dedicação e ensinamentos.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Regional Catalão por todo suporte e apoio.

À Universidade Federal de Goiás-Regional Catalão pelo ambiente físico cedido para o desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pela bolsa de estudos a mim concedida.

À banca examinadora da qualificação e defesa pelo aceite e contribuição no trabalho desenvolvido.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que diretamente e indiretamente influenciaram na minha história, com boas conversas, orações e afeto.

O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; Ele nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo! Não se desanime!

Deuteronômio 31:8

RESUMO

A dengue é uma doença endêmica que causa grande preocupação tanto aos sistemas de saúde quanto aos pacientes. Dessa forma, é importante que estudos visando diagnósticos mais rápidos e com possibilidade de aplicação a campo possam ser desenvolvidos para que a intervenção médica possa ser precoce, evitando-se o agravamento dos casos. Neste sentido, buscou-se no presente trabalho desenvolver um biossensor eletroquímico baseado no uso de aptâmero como bioelemento reconhecedor na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) para a detecção de cada um dos quatro sorotipos do vírus da dengue. Previamente ao desenvolvimento do biossensor, as técnicas de dot-blot e apta-PCR foram utilizadas como métodos de validação da interação entre o aptâmero B07 e alvo, a região 5'UTR presente no genoma viral. A técnica de voltametria cíclica foi utilizada nas análises de reações redox na superfície do eletrodo DDB com e sem modificação de sua superfície com filme de quitosana. O composto ferroceno foi utilizado como mediador redox e indicador eletroativo de hibridização das cadeias de DNA formadas no sensor. Os picos de corrente indicaram que o eletrodo com modificação de filme de quitosana em sua superfície apresentou maior estabilidade, onde o composto redox teve maior afinidade pelas duplas cadeias hibridizadas na superfície do eletrodo, apresentando valores de correntes para DENV 1, 2, 3 e 4 de foram 0,73; 0,69; 0,79 e 1,03 µA, respectivamente. Esses valores foram superiores a corrente encontrada para o aptâmero em fita simples (ssDNA) que foi de 0,62 µA, assim como observada para corrente obtida do aptâmero hibridizado com sua fita complementar (dsDNA) cujo valor obtido foi de 0,91 µA. Análises com variações de tempo foram realizadas apresentando redução nos valores de correntes em função do tempo, provavelmente devido à redução da interação do material eletroativo no sensor. O aptasensor aqui desenvolvido apresentou boa detecção distinção entre sequências de ácidos nucleicos, apresentando potencial para aplicação na detecção do vírus da dengue.

Palavras-chave: aptâmero; dengue; ferroceno; detecção eletroquímica; voltametria cíclica; quitosana.

ABSTRACT

Dengue is an endemic disease that causes wide concern both the health systems and to the patients. Thus, it is important that studies aiming at diagnoses faster and with possibility of field application can be developed for the medical intervention happens early, avoiding the worsening of the cases. Therefore, the aim of this work was to develop an electrochemical biosensor based on the use of aptamer as a bioelement for recognition on the surface of the boron doped diamond electrode (BDD) for the detection of each of the four serotypes of the dengue virus. Previously to the development of the biosensor, the dot-blot and apta-PCR techniques were used as validation methods for the interaction between aptamer B07 and target, the 5'UTR region present in the viral genome. The cyclic voltammetry technique was used in the analysis of redox reactions on the surface of the BDD electrode with and without modification of its surface with chitosan film. Ferrocene was used as the redox mediator and electroactive indicator of hybridization of the DNA strands formed in the sensor. The peaks of current indicated that the electrode with chitosan film modification on its surface presented greater stability. The redox compound had higher affinity for the double chains hybridized on the surface of the electrode, showing current values for DENV 1, 2, 3 and 4 of were 0.73; 0.69; 0.79 and 1.03 μA, respectively. These values were higher than the current found for the single-stranded aptamer (ssDNA), which was 0.62 μA, as well as for the current obtained from the aptamer hybridized with its complementary strand (dsDNA) whose value was 0.91 μA. Analyzes with time variations were performed showing a reduction in current values as a function of time, probably due to the reduction of the interaction of the electroactive material in the sensor. The aptasensor developed here showed good detection distinction between nucleic acid sequences, presenting potential for application in the detection of dengue virus.

Keywords: aptamer; dengue; ferrocene; electrochemical detection; cyclic voltammetry; chitosan.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa dos países e áreas em risco de desenvolver dengue. As linhas isotérmicas de janeiro e julho indicando áreas em riscos são representadas em vermelho definindo os Hemisférios Norte e Sul. ----------2
Figura 2 - Modelo esquemático da organização do genoma RNA do vírus da dengue: Cap na região 5'-UTR, região codificante mostrando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, extremidade 3'UTR não poliadenilada. ----------4
Figura 3 - Ciclos de transmissão do DENV. ----------6
Figura 4 - Esquema geral do funcionamento do biossensor.----------8
Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento do biossensor. ---------- 10
Figura 6 - Representação da interação entre grupamentos catiônicos do filme de quitosana (rosa) e grupamentos fosfatos aniônicos do DNA. ---------- 13
Figura 7 - Demonstração do potencial linear na forma de onda triangular aplicada no eletrodo de trabalho. ---------- 15
Figura 8 - Representação esquemática de hibridização do aptasensor. (A) ssDNA imobilizado; (B) Hibridização da sonda imobilizada e alvo específico. ---------- 16
Figura 9 - Representação da célula utilizada para leituras voltamétricas: (A) contra eletrodo; (B) eletrodo de trabalho; (C) eletrodo de referência.---------- 17
Figura 10 - Representação esquemática do biossensor eletroquímico com elemento bioreconhecedor aptâmero B07. (a) aptâmero imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho com sonda redox. (b) aptâmero e controle negativo apresentando baixa condutividade de sonda redox na superfície do eletrodo. (c) na presença da fita complementar do aptâmero imobilizado conduzindo menor acesso a sonda redox a superfície do eletrodo.---------- 25
Figura 11 - Representação de um voltamograma cíclico para parâmetros obtidos com esta técnica. (Ipa) corrente de pico anódica, (Ipc) corrente de pico catódica, (Epa) potencial anódico, (Epc) potencial catódico. Seta: valor da corrente dada pela altura do pico. ---------- 27
Figura 12 - Resultados dos testes *in silico* para a hibridização do aptâmero B07 com os sorotipos virais da dengue, formando uma estrutura.---------- 29
Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose de PCR obtidos de DNA plasmidial dos sorotipos virais (DENV1, 2, 3 e 4). M - Marcador de peso molecular. ---------- 30
Figura 14 - Resultado de PCR convencional para obtenção de ssDNA. (M): Marcador de peso molecular. ---------- 30

Figura 15 - Resultado de PCR convencional para obtenção do aptâmero B07 biotinilado. (M): Marcador de peso molecular. ---------- 31
Figura 16 – Dot-blot para análise da afinidade do aptâmero B07 com os sorotipos virais o DENV. 1) dsB07, 2) Controle negativo (C10), 3) D1, 4) D2, 5) D3, 6) D4, 7) 3'UTR, 8) ZIKV.---------- 31
Figura 17 - Resultado de apta-PCR a partir do produto de DENV3 capturado por B07 a partir de partículas magnéticas. (M) Marcador de peso molecular. Seta: branco de reação. ---------- 33
Figura 18 - Sistema físico adaptado para a realização das leituras voltamétricas.------- 34
Figura 19 - Voltamograma após limpeza do eletrodo com filme de quitosana formado na superfície de DDB.---------- 35
Figura 20 - Voltamograma cíclico obtido a partir dos valores de correntes das sequências analisadas com DDB com filme de quitosana.---------- 41
Figura 21 - Voltamograma cíclico obtido a partir dos valores de correntes das sequências analisadas com DDB sem filme de quitosana. ---------- 42
Figura 22 – Variação dos valores de correntes referentes ao pico de oxidação dependente da variação do tempo para a análise com DDB revestido com filme de quitosana.---------- 45
Figura 23 - Variação dos valores de correntes referentes ao pico de oxidação dependente da variação do tempo para a análise com DDB sem filme de quitosana.--- 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de correntes e potenciais para sequências utilizadas para análises no biossensor com formação de filme de quitosana. 36
Tabela 2 - Valores de correntes e potenciais para sequências utilizadas para análises no biossensor sem formação de filme de quitosana. 36

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Porcentagem

Ag/AgCL – Prata/Cloreto de prata

BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

C – Capsídeo

cDNA – DNA complementar

CS – Sequência conservada

DDB – Diamante dopado com boro

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

DP – Desvio padrão

dsDNA – DNA de fita dupla

E – Envelope

EDTA – Ácido

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Fc^{+} - Ferroceno

FHD – Febre Hemorrágica da Dengue

g – Grama

IgE – Imunoglobulina E

IPTG – Isopropil-β-D tiogalactopiranosídeo

kb – Quilobases

LAPAM – Laboratório de Estudos Ambientais

LB – Luria Bertani

M – Membrana

M – Molar

mg – Micrograma(s)

mg – Miligrama

$MgCl_2$ – Cloreto de Magnésio

min - Minutos

mL – Microlitro(s)

mL – Mililitro

mM – Micromolar

mM – Milimolar

NaOH – Hidróxido de sódio

NBT – Azul de nitrotetrazólio

Ng – Nanogramas

NH^{+}_{3} – Grupo amina

nm – Nanômetros

nmoles – Nanomoles

NS – Proteínas Não Estruturais

ºC – Graus Celsius

ORF – Sequência Codificante (Open Reading Frame)

pb – Pares de base

PCA3 – Gene específico do câncer de próstata

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

pmoles – Picomoles

PO^{-}_{4} – Grupo fosfato

prM – Pré-Membrana

RNA – Ácido ribonucleico

RNAm – RNA mensageiro

Rpm – Rotação por minuto

SELEX – Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)

ssDNA – DNA de fita simples (single strand DNA)

Taq – Thermus aquaticus

TBE – Tris-Borato-EDTA

TE – Tris-EDTA

UTR – Untranslated Region – Região Não Codificante

VC – Voltametria Cíclica

WHO – World Health Organization

μA – Micro Amperes

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO 1

1.1 – Dados históricos e epidemiológicos 1

1.2 – Dengue 3

1.3 – Infecção e diagnóstico 5

1.4 – Biossensores 7

1.4.1 – Componentes biológicos 8

1.4.2 – Biossensores de DNA 9

1.4.3 – Aptâmeros 10

1.4.4 – Eletrodo modificado com filme polimérico 12

1.4.5 – Transdução eletroquímica 13

2 – JUSTIFICATIVA 18

3 – OBJETIVOS 19

3.1 – Objetivo geral 19

3.2 – Objetivos específicos 19

4 – MATERIAIS 20

5 – METODOLOGIA 21

5.1 – Análises *in silico* 21

5.2 – Obtenção do alvo 21

5.2.1 – Extração de DNA plasmidial 21

5.2.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) 21

5.2.3 – Eletroforese em Gel de agarose e Purificação dos produtos de PCR 22

5.3 – Obtenção do aptâmero biotinilado para teste de Dot-Blot e apta-PCR 22

5.3.1 – Dot Blot 23

5.3.2 – Apta-PCR 23

5.4 - Desenvolvimento do Biossensor 24

5.4.1 – Preparação do eletrodo 25

5.4.2 – Hibridização e detecção eletroquímica 26
6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
6.1 – Análise *in silico* 28
6.2 – Dot-Blot e apta-PCR 30
6.3 – Aptassensor 33
8 – PERSPECTIVAS FUTURAS 48
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Dados históricos e epidemiológicos

Conteúdos históricos de enciclopédias chinesas relatam que por volta de 265 a 420 a.C, começaram a aparecer alguns relatos de uma doença cujos sintomas eram similares ao da dengue, e que seriam provocados a partir de insetos. Estes registros foram devidamente editados na dinastia Tang, e naquela época a denominaram como "água envenenada" associando-a a insetos voadores, o que hoje conhecemos como dengue. Em 1635, nas Antilhas Francesas, e em 1699, no Panamá, começaram a aparecer surtos com fortes indícios de casos de dengue (GUBLER, 2002).

A dengue distribuiu-se para outras regiões e, assim, começaram as pandemias. Entre os anos de 1779 e 1780 foram evidenciadas as primeiras epidemias de dengue na Ásia, África e América do Norte. Com o aumento das navegações e do comércio marítimo neste período, ocorreu a disseminação pelos trópicos e assim, tornou-se uma doença endêmica nos países de clima tropical. As pessoas que frequentavam os portos marítimos começaram a serem infectados pela doença e assim os demais habitantes que apresentavam baixa imunidade começaram a serem infectados pelo vírus (CHATURVEDI et al., 2006).

Desta maneira, as pessoas que estavam vivendo em ambientes propícios para a proliferação da espécie do *Aedes aegypti* (mosquito transmissor da dengue) foram os grandes contribuintes para a explosiva disseminação do DENV (vírus) e, assim iniciou a manifestação da dengue hemorrágica nos centros urbanos onde haviam milhões de pessoas (LINDENBACH & RICE, 2003).

O transporte de cargas, a locomoção de pessoas, e a grande movimentação facilitou o aumento da contaminação, que teve início em meados dos anos 80 na Ásia, ocorrendo uma grande propagação em outros países. Em meados dos anos 90, período da Segunda Guerra Mundial (1939-1945) aconteceram algumas mudanças ecológicas e demográficas que proporcionaram a proliferação e transmissão da doença nesse continente (GUZMAN et al., 2010).

A dengue tornou-se uma doença com gravidade de alerta para a saúde pública nas regiões de clima tropical e subtropical do mundo todo, sendo que sua incidência, distribuição e gravidade aumentaram em 30 vezes nos últimos 60 anos, e

então foi especificada como uma virose re-emergente e, consequentemente, um fardo econômico para as áreas afetadas (WHITEHEAD, 2007).

Em dados publicados pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO) aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas são residentes em países endêmicos, e em 2002 a Resolução da Assembleia Mundial de Saúde WHA55.17 solicitou um maior empenho na prevenção e combate à dengue para WHO e seus Estados (EDELMAN, 2007).

Na Figura 1 ilustra-se o mapa das áreas em risco de desenvolvimento da dengue. Em destaque na cor amarelo observa-se os países com maiores índices de casos confirmados, sendo as linhas em marrom realçando a região de presença do mosquito vetor. A doença está presente em muitos países que estão distribuídos nas regiões tropicais, como África, Austrália, América Central e América do Sul, e tem causado grandes taxas de infecção (GUBLER, 2002). Entre 2001 e 2007, foram notificados quase 3 milhões de casos de dengue nas Américas, sendo que 98,5% desses foram contabilizados no Brasil (WHO, 2009).

Figura 1 - Mapa dos países e áreas em risco de desenvolver dengue. As linhas isotérmicas de janeiro e julho indicando áreas em riscos são representadas em vermelho definindo os Hemisférios Norte e Sul. (Adaptado de: *World health organization*. *Map Production: Health Information and Geographic Information Systems*, 2010).

Nas últimas décadas o Brasil tem sido responsável por mais de 60% dos casos registrados de febre hemorrágica da dengue (FHD) na América (ROMANO et al., 2010). Isso pode ser justificado devido ao fato de que em grande parte do País, estão presentes todos sorotipos virais (DENV 1, 2, 3 e 4), contribuindo para o aumento do

índice das formas graves da doença. Em 2012, a vigilância epidemiológica relatou que o sorotipo de DENV4 foi o mais predominante no país, estando presente em 63% das amostras analisadas e positivas da doença (BRASIL, 2012).

De modo geral, em 2016 o número de casos confirmados de dengue no País subiu 22%. As regiões do Nordeste e Sul do Brasil apresentaram um aumento de aproximadamente 173 e 6 mil pessoas infectadas respectivamente, sendo que as demais regiões apresentaram uma redução em seus números (BRASIL, 2016).

Com o grande aumento na população mundial associado à urbanização nas cidades de forma mal planejada, a falta de assistência na saúde pública, e a ausência do controle efetivo do mosquito nas áreas endêmicas foram as principais condições que beneficiaram a expansão do DENV, aumentando a ocorrência da doença em nível mundial, tornando a mesma uma ameaça para grandes pandemias.

1.2 – Dengue

A dengue é uma doença infecciosa e não contagiosa causada por um vírus denominado DENV. É uma arbovirose (doenças transmitidas por insetos) humana e uma das grandes preocupações para a saúde pública por apresentar grandes índices de incidência nas últimas décadas (BRASIL, 2009).

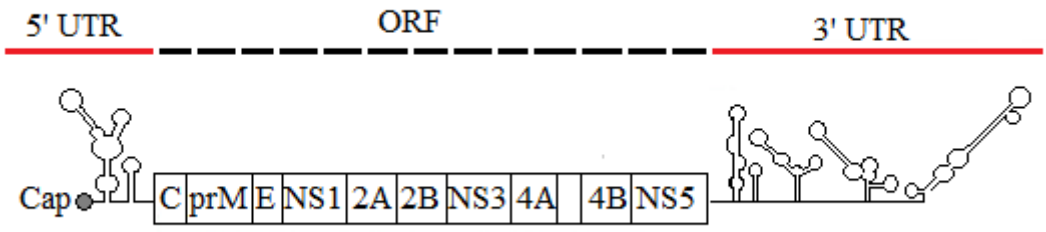
O DENV é um dos menores vírus de RNA envelopados conhecidos, pertence à família *Flaviridae* do gênero *Flavivirus,* e tem subclassificação de quatro diferentes sorotipos (DENV 1, 2, 3 e 4). O gênero *Flavivirus* compreende outros vírus importantes como Encefalite Japonesa, de St. Louis, do Oeste do Nilo, da Febre Amarela (TELES, 2006) e Zika vírus (SI & LEE, 2017).

A constituição morfológica viral é esférica e, como de outros *Flavivirus*, composta por RNA de fita simples, com polaridade senso positiva, revestido por um nucleocapsídeo icosaédrico, formado por um capsídeo (C) de aproximadamente 30 nm. Uma membrana lipoproteica derivada da célula hospedeira circunda o nucleocapsídeo com proteínas do envelope (E) e de membrana (M) ou pré-membrana (prM) (STIASNY & HEINZ, 2006).

O genoma viral do dengue tem aproximadamente 11.000 pares de base de comprimento e uma fase aberta de leitura (ORF), codificando uma única poliproteína que, quando processada gera três proteínas estruturais: proteína C do capsídeo, proteína E do envelope e proteína M associada à membrana, e ainda sete proteínas não

estruturais (NS) que são de grande importância na replicação viral e no processamento do polipeptídeo: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figura 2).

Figura 2 - Modelo esquemático da organização do genoma RNA do vírus da dengue: Cap na região 5'-UTR, região codificante mostrando as proteínas estruturais e não estruturais do vírus, extremidade 3'UTR não poliadenilada. (Fonte: próprio autor).



A união das proteínas C/prM, prM/E, E/NS1, e a região carboxi-terminal da proteína NS4A é dada pela clivagem por uma peptidase derivada do hospedeiro. O vírus codifica uma serina protease que é responsável pelas clivagens das demais proteínas com exceção da NS1/NS2A que se dá por uma enzima ainda desconhecida (LINDENBACH & RICE, 2003).

As regiões não traduzidas (UTRs), conhecidas como 5'UTR e 3'UTR, flanqueiam o genoma viral da dengue e apresentam regiões semi conservadas. Com um comprimento de 450 pb é formada a região 3'UTR com ausência da cauda poli (A), possuindo um "*loop*" altamente conservado colaborando para a replicação viral. A região 5'UTR é composta por 100 pb, e está diretamente ligada para o fenômeno de tradução do genoma, que ao iniciar suas atividades com as proteínas NS3-NS5 através da ação de metiltransferase da NS5, adicionam a estrutura do cap ao final da região 5' (CLYDE et al., 2006).

Os quatro sorotipos virais podem causar a doença na forma clássica até a hemorrágica mesmo sendo antigenicamente distintos; apesar disso, o DENV3 apresenta maior virulência, seguindo do DENV2, DENV4 e por último do DENV1 (GUZMÁN & KOURÍ, 2004). A forma de entrada do vírus na célula dá-se através da ligação da glicoproteína E a um receptor celular, e assim o agente infeccioso irá viabilizar a sua entrada a partir do reconhecimento de uma molécula de superfície celular por múltiplos receptores (RODENHUIS-ZYBERT et al., 2010).

Quando a célula é infectada, o genoma viral servirá como RNA mensageiro (RNAm) para que possa ser traduzido, e de certa forma, para ser molde de

outras sínteses de moléculas de RNA, podendo assim ser usada para um novo ciclo de tradução ou para substrato de encapsidação e formar novas partículas virais (GEBHARD et al., 2011). Quando se utiliza eficientemente o genoma durante seu processo de tradução, ele pode ser temporariamente regulado assegurando a propagação viral.

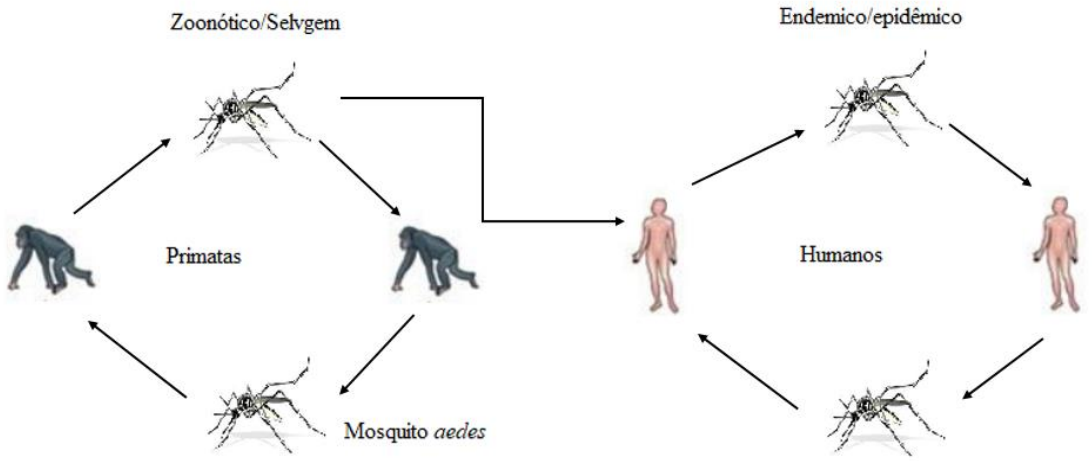
O ciclo de replicação do vírus tem início quando ocorre interação com uma célula hospedeira, seguida de endocitose mediada pelo receptor viral e internalização por endossomos. A liberação do genoma viral no citoplasma ocorre com a acidificação dos endossomos que levam a transformações conformacionais na proteína 'E' ocorrendo um processo de fusão com a membrana endossomal (MODIS, 2004).

A tradução do RNA viral é iniciada em uma poliproteína com um códon de iniciação posterior a 5'UTR que codifica para uma proteína do capsídeo viral. Este processo de tradução se dá no retículo plasmático rugoso em nível de citoplasma com processamento e clivagem das proteínas por proteases do vírus e do hospedeiro. As proteínas NS coordenarão a tradução das novas proteínas e da replicação do RNA viral, que se associam à proteína C e logo depois ao envelope lipídico que contém proteínas do tipo 'E' e 'prM' durante a passagem à luz do retículo endoplasmático rugoso (CHAMBERS, 1990). Por vias de secreção, as partículas virais imaturas são levadas para o complexo trans-Golgi para que possam ser novamente processadas e excretadas na forma de partículas virais maturas (FISCHL & BARTENSCHLAGER, 2011).

1.3 – Infecção e diagnóstico

O DENV pode ser propagado e adquirido de duas principais maneiras. Por meio do ciclo endêmico/epidêmico urbano, no qual o vetor *Aedes aegypti,* e também *Aedes albopictus* ou outro gênero de mosquito *Aedes*, estará envolvido com o hospedeiro humano. O outro modo é o ciclo zoonótico/selvagem. Este por sua vez, envolve hospedeiros do tipo primatas não humanos e diferentes mosquitos vetores do gênero *Aedes* e *Ochlerotarus,* sendo este último descrito em florestas da Malásia e da África envolvendo primatas não humanos (WANG et al., 2000). Ambos os ciclos podem ser observados na representação esquemática da Figura 3.

Figura 3 - Ciclos de transmissão do DENV. (Fonte: próprio autor).



A transmissão do vírus do mosquito para humanos dá-se pela picada das fêmeas na fase virêmica da dengue em uma determinada pessoa. Primeiramente, o vírus multiplica-se no epitélio intestinal do mosquito, atinge a hemocele e dissemina por diferentes tecidos. Em torno de 7 a 14 dias (período de incubação) o vírus estará nas glândulas salivares e assim, o mosquito estará pronto para transmití-lo para o ser humano (McBRIDE & BIELEFELD-OHMANN, 2000).

Após o hospedeiro ser infectado pelo vírus seu quadro clínico pode variar de assintomático até apresentar graves quadros, que algumas vezes pode levar a óbito. Os sorotipos virais ao serem transmitidos causam desde a forma clássica até a hemorrágica da doença. Quando a doença é identificada precocemente as intervenções apropriadas são mais rápidas (BARRETO & TEIXEIRA, 2008).

O diagnóstico de pessoas infectadas pode ser realizado por vários métodos como isolamento viral, métodos sorológicos ou moleculares. Com as semelhanças de sinais clínicos de doenças como malária, rubéola e outros, o diagnóstico laboratorial tem prevalecido na identificação da doença (WHO, 2009). Entre as técnicas laboratoriais conhecidas para a detecção do vírus da dengue estão a utilização da cultura de célula ou imunofluorescência; detecção do antígeno viral com o teste de ELISA; detecção de anticorpos anti-dengue pela reação de inibição da hemaglutinação; teste do complemento; teste de neutralização; e detecção do ácido nucléico viral com a técnica de transcrição reversa seguida de PCR (GUBLER et al., 1998).

A grande demanda em obter resultados cada vez mais rápidos para a realização imediata de intervenção médica tem feito com que os métodos diagnósticos

aumentem significativamente. Para isso, são necessárias análises confiáveis, rápidas e sensíveis com baixo custo. Nota-se que os métodos convencionais apesar de serem confiáveis, são testes que demandam tempo e pessoas especializadas para sua realização, por isso os biossensores, após sua miniaturização apresentam maior facilidade no manuseio e apresentam grandes aplicabilidades na área da saúde para um diagnóstico rápido e específico (LIU et al., 2000).

Esta tecnologia de biossensoriamento tem sido uma área de conhecimento que tem crescido de forma acelerada e pode vir a auxiliar na solução de problemas relacionados ao tempo, sensibilidade e custos elevados de outros métodos (LAZCKA, DEL CAMPO & MUNOZ, 2007).

1.4 – Biossensores

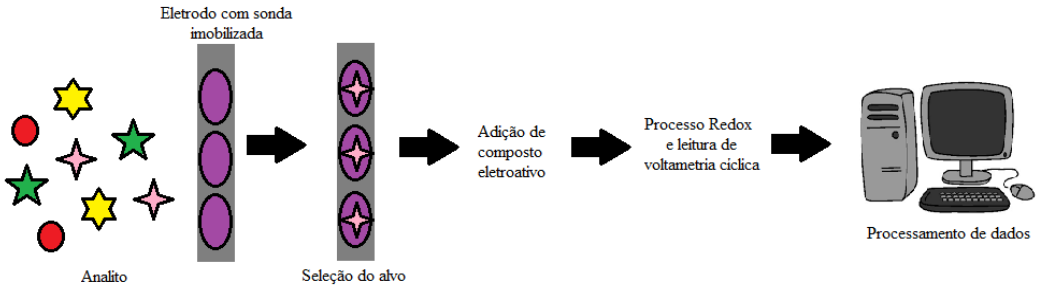
Os biossensores ou sensores eletroquímicos são definidos como um dispositivo que combina a atividade de seleção de um material biológico sensível ao analito, que quando ligado a um transdutor, faz a conversão do sinal biológico adquirido na varredura em um sinal elétrico que será proporcional à concentração do analito (ROSATTO, 2000).

Esses dispositivos são amplamente utilizados por apresentar alta seletividade, faixa de sensibilidade adequada, precisão, tempo de vida útil, reprodutibilidade, baixo custo e por apresentar formatos pequenos. Sua classificação dá-se pelo componente biológico, e pelo sistema de transdução, que são: acústicos, óticos, calorimétricos e ainda os eletroquímicos (SILVA, 2001).

Para a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*), os biossensores são classificados como um sensor químico que é composto principalmente por um elemento biológico e um transdutor (Figura 4), sendo capaz de fornecer informações analíticas sobre o elemento em análise.

Para a construção de um biossensor, a escolha do material, do transdutor e a imobilização demanda uma vasta pesquisa em engenharia, biologia e química. Sendo que, com base nos mecanismos de reconhecimento os biossensores são divididos em três classificações: as enzimas se encaixam no grupo biocatalítico, os anticorpos e ácidos nucléicos são o grupo que reconhece por bioafinidade (MEHROTRA, 2016).

Figura 4 - Esquema geral do funcionamento do biossensor. (Fonte: próprio autor).



A principal característica do biossensor está em detectar com seletividade, habilidade e discriminação os diferentes substratos sendo este, capaz de identificar somente o analito desejado (DU et al., 2008). Para isso é necessário escolher com cautela qual será o biocomponente que irá atuar como elemento de reconhecimento biológico, algumas características são (SALGADO, 2001):

- Apresentar sítio que irá reagir/interagir com o analito;
- Ter boa estabilidade;
- Ser capaz de imobilizar sobre suporte sem afetar seu desempenho;

1.4.1 – Componentes biológicos

A molécula de bioreconhecimento é o elemento principal e com grande importância no sistema do biossensor, pois, a sensibilidade e especificidade deste material é o ponto crucial para o sucesso do dispositivo do sensor (TOTHILL, 2009). Várias biomoléculas apresentam potenciais para o uso em biossensores, dentre elas estão:

- **Enzimas:** são catalisadores biológicos que possuem grande eficiência e especificidade, além de serem seletivas e especificas e um ou uma classe de substratos. As reações que são catalisadas por componentes enzimáticos chegam a ser 10^{17} vezes mais rápidas que aquelas que não foram catalisadas (NELSON & COX, 2002). Essa classe de biomoléculas é formada por estruturas tridimensionais que são compostas por peptídeos, possuindo um sítio ativo que irá reagir com um substrato, conferindo a sua especificidade (FERNANDES, 2012).
- **Anticorpos:** são proteínas excretadas após serem produzidas pelas células B, na presença de um antígeno, com o qual irá reagir. A utilização de anticorpos como

elemento bioreconhecedor baseia-se na sensibilidade e especificidade das interações que ocorrem entre antígeno e anticorpo (CHAMBERS et al., 2008).

- **Ácidos nucléicos e aptâmeros:** baseiam na utilização do DNA fita simples, sendo capaz de identificar e se ligar a uma cadeia complementar através de ligações de hidrogênio estáveis entre as duas fitas (WANG, 1998). Essas moléculas apresentam seletividade às sequências alvos específicos e capacidade para captura e consequentemente hibridização por complementariedade de bases.

1.4.2 – Biossensores de DNA

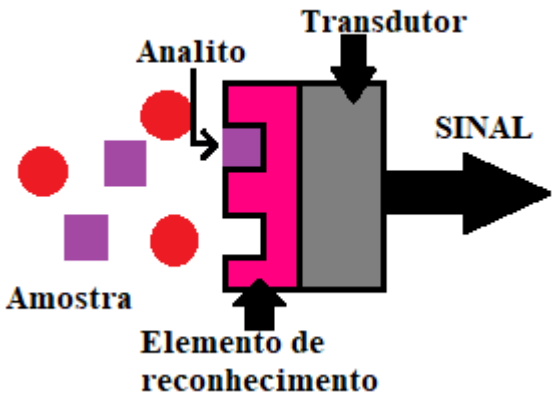
Os biossensores de DNA têm sido comumente utilizados pelo fato de que a estrutura do ácido nucléico favorece a sua imobilização na superfície de diferentes espécies de eletrodos, podendo ser utilizados de forma simples (YANG et al., 1997) ou de cadeia dupla (BRETT et al., 1997), pois apresentam grande capacidade de hibridização na presença de sequências complementares.

Rotineiramente para análises de sequências genômicas específicas que fazem uso de métodos convencionais incluem em seus testes sequenciamento direto de ácidos nucléicos ou por meio de hibridização, sendo esta rotina usualmente utilizada em laboratórios que realizam diagnósticos devido à sua simplicidade (PIVIDORI et al., 2000).

Os biossensores são instrumentos que resultam na interação de uma sonda, geralmente uma curta sequência de ácido nucleico com especificidade para um alvo, e um transdutor. Esta curta sequência pode ser um aptâmero imobilizado na superfície do transdutor sendo o reconhecedor da molécula de DNA alvo. Este reconhecimento é realizado através da hibridização da sonda e alvo, e obtêm-se um sinal mensurável a partir do bioreconhecimento (WANG & GOODING, 2006).

Um biossensor de alto desempenho é formado pela combinação da sequência de ácido nucléico que age como material bioreconhecedor, um transdutor apropriado que apresentará resultados profundamente ligados com propriedades físicas das cadeias imobilizadas e hibridizadas (Figura 5) (MUSSINI, 2008). As informações genéticas armazenadas na sequência utilizada são formadas pela combinação de quatro diferentes bases nitrogenadas gerando o sinal a partir da sequência identificada (YOON, 2012).

Figura 5 - Representação esquemática do funcionamento do biossensor. (Fonte: próprio autor).



1.4.3 – Aptâmeros

Nos últimos anos tem-se colocado em discussão materiais biológicos que podem ser utilizados no bioreconhecimento do analito. Uma estratégia moderna é a utilização de oligonucleotídeos sintéticos, e tem sido discutida com o objetivo de formar complexos ligantes capazes de se inteirar seletivamente com moléculas alvo (HU et al., 2014).

Estas sequências de oligonucleotídeos foram denominadas como aptâmeros que agem como "anticorpos químicos", especificadas como moléculas de fita simples de DNA que se ligam a pontos compatíveis e específicos a substratos orgânicos apresentando baixo peso molecular, macromoléculas como as proteínas e ainda substratos inorgânicos (YANG et al., 2014).

Este termo aptâmero derivou-se da palavra "*aptus*" do latim 'encaixe' e "*meros*" do grego 'partes'. Os aptâmeros de oligonucleotídeos que derivam de RNA ou DNA, são de cadeia simples e curtas (MENCIN et al., 2014). Essa classe de aptâmeros são obtidos através da síntese utilizando a química combinatória do método SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), no qual envolve várias técnicas de biologia molecular para a seleção de uma biblioteca de ácidos nucléicos (DNA ou RNA), realizando a separação de oligonucleotídeos capazes de se ligar de forma seletiva ao alvo desejado (TUERL & GOLD, 1990).

O método é realizado por meio de um processo repetitivo de ligação, separação e amplificação de ácidos nucléicos selecionados (LOU et al., 2009). Uma biblioteca de ácidos nucléicos é formada e assim, incubada com sequências alvo para

que ocorra a ligação com os nucleotídeos afins. Para tal fim, realiza-se a separação das sequências não ligadas por meio de lavagens, enquanto as ligações específicas são submetidas a PCR, e então o ciclo se recomeça (LIU et al., 2009). Após cerca de 15 ciclos o processo apresentará um número pequeno de aptâmeros selecionados que serão relativamente mais específicos para o alvo (CHIU & HUANG, 2009).

Ao final do processo, os aptâmeros selecionados são clonados e sequenciados, a escolha se dá pela similaridade das sequências, por vezes com o objetivo de chegar a uma região muito específica responsável pela ligação com o alvo, alguns experimentos de mutação e truncamento são realizados (STOLTENBURG et al., 2007).

As sequências selecionadas podem variar em tamanhos de 20 a 80 pares de bases (LEVY-NISSENBAUM et al., 2008), apresentando grande especificidade e seletividade por alvos através da interação por complementaridade de bases e ligações de hidrogênio, podendo ainda ocorrer ligações eletrostáticas entre os grupamentos carregados, emparelhamento entre anéis aromáticos das bases do aptâmero onde ocorre combinação de efeitos, e ainda interações de *Van der Walls* (FRAGA, 2001).

Podem surgir alterações conformacionais na presença do alvo pela ocorrência de interações intramoleculares (HERMANN & PATEL, 2000). As sequências de oligonucleotídeos selecionados podem passar por modificações químicas, com o intuito de melhorar a sua estabilidade, capacidade de ligação, aumentar a resistência a ação de nucleases que geralmente estão presentes em fluidos biológicos (GOLD et al., 1995).

A partir das suas propriedades: grande afinidade à molécula alvo, facilidade de modificação e estabilidade, os aptâmeros estão sendo utilizados como ferramentas de diagnóstico (BINNING et al., 2012), por exemplo o uso em biossensores, devido a sua sensibilidade elevada forma-se uma boa alternativa para o biosensoriamento (ZHOU et al., 2010).

A utilização de aptâmeros tem aumentando potencialmente nas aplicações analíticas pelo fato de serem sintetizados quimicamente de forma confiável e por apresentarem funcionalidade ao serem modificados por outros ligantes, moléculas repórteres e grupos funcionais (STOLTENBURG et al., 2007).

1.4.4 – Eletrodo modificado com filme polimérico

Evidências documentam que materiais poliméricos se comportavam como bons isolantes elétricos. Mas, recentemente algumas pesquisas demonstram que esses polímeros têm apresentando grande relevância na possibilidade de conduzir eletricidade, ressaltando que deve ser combinado com materiais que apresentam propriedades elétricas de semicondutor ou metais (MAIA et al., 2000).

Desta forma, os materiais poliméricos têm sido utilizados para a imobilização de ácidos nucléicos. Quando manuseado para este fim deve-se levar em consideração a escolha da metodologia, pois a mesma é dependente das características do material transdutor utilizado, portanto, deve-se prevenir o desligamento da sonda imobilizada ao suporte que pode ser sólido, e para garantir a excelência do resultado pode-se basear em outras metodologias já utilizadas para esta finalidade (PIVIDORI et al., 2000).

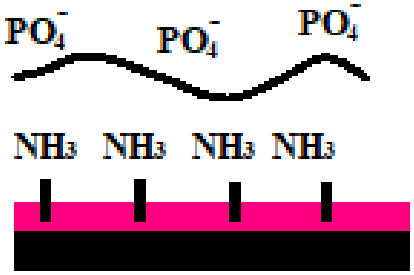
Outro fator a ser analisado é o material do eletrodo que deverá ser escolhido de acordo com a sonda imobilizada e o alvo que será identificada, considerando ainda a técnica utilizada para obtenção de um sinal químico após o processo de hibridização. O material depositado na sua superfície do sensor deve ser analisado, pois, suas características devem ser apropriadas e compatíveis com a janela de potencial utilizada nas leituras. Para um sensor utilizando técnicas voltamétricas é comum a utilização de eletrodos formados por materiais: ouro, diamante, platina, mercúrio, carbono e outros podem ser citados para a utilização desta técnica (LA-SCALEA et al., 1999).

De maneira específica, para a imobilização de aptâmeros, devem ser avaliados fatores que incluam as interações químicas de aptâmeros modificados com a adição de outros grupos químicos, e ainda observar a capacidade de dessorção dos aptâmeros na superfície ou se será necessário um pré-tratamento do eletrodo para tal imobilização (GOMES FILHO, 2015). O filme polimérico quando depositado na superfície do sensor é capaz de possibilitar a imobilização de espécies que sejam ativas sobre esta modificação, e pode ampliar a resposta final obtida, por isso, este método tem sido empregue no desenvolvimento de sensores por protegê-lo de impurezas, imobilizar biocomponentes e por bloquear interferentes (PEREIRA et al., 2002).

Para que o elemento biológico possa fixar no suporte físico pode-se utilizar métodos como: adsorção com uso de nitrocelulose, membranas de nylon,

poliestireno (SUKHORUKOV et al., 1996); adsorção física em eletrodos de carbono (PIVIDORI et al., 2000); imobilização de DNA via ligações covalentes (LUCARELLI et al., 2004), dentre outras. A quitosana policatiônica é um exemplo de polímero utilizado como suporte em superfícies de eletrodos por apresentar interação eletrostática com o DNA polianiônico, formando um complexo estável, em que os grupos amina livres (NH_3^+) presente nos monômeros de quitosana vão se ligar eletrostaticamente com os grupos fosfato (PO_4^-) dos aptâmeros (ssDNA) (Figura 6), sendo então fixados na superfície do eletrodo sem modificar a estrutura da sonda (SANTOS, 2008).

Figura 6 - Representação da interação entre grupamentos catiônicos do filme de quitosana (rosa) e grupamentos fosfatos aniônicos do DNA. (Fonte: próprio autor).



Assim, quando a superfície do eletrodo já estiver preparada, e a segunda cadeia de ssDNA complementar ao elemento imobilizado se aproximar da superfície do sensor, ocorrerá a hibridização das duas fitas de DNA que se ligará em suas bases complementares. Em seguida, a amostra passa por lavagens para a remoção de interações não específicas e para realização da leitura das interações biológicas, etapa na qual ocorrerá que antecede à transdução eletroquímica (LIU et al., 1996).

1.4.5 – Transdução eletroquímica

Para a detecção e obtenção dos sinais referentes ao material em análise faz-se a escolha de uma técnica que seja suficientemente capaz de detectar sinais, até mesmo em concentrações pequenas. Os biossensores podem ser eletroquímicos, óticos, piezoelétricos e calorimétricos. As características de cada um desses estão descritas abaixo:

- **Eletroquímicos:** mede a difusão de espécies eletroativas e a movimentação os íons envolvidos na reação, até mesmo em pequenas concentrações. Os métodos

dessa classe são os de maior utilização quando se trata do monitoramento e diagnóstico em análises clínicas, podendo ser amperométrico, potenciométricos ou condutimétricos (MEHRVAR & ABDI, 2004).

- **Amperométricos:** é utilizado para medir a corrente que resulta da oxidação ou redução eletroquímica do material eletroativo, que ocorre no período de transferência de elétrons do analito para o eletrodo e vice-versa (THÉVENOT et al., 2001).
- **Potenciométricos:** neste caso, são baseados na diferença de potencial indicador e de referência, onde os dois eletrodos encontram-se separados por uma membrana seletiva permeável, onde não há fluxo de corrente significativa entre eles (THÉVENOT et al., 2001).
- **Condutimétricos:** nesta técnica mede-se a mudança na condutância, utilizado para enzimas que colaboram para a catálise das reações, neste processo é produzido ou consumido espécies iônicas, que irá alterar a abundância dos portadores de cargas móvel no eletrólito (MELO, 2008).

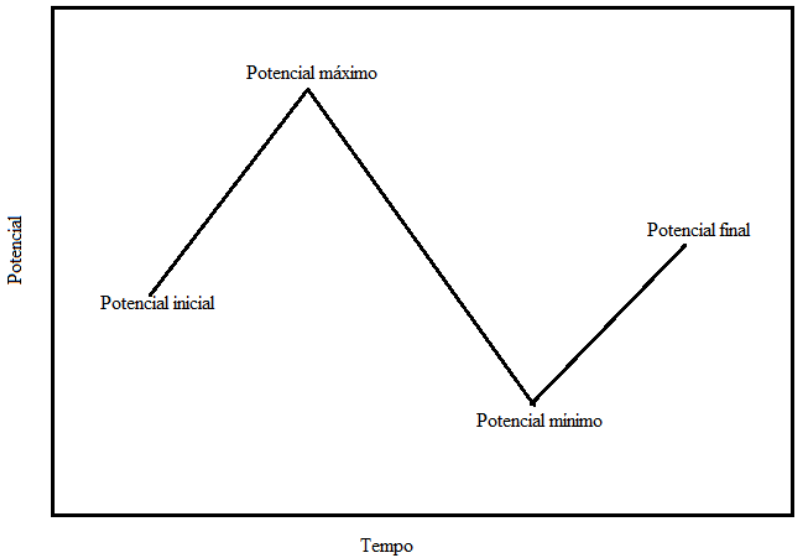
Outras técnicas são exemplificadas para a utilização em biossensores sendo elas (MEHRVAR & ABDI, 2004):

- **Ópticas:** aplicadas em detecções direta a partir de uma fibra óptica para guiar as ondas de luz para detectores adequados. A luz observada ou emitida é resultante da reação química ou biólogica, e então, faz-se a medição para obtenção do resultado da reação ocorrida.
- **Piezoelétricas:** utilizadas para medir a alteração de massa ou microviscosidade, tendo como princípio o revestimento da superfície do biossensor com material biologicamente ativo e seletivo, ligando ao alvo e ao final a resposta é detectada pela variação em massa após ligação entre o material no sensor.
- **Calorimétricas:** utilizadas para detectar substratos a partir do calor gerado nas reações bioquímicas entre o analito e o material bioreconhecedor.

Dentre todas as técnicas citadas as eletroquímicas têm tornado destaque pelas características apresentadas e desta forma, a voltametria cíclica (VC) uma de suas subclassificações é usualmente utilizada nesta área por obter informações qualitativas, apresentar facilidade na leitura, baixo custo e fácil acesso até mesmo para a miniaturização do sistema (BRETT & BRETT, 1996).

Esta técnica é baseada em processos eletródicos capazes de adquirir informações rápidas sobre a termodinâmica de processos redox, consistindo na aplicação de um potencial linear na forma de onda triangular (Figura 7) no eletrodo de trabalho onde ocorrem reações de redução e oxidação na espécie presente na superfície do eletrodo, sendo que o composto eletroativo irá amplificar o sinal obtido, e a variação de corrente será medida em relação a variação de corrente entre o eletrodo de trabalho e eletrodo de referência (TICIANELLI & GONZALEZ, 2005).

Figura 7 - Demonstração do potencial linear na forma de onda triangular aplicada no eletrodo de trabalho. (Fonte: próprio autor).

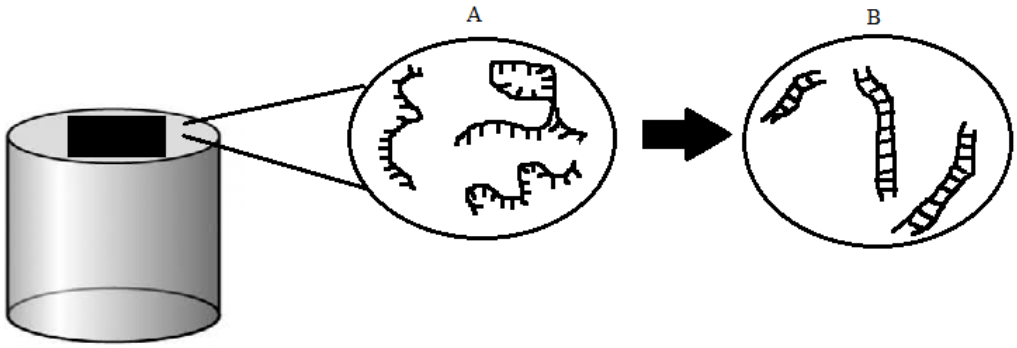


Para a obtenção de sinal mensurável da reação ocorrida na superfície do eletrodo, são utilizados métodos de transdução que detectam a mudança no sensor, entre eles destacam-se os métodos eletroquímicos, acústicos e ópticos. As detecções eletroquímicas são utilizadas em maior escala, por serem simples, de baixo custo e eficazes na utilização de mediadores redox que serão indicadores eletroquímicos que comportam transitoriamente na oxidação e redução em função da transferência de elétrons da superfície do eletrodo para a sonda redox (MERSAL, 2009).

O método eletroquímico mede a variação de corrente, potencial, condutividade ou capacitância e tem predominado como forma de transdução tornando o método e os biossensores mais atrativos por apresentarem grande especificidade do potencial de miniaturização, a compatibilidade com técnicas de micro fabricação, a baixa condição energética e o caráter de ser portátil (WANG et al., 2000).

O aptasensor é desenvolvido pela imobilização do aptâmero como sonda específica para um determinado alvo sobre na superfície do transdutor que faz o reconhecimento da sequência de DNA complementar por meio de hibridização (Figura 8). As fitas simples e duplas de ácidos nucleicos na superfície irão se estruturar de diferentes formas, sendo que a mudança conformacional e hibridização serão detectadas pela mudança de eletroatividade detectada pelo sinal eletroquímico (STEMPOKOWSKA *et al.*, 2003).

Figura 8 - Representação esquemática de hibridização do aptasensor. (A) ssDNA imobilizado; (B) Hibridização da sonda imobilizada e alvo específico. (Fonte: próprio autor).



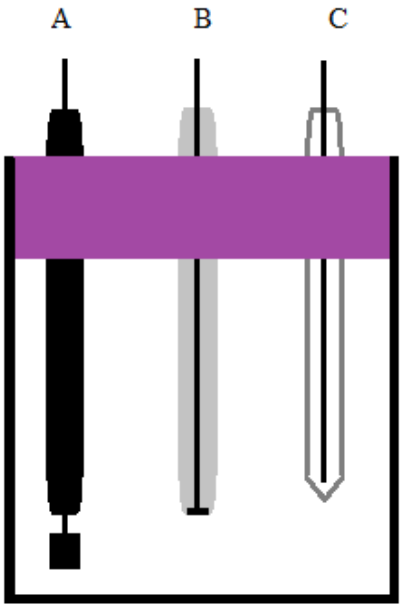
O sinal químico é amplificado a partir da adição de um composto que seja capaz de interagir com a molécula no sensor. O composto eletroativo irá otimizar o resultado final da leitura, onde demonstrará a reação de oxido-redução do material analisado. Os compostos eletroativos são utilizados para colaborar para a transferência de elétrons, assim como outras substâncias que já foram descritas como mediadores redox tais como aminoferroceno (XU et al., 2001), derivados de quinonas (WONG & GOODING, 2006), ferroceno e dentre outros compostos que tornam as reações de hibridização eletroquimicamente detectáveis (TELES et al., 2007).

Ao realizar o ensaio voltamétrico é iniciado um processo aplicando-se um potencial em valores pré-estabelecidos onde não ocorre nenhuma reação de redução. O potencial varia para regiões mais negativas iniciará a redução do composto em estudo, que irá gerar um pico de corrente proporcional à concentração do material. Quando não houver mais nenhuma reação de redução acontecendo, o potencial retorna ao valor inicial fazendo uma varredura em sentido inverso (PACHECO et al., 2013).

Nos casos em que ocorre a reversão de potencial são denominados potenciais de inversão. A varredura ocorrerá em um determinado intervalo onde ocorre o pico de redução e oxidação da espécie em análise e a varredura podem variar seu sentido inicial tanto negativo como para positivo, isso dependerá da composição da amostra (ALEIXO, 2013).

Para as análises de voltametria o equipamento é constituído basicamente por um potenciostato sendo este instrumento eletrônico acoplado a um computador que irá trabalhar de acordo com as configurações de um programa, que controla toda a análise. Uma célula eletroquímica é escolhida ou adaptada de acordo com o estudo para que as leituras sejam realizadas com solução eletrolítica e com os três eletrodos imersos, sendo eles: eletrodo de trabalho, na maioria das vezes sólido que medirá o potencial das espécies eletroativas em solução; eletrodo de referência, geralmente prata/cloreto de prata possuindo potencial estável que é medido em relação ao eletrodo de trabalho; e eletrodo auxiliar de material inerte para completar o circuito (Figura 9) (SILVA, 2004).

Figura 9 - Representação da célula utilizada para leituras voltamétricas: (A) contra eletrodo; (B) eletrodo de trabalho; (C) eletrodo de referência. (Fonte: próprio autor).



Desta forma, a escolha do bioelemento seguida de sua imobilização na superfície do eletrodo (transdutor), e a utilização de uma técnica capaz de converter o sinal da reação biológica ou bioquímica que ocorre no sensor em um sinal, são as etapas fundamentais na fabricação do biossensor (PEREIRA et al., 2002).

2 – JUSTIFICATIVA

A dengue é uma arbovirose humana de maior incidência em países tropicais chegando a ser notificados até 50 milhões de casos anuais e podendo haver agravamento do quadro clínico do paciente e levá-lo a óbito. A doença pode ser causada por cada um dos quatro sorotipos virais, os quais apresentam sequências genéticas com alta homologia entre si.

As pesquisas na área de doenças infecciosas demonstram a necessidade de buscar métodos que sejam eficazes para a detecção viral tais como o vírus da dengue (DENV), principalmente nos primeiros dias de sintomas da doença no paciente. Por isso, a região 5' UTR do vírus da dengue foi escolhida pelo histórico de pesquisas do LaBioMol (UFG – Regional Catalão) para desenvolver um aptasensor a fim de se detectar os sorotipos de DENV. Esta região do genoma viral apresenta sequência altamente conservada entre os quatro sorotipos virais, apresentando importância fundamental no processo de replicação genômica, tradução e empacotamento viral.

Os aptâmeros para esta região viral foram pré-selecionados por Cnossen (2014) utilizando o método do SELEX. Este método se baseou na seleção *in vitro* de oligonucleotídeos de cadeia simples que se ligaram a uma sequência dos sorotipos virais da dengue 5' UTR, e estão sendo caracterizados por meio de ensaios *in silico*, dot-blot (Cnossen, 2017) e espectroscopia de fluorescência – FRET (ARRUDA, 2016) no LaBioMol. O aptâmero B07 utilizado na construção do biossensor eletroquímico aqui desenvolvido foi recentemente publicado por Cnossen et al. (2017), demonstrando seu potencial de interação com o alvo.

Para o desenvolvimento do biossensor buscou-se a utilização de materiais de fácil acesso para a reprodução do aptasensor, e a voltametria cíclica foi aqui utilizada por ser técnica aplicada na detecção de pequenas concentrações de soluções nos ensaios, sendo amplamente utilizada na caracterização de biossensores.

Neste sentido, os aptâmeros, os quais têm demonstrado nas análises para detecções clínicas, bem como as técnicas eletroquímicas foram escolhidos no trabalho aqui apresentado por serem ambos versáteis, de baixo custo e apresentar facilidade em sua síntese. A combinação dos biossensores de DNA com técnicas eletroquímicas poderá viabilizar rotas seletivas e específicas capazes de detectar moléculas alvo com grande sensibilidade, podendo ser exploradas na detecção do vírus da dengue.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo utilizar técnicas eletroquímicas e de biologia molecular para o desenvolvimento de um aptasensor aplicado na detecção do vírus da dengue. Para tal fim, foi utilizado um aptâmero como elemento de bioreconhecimento e a região 5'UTR do vírus como elemento alvo.

3.2 – Objetivos específicos

- Avaliar a especificidade do aptâmero (B07) como ligante às sequências genômicas do vírus da dengue (alvo) por meio da técnica de dot-blot para utilização no desenvolvimento do biossensor;

- Avaliar a afinidade de interação entre aptâmero e alvo por meio de apta-PCR;

- Realizar testes de voltametria cíclica para verificar sua capacidade de distinção entre cadeias simples e duplas de ácidos nucleicos por meio de hibridização;

- Verificar a aplicabilidade do aptasensor na detecção dos sorotipos virais da dengue.

4 – MATERIAIS

RNase e meio LB (Luria Bertanni) foram obtidos da Amresco (São Paulo-SP, Brasil). Agarose foi adquirida da Agaren (BIOMOL, Riberão Preto-SP, Brasil). Ampicilina, hexâmetros e Taq DNA polymerase foram obtidos da Invitrogen™ (Carlsbad –CA, USA). Desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e trisaminometano foram obtidos da Ludwig Biotecnologia Ltda (Alvorada-RS, Brasil). BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato), lã de vidro, NBT (azul de nitrotetrazólio), Brometo de etídeo, e kit de marcação com estreptavidina foram obtidos da GE Healthcare Life (São Paulo- SP, Brasil). Partículas paramagnéticas revestidas com estreptavidina foram obtidas da Promega (Madison – WI, USA). O kit de detecção de sondas marcadas com biotina foi obtido da Thermo Scientific (Sinapse Biotecnologia). Álcool etílico e Ferroceno $(C_5H_5)_2$, Fosfato de sódio monobásico, Fosfato de sódio dibásico e Citrato de sódio salido foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Acetato de sódio e acetato de amônio foram adquiridos da Proquímicos. Hidróxido de sódio foi obtido da Labsynth (São Paulo – SP, Brasil). Ácido acético glacial e EDTA foi obtido de Proquimios (Rio de Janeiro – RJ, Brasil). Quitosana foi obtida de Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). Aptâmero B07 selecionado para a região 5'UTR do vírus da dengue foi sintetizado por Life Techologies (California, USA) e Dodecil sulfato de sódio foi obtido da mesma empresa. Membrana de náilon e *Alkaphos Direct Labellings Reagents* foram obtidos de GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

5 – METODOLOGIA

5.1 – Análises *in silico*

As hibridizações entre o aptâmero B07 pré-selecionado por Cnossen (2014) e as sequências 5'UTRs de cada sorotipo do DENV foram analisadas utilizando o webserver *RNAstructure Webserver* (REUTER & MATHEWS, 2010). A interação biomolecular entre a sequência do aptâmero B07 contendo 45 nucleotídeos foi realizada na categoria *Bifold versus* os quatro sorotipos virais do DENV com 150, 150, 149 e 150 nucleotídeos para DENV1, 2, 3 e 4, respectivamente, de acordo com Cnossen et al. (2017). A análise de ΔG foi realizada pela interação do aptâmero e alvo.

5.2 – Obtenção do alvo

5.2.1 – Extração de DNA plasmidial

As colônias de bactérias (estoque – LaBioMol) que apresentavam o inserto de DNA de cada um dos sorotipos do DENV em DNA plasmidial foram inoculadas em 5 mL de meio LB com ampicilina e incubadas a 37 °C (estufa incubadora – QUIMIS), por um período de 16 horas. Após essa incubação, realizou-se a extração do DNA plasmidial por meio de lise alcalina, seguida de quantificação por leitura em espectrofotômetro (Nanoquantificador L-Quant – Loccus Biotecnologia) no comprimento de onda de 260 e 280 nm. Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,8% (p/v) para análise de integridade.

5.2.2 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR e suas variações (simétrica e assimétrica) foi utilizada o para amplificação da região 5'UTR do vírus da dengue em termociclador (AmpliTherm Thermal Cycler). Para a amplificação simétrica de dsDNA (do inglês, *double strand*) foram utilizados 2 µL de cDNA, 1X tampão, 2,5 U da enzima *Platinum Taq DNA polymerase*, 25 mM de $MgCl_2$, 10 mM de cada dNTP, 7 pmoles de cada *primer* (*forward* e *reverse*). O volume final da reação foi de 20 µL. As condições foram semelhantes para a PCR assimétrica, contudo sem a adição do *primer reverse*.

As condições de termociclagem foram padronizadas para 32 e 26 ciclos para simétrica e assimétrica, respectivamente. Cada ciclo foi de 95 °C durante 30 s, 60 °C por 50 s e 72 °C em 2 min, e ao final seguido de 10 minutos para a extensão final com 72 °C.

5.2.3 – Eletroforese em Gel de agarose e Purificação dos produtos de PCR

A preparação dos géis deu-se pela utilização de agarose com concentração de 1,0% diluída em tampão TBE contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada em tampão TBE, sob tensão de 120 V por cerca de 45 minutos. Os produtos de PCR aplicados no gel foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminator, Loccus Biotecnologia) e o gel foi fotografado e salvo sua imagem.

Em seguida, os produtos de PCR foram purificados do gel de agarose com lã de vidro. Para isso, as bandas do gel foram cortadas na região especifica do alvo e em seguida colocadas em tubos de 0,6 mL com um pequeno furo na parte inferior do tubo e colocados dentro de um tubo de 1,5 mL, e foram submetidos a centrifugação de 13000 rpm (Centrífuga 5424 – Eppendorf) por 15 minutos. A amostra centrifugada foi coletada no tubo de 1,5 mL e adicionou-se acetato de amônio 7,5 M em uma proporção de 2 µL para cada 8 µL de produto e 30 µL de etanol absoluto para cada 10 µL de produto no tubo.

As amostras foram incubadas *overnight* (15h) a uma temperatura de -20 °C e posteriormente foi centrifugada a 13000 rpm por 30 minutos. O liquido sobrenadante foi retirado e descartado e adicionou-se 200 µL de etanol 70% ao precipitado. A amostra foi centrifugada novamente por 10 minutos a 1300 rpm, o liquido foi retirado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 µL de água ultrapura.

5.3 – Obtenção do aptâmero biotinilado para teste de Dot-Blot e apta-PCR

O aptâmero B07 previamente selecionado por CNOSSEN (2014) foi amplificado seguindo os seguintes parâmetros: 3 µL de B07, 1x tampão, 2,5 U da enzima *Platinum* Taq DNA polimerase, 25 mM de $MgCl_2$, 10 mM de cada dNTP, 5 pmoles de *primer* (*forward com biotina e reverse*) e foi adicionado água ultrapura até o

volume de 20 µL. APCR assimétrica foi realizada em sequência para obtenção da fita senso biotinilada com primer senso.

O material foi purificado, quantificado e com a finalidade de verificar se o aptâmero realmente estava biotinilado, foi realizado um teste de marcação com biotina. O teste de biotinização do aptâmero B07 foi feito conforme Cnossen et al. (2017).

5.3.1 – Dot Blot

Para análises de especificidade do aptâmero B07 como ligante à regiões genômicas do vírus da dengue (DENV), os seguintes produtos de ácidos nucleicos foram fixados em membrana de nylon numa concentração de 400 ng: (i) pool da 5'UTR de DENV, (ii) 5' UTR para cada um dos sorotipos de DENV (1, 2, 3, 4), (iii) aptâmero C10 como não ligante a B07 (Cnossen et al., 2017), (iv) pool da 3'UTR de DENV, 5'UTR do zika vírus (ZIKV), e fita complementar do aptâmero de B07 (controle positivo de hibridização). A membrana foi hidratada com 5 mL de tampão de hibridização durante 15 minutos a temperatura ambiente, e após esse período foi adicionado a sonda (aptâmero B07) para ocorrer o processo de hibridização em um período de 18 horas com leve agitação constante, em tampão de hibridização.

Nesta etapa de hibridização foi seguido as indicações do fabricante do kit de marcação com estreptavidina (GE Healthcare), e após foi realizada a detecção colorimétrica, em que se usou os reagentes NBT (azul de nitrotetrazólio) em uma concentração de 0,19 mg/mL e BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) a 0,4 mg/mL.

5.3.2 – Apta-PCR

O produto de fita dupla biotiniliado do aptamero B07 (100 ng) foi desnaturado a 90° C por 10 min, e reservado na temperatura ambiente até o uso.

As partículas paramagnéticas na concentração de 1mg/ml foram preparadas para uso por meio de ressuspensão em água ultrapura. O tubo contendo as partículas foi colocado na plataforma magnética para separá-las. Quando estava limpo, o sobrenadante foi aspirado gentilmente e descartado. Foram realizadas 2 lavagens das partículas com 0,5 X SSC. Após cada lavagem, os beads magnéticos foram capturados

pela plataforma e o sobrenadante foi retirado. A última lavagem foi realizada com *binding buffer*.

Após a última lavagem dos beads, acrescentou-se o produto biotinilado que estava reservado + 120 µl de *binding buffer*, vedando o tubo com parafilme. O produto foi incubado em banho seco (QUIMIS – Microtubs) por 30 min a 37°C agitando constantemente por inversão de 1-2 min. Depois de incubado o produto foi precipitado em centrifuga e transferido para para a plataforma magnética a fim de promover a separação dos beads magnéticos do sobrenadante. O sobrenadante que continha o produto amplificado não marcado com biotina (fita antisenso) foi reservado para testes no biossensor. Este processo foi repetido por duas vezes.

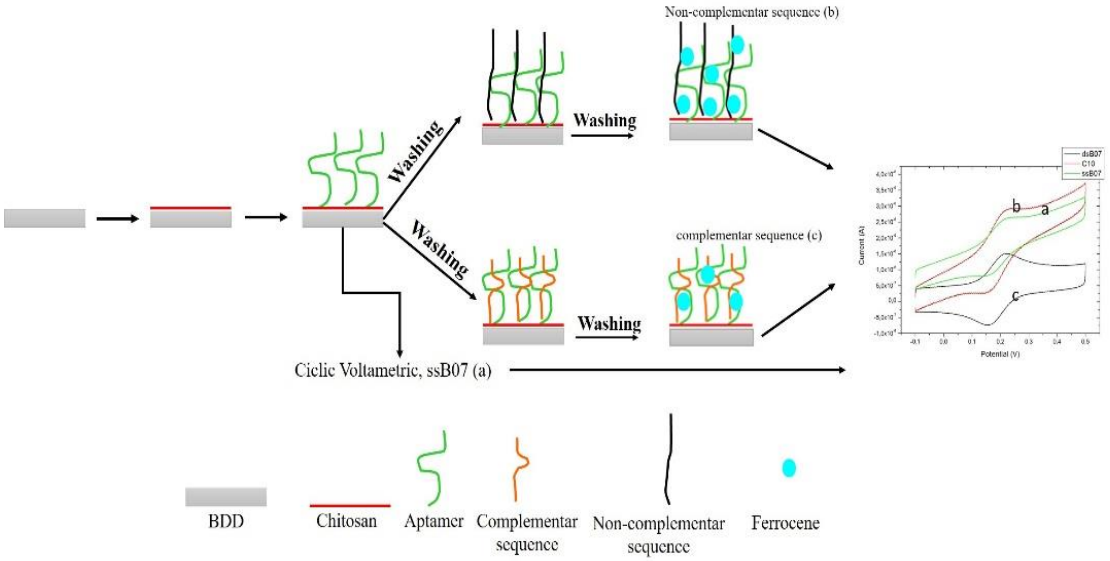
A fita senso do B07 foi capturada pelos beads magnéticos, sendo utilizada para o teste de apta-PCR para captura do DENV. Para isto, o genoma plasmidial, contendo DENV3 como inserto, numa concentração de 400 ng foi desnaturado por 10 minutos à 95 °C. Em seguida, o material desnaturado foi incubado à 38 °C com as partículas magnéticas contendo o aptâmero B07 por aproximadamente 30 minutos em banho seco para a captura do alvo.

As moléculas não ligantes foram retiradas e os beads magnéticos-B07 foram eluídos em 10 µl de H_2O ultrapura. Uma desnaturação por 10 min a 95 °C foi realizada para ruptura das ligações de hidrogênio entre as sequências alvo, composto pelo genoma de DNA plasmidial contendo DENV como inserto e aptâmero B07. Após passagem dos beads magnéticos/B07 pela plataforma magnética, o sobrenadante foi quantificado e submetido à PCR para amplificação de DENV.

5.4 - Desenvolvimento do Biossensor

A metodologia utilizada para desenvolvimento do biossensor foi baseada e modificada de acordo com os métodos adotados por Teles (2007). O mecanismo utilizado para construção do biossensor está descrito na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática do biossensor eletroquímico com elemento bioreconhecedor aptâmero B07. (a) aptâmero imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho com sonda redox. (b) aptâmero e controle negativo apresentando baixa condutividade de sonda redox na superfície do eletrodo. (c) na presença da fita complementar do aptâmero imobilizado conduzindo menor acesso a sonda redox a superfície do eletrodo. (Fonte: próprio autor).



5.4.1 – Preparação do eletrodo

Inicialmente, a superfície do eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) foi limpada num banho de ultrassom (Ultrassonic Cleaner – Odontobras) durante 15 minutos. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada esterilizado sob luz UV (Fluxo Unidirecional Horizontal – Jdeoxima) por 1 hora. Esse ensaio foi repetido após cada experimento de voltametria.

A superfície do eletrodo foi revestida uniformemente com 2 mL de solução de 1% quitosana em 1% de ácido acético com leves agitações manuais por 2 minutos. A solução foi descartada e o eletrodo seco ao ar. Em seguida, o eletrodo foi imerso em solução de 0,1 M de NaOH durante 10 minutos, a fim de estabilizar o filme de quitosana. Em sequência, novamente o eletrodo foi deixado secar ao ar entre 5 a 10 minutos. Sobre o eletrodo foi adicionado 3,1 $mg.mL^{-1}$ da sonda/aptâmero por um período de 2h. Após imobilização, o eletrodo foi lavado com tampão fosfato 0,1 M e 0,1% (m/m) de SDS, para a remoção de DNA não ligado. O eletrodo foi mantido imerso em tampão TE 0,01M até a sua utilização.

5.4.2 – Hibridização e detecção eletroquímica

Após a sonda imobilizada, 400 ng da sequência alvo foi colocada sobre a superfície do eletrodo. Posteriormente, o eletrodo foi colocado durante 1h em estufa à 42 °C para a hibridização das sequências. Foram realizadas duas lavagens com a solução 0,1X SSC/0,1% SDS para que o material não hibridizado fosse retirado.

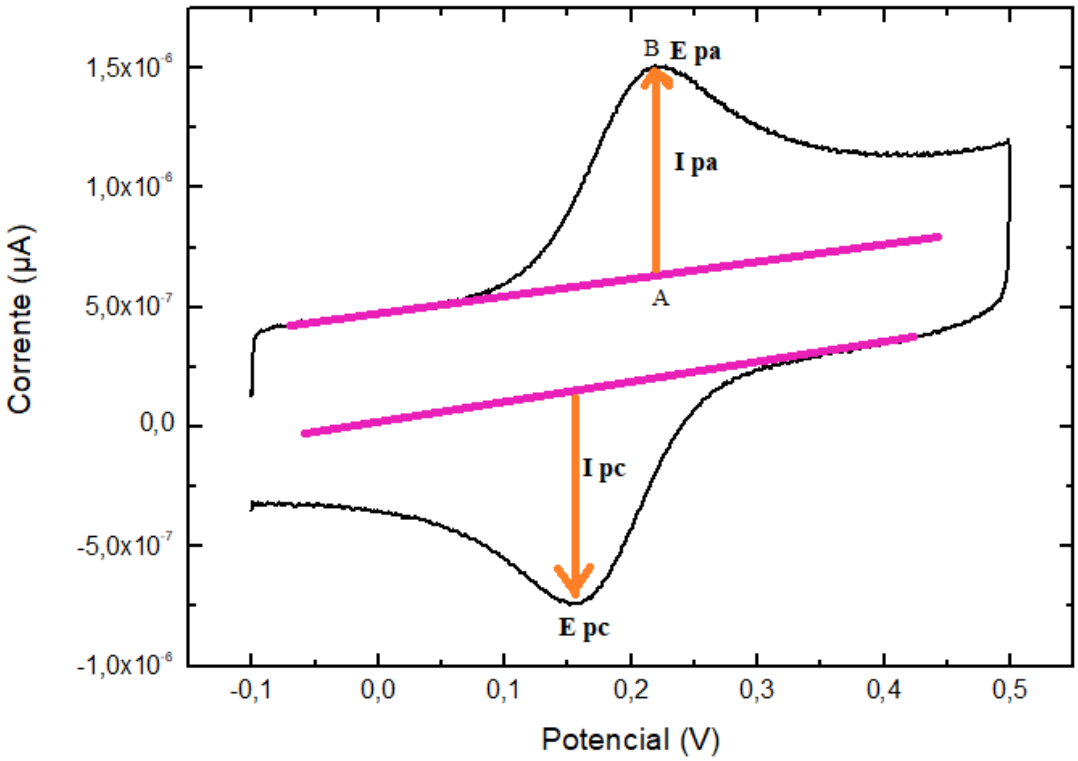
Os ensaios de voltametria cíclica com ligação indicativa de hibridização foram realizados em Potenciostato/Galvanostato modelo PGSTAT 128N da AUTOLAB sendo as variáveis eletroquímicas controladas a partir do software GPES. Durante as leituras, o eletrodo permaneceu imerso em tampão TE 0,01M (pH= 8,0) contendo 0,4mM de ferroceno ($FcPF_6$), em 50 $mV.s^{-1}$, com faixa de varredura entre -0,1 a 0,5 V, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro (eletrodo de trabalho), um eletrodo de platina (contra eletrodo) e um eletrodo de Ag/AgCl (eletrodo de referência).

As análises foram realizadas em triplicatas e para comprovar a eficiência do biossensor e obter dados que corroboram com os resultados obtidos do *dot blot* foram realizados testes pilotos com e sem formação de filme de quitosana na superfície do eletrodo de diamante dopado com boro, sendo eles: controle positivo e negativo, ferroceno e fita simples do aptâmero. Em seguida, as análises foram realizadas com as sequências dos sorotipos virais da dengue.

Para a obtenção dos valores de correntes capacitivas (valores reais), foram descontados os valores de correntes de fundo denominados de corrente faradaica. Na Figura 11 está um voltamograma, em que foi traçada uma reta para demonstração do cálculo de obtenção da corrente capacitiva, por meio da subtração do valor final (B) pelo inicial (A), para se eliminar ruído (*background*) do processo.

Para dados comparativos, os valores de corrente capacitiva foram obtidos em triplicatas a partir das varreduras de voltametria cíclica, os quais foram comparados com a fita simples do aptâmero (ssDNA) e os demais valores de correntes das cadeias analisadas.

Figura 11 - Representação de um voltamograma cíclico para parâmetros obtidos com esta técnica. (Ipa) corrente de pico anódica, (Ipc) corrente de pico catódica, (Epa) potencial anódico, (Epc) potencial catódico. Seta: valor da corrente dada pela altura do pico. (Fonte: próprio autor).



O teste T foi aplicado utilizando o programa Graph Pad Prism versão 5, sendo considerados significativos valores de $P<0.05$. Para as leituras com variações de tempo seguiram-se os mesmos parâmetros de leituras. Os tempos de 1, 6, 7 e 8 minutos após a varredura inicial foram também analisados, a fim de se verificar a estabilidade do biossensor em função do tempo.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 – Análise *in silico*

Para compreender o processo de hibridização do aptâmero B07 com as sequências dos sorotipos virais da dengue, realizou-se um teste *in* silico tendo como base no método adotado por Cnossen e colaboradores (2017), demonstrando a afinidade do aptâmero selecionado como ligante da região 5’ UTR do vírus da dengue.

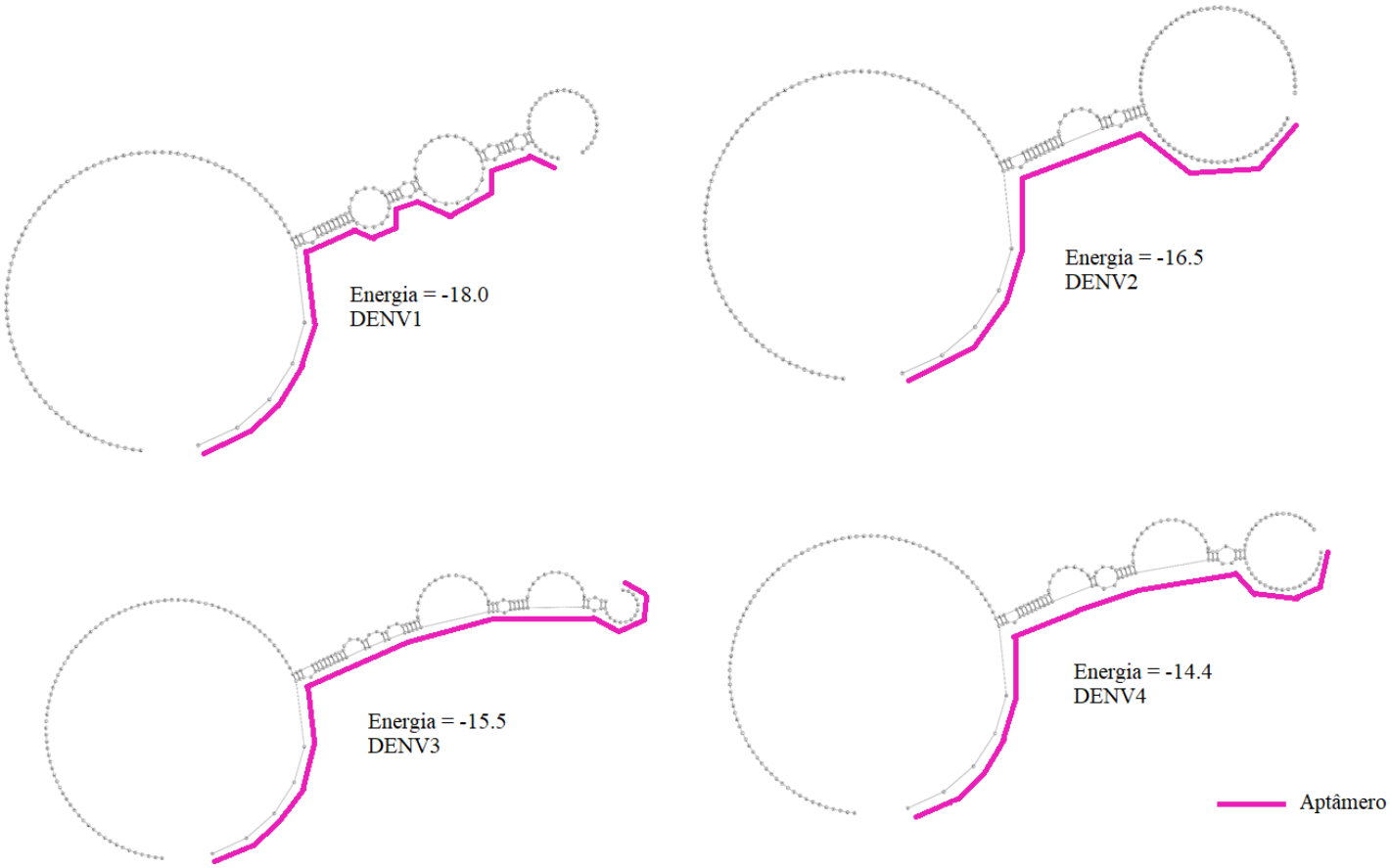
O teste *in silico* (Figura 12) foi capaz de prever as estruturas secundárias formadas a partir da hibridização, e forneceu a estrutura com maior interação dos pares de bases complementares, sendo que o hibrido formado foi analisado por meio da energia livre (ΔG) relacionando-os com ensaios de afinidade das sequências.

O aptâmero hibridizou com todas as regiões 5’ UTRs dos quatro sorotipos virais da dengue, em que as sequências analisadas formaram estruturas semelhantes particularmente para os sorotipos virais da dengue (DENV1, 2, 3 e 4) (Figura 12).

As análises termodinâmicas demonstraram que a interação entre o aptâmero B07 são estáveis, apresentando os seguintes valores de energia livre: -18, -16,5, -15,5 e -14, 4 kcal.mol^{-1}, para DENV1, 2, 3 e 4, respectivamente.

A organização estrutural das moléculas é dada a partir de subestruturas que colaboram para a energia livre da mesma e tem grande importância para o reconhecimento molecular e a interação de ácidos nucléicos com ligantes (PATEL & SURI, 2000). As estruturas com maior probabilidade de interação apresentam *loops* e *hairpins*, isto ocorre porque as bases que não apresentam complementariedade ficam desemparelhadas e tornam-se mais flexíveis alterando a conformação das cadeias hibridizadas (CHUSHAK & STONE, 2009). A estrutura de maior estabilidade de interação entre ligante e alvo foi para o DENV1 o qual apresentou menor energia livre na estrutura formada.

Figura 12 - Resultados dos testes *in silico* para a hibridização do aptâmero B07 com os sorotipos virais da dengue, formando uma estrutura. (Fonte: próprio autor utilizando simulação conforme webserver/REUTER & MATHEWS, 2010).

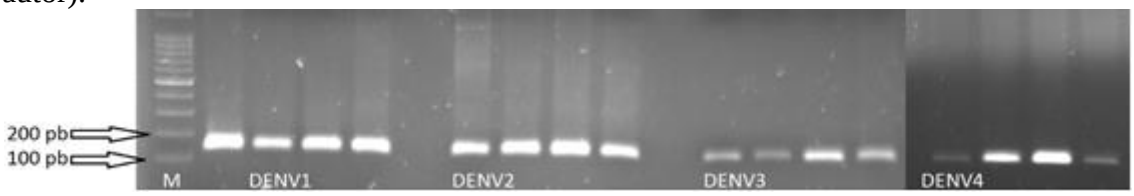


6.2 – Dot-Blot e apta-PCR

A técnica da PCR é utilizada para a amplificação de DNA, em que as fitas de ácidos nucléicos são utilizadas como moldes e amplificadas por síntese enzimática, *in vitro* (PASTERNAK, 2002). Desta forma, ao final da reação, o produto amplificado apresenta maior concentração e nível de pureza.

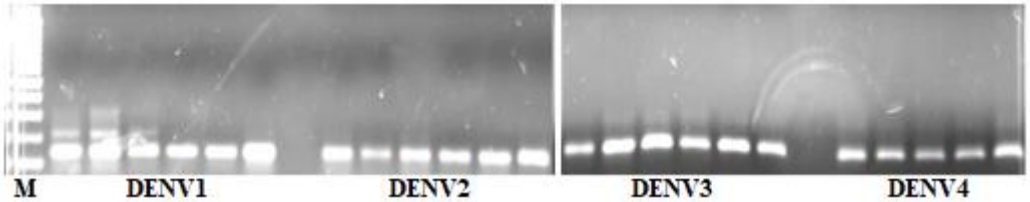
O método de PCR foi largamente utilizado para a amplificação de produtos de DENV fita dupla e simples do alvo (5-UTR+55 nt) em estudo, sendo primeiramente realizada com cDNA (DNA complementar) flanqueando o genoma viral com aproximadamente 150 pb, correspondente ao alvo analisado e que podem ser observados a partir da eletroforese em gel de agarose apresentado na Figura 13. Conforme esperado, a região 5' UTR foi próxima a 150 nucleotídeos. Os 55 nucleotídeos adicionados para a amplificação correspondem à região CS (sequência conservada) e o *hairpin* (cHP), que participam na tradução e síntese de RNA viral (POLACEK et al., 2009).

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose de PCR obtidos de DNA plasmidial dos sorotipos virais (DENV1, 2, 3 e 4). M - Marcador de peso molecular. (Fonte: próprio autor).



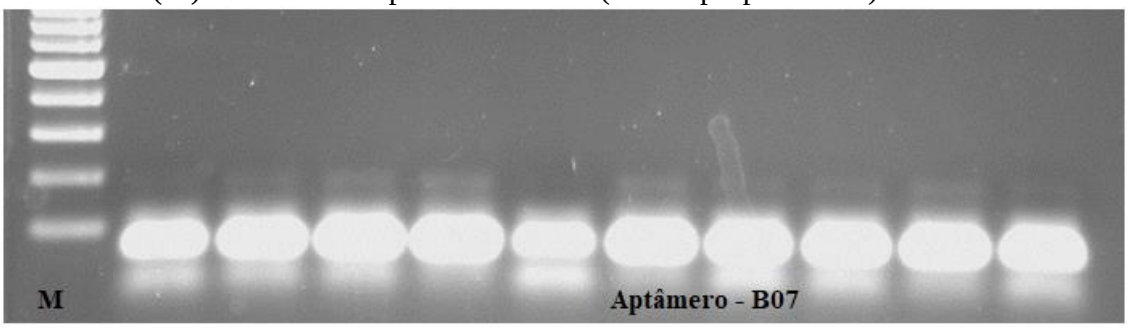
Para que os testes de voltametria cíclica fossem realizados, para obtenção do biossensor foi necessário sintetizar ssDNA dos sorotipos virais. Na Figura 14 está apresentado o produto amplificado de ssDNA dos sorotipos de DENV apresentando os pesos moleculares esperados de 150 pb.

Figura 14 - Resultado de PCR convencional para obtenção de ssDNA. (M): Marcador de peso molecular. (Fonte: próprio autor).



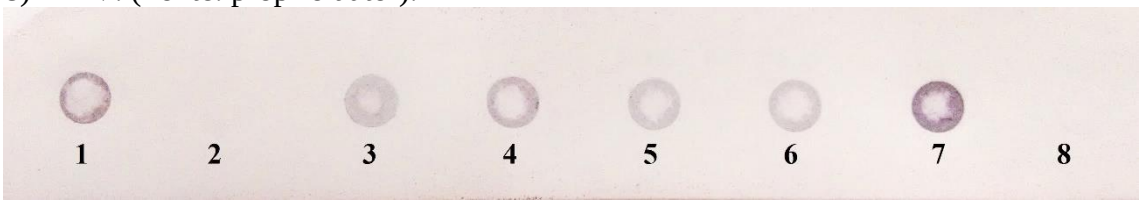
Na Figura 15 está apresentada a PCR utilizando primer biotinilado para a amplificação do aptâmero B07apresentando produto esperado de 54 pb.

Figura 15 - Resultado de PCR convencional para obtenção do aptâmero B07 biotinilado. (M): Marcador de peso molecular. (Fonte: próprio autor).



O teste de *dot blot* está apresentado na Figura 16. O resultado obtido no teste de *dot blot* demonstrou a afinidade do aptâmero selecionado para os sorotipos virais da dengue e controle positivo através das reações colorimétricas ocorridas na superfície da membrana, estas marcações se dão através da hibridização entre a sonda (B07) e os alvos imobilizados.

Figura 16 – Dot-blot para análise da afinidade do aptâmero B07 com os sorotipos virais o DENV. 1) dsB07, 2) Controle negativo (C10), 3) D1, 4) D2, 5) D3, 6) D4, 7) 3'UTR, 8) ZIKV. (Fonte: próprio autor).



O dot-blot é uma técnica colorimétrica específica que avalia rapidamente a afinidade de interação entre ácidos nucléicos. O DNA possui em sua estrutura cargas negativas devido ao grupamento fosfato sendo sua sequência imobilizada por meio de interação eletrostática em uma membrana que se encontra carregada positivamente. A detecção do processo de hibridização entre a sonda (sequência com especificidade ao alvo) marcada por um fluoróforo ou enzima e o alvo será feita por método específico (LARA, 2002). Esta técnica tem sido utilizada para o monitoramento de especificidade e afinidade de ligantes em processos onde são selecionadas sequências com alta seletividade (CLARK & PAZDERNIK, 2011).

Dentro deste contexto, a especificidade do aptâmero B07 com o alvo (DENV 1, 2, 3 e 4) foi comprovada utilizando pela detecção colorimétrica de sequências específicas de ácidos nucléicos (MURRAY, ROSENTHAL & PFALLER, 2014).

A sonda marcada com biotina ligou-se à proteína estreptavidina devido a sua afinidade. Quando a fosfatase alcalina (AP) se liga à estreptavidina produzirá um sinal colorimétrico na presença do substrato NBT/BCIP. Assim, a partir da marcação colorimétrica de cada sequência imobilizada foi possível comprovar que o aptâmero B07 tem afinidade para as sequências de DENV. O híbrido dsB07 utilizado como controle positivo, apresentou marcação forte nesta região devido ao completo pareamento de bases entre sonda e alvo.

As sequências dos aptâmeros C10 e ZIKV não apresentaram marcações colorimétricas pelo fato de não serem ligantes a regiões desta sequência. Para 3'UTR a marcação é justificada pelo fato de apresentar regiões de homologias com a 5'UTR; a qual foi utilizada para a seleção dos aptâmeros.

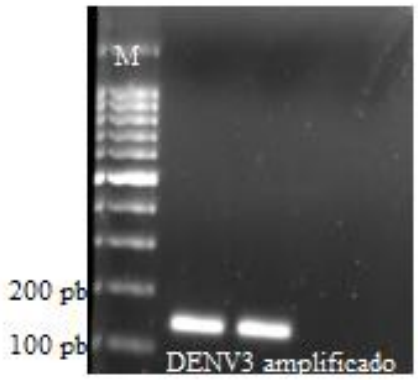
Em estudos sobre a aplicação dos aptâmeros nota-se que a técnica de *dot blot* tem sido largamente utilizada para a confirmação da especificidade de aptâmeros. Por exemplo, foi utilizada para a detecção da proteína Imunoglobina E (IgE) com um aptâmero biotinilado (WANG et al., 2013); como técnica para a avaliação de trombina com um aptâmero de DNAzima ligada (ZHU et al., 2010); e ainda, na validação de aptâmeros ligantes ao vírus da gripe aviaria (H_5N_1) (WANG et al., 2013).

Portanto, os aptâmeros têm sido considerados moléculas promissoras, principalmente por serem específicos e versáteis em suas aplicações em diferentes sistemas e áreas de interesse científico. Especificamente nos estudos com vírus, estas moléculas podem ser utilizadas para detectar precocemente, e de forma confiável, o patógeno, podendo ter grande relevância para tratamento e controle nas epidemias provocadas por vírus (MIYAZAKI et al., 2012). Para a comprovação da especificidade dessas sequências, a técnica de *dot blot* tem sido bastante empregada antecedendo métodos mais aprofundados, fato justificado pela rapidez e eficiência do teste.

Além do dot-blot, a apta-PCR tem demonstrado utilização desde análises de controle na qualidade de alimentos até os diagnósticos clínicos, visando avaliar a capacidade de amplificação do alvo a partir da seletividade do aptâmero em estudo, aumentando a sensibilidade da PCR (MARANGONI et al., 2015; PINTO et al., 2016).

Na Figura 17 pode-se visualizar o resultado positivo da apta-PCR na detecção do dengue tipo 3 pré-capturado pelo aptâmero B07. Estes dados corroboram aos ensaios feitos por Marangoni e colaboradores (2015) os quais adotaram esta técnica para confirmar o potencial do aptâmero CG3 marcado com biotina em selecionar e se ligar seletivamente a sequência de PCA3-277, um gene específico do câncer de próstata. Neste estudo, o CG3 apresentou capacidade de ligação à moléculas de RNA conformacional de fragmentos do gene PCA3, após a utilização de partículas magnéticas para a captura do alvo.

Figura 17 - Resultado de apta-PCR a partir do produto de DENV3 capturado por B07 a partir de partículas magnéticas. (M) Marcador de peso molecular. Seta: branco de reação. (Fonte: próprio autor).



A concentração final da captura para DENV foi de aproximadamente 200 ng. Esta concentração foi próxima à adicionada no início do processo de apta-PCR para avaliação da interação aptâmero-alvo. Estes dados demonstram que o método utilizado foi capaz de fornecer resultados confiáveis e rápidos sobre a seletividade e afinidade do aptâmero pelo alvo.

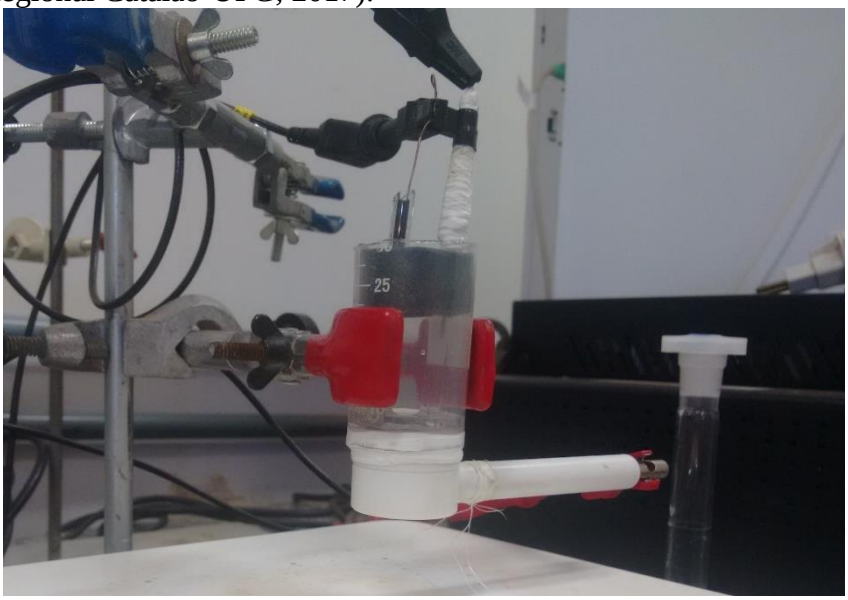
6.3 – Aptassensor

A princípio as varreduras foram realizadas utilizando um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho. No entanto, o mesmo não foi utilizado, pois não apresentou atividade para ser utilizado como biossensor de ácidos nucleicos. Por isso, a fim de otimizar o sistema físico adaptado para as leituras voltamétricas foi

utilizado o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) o qual apresentou-se mais adequado para as análises propostas.

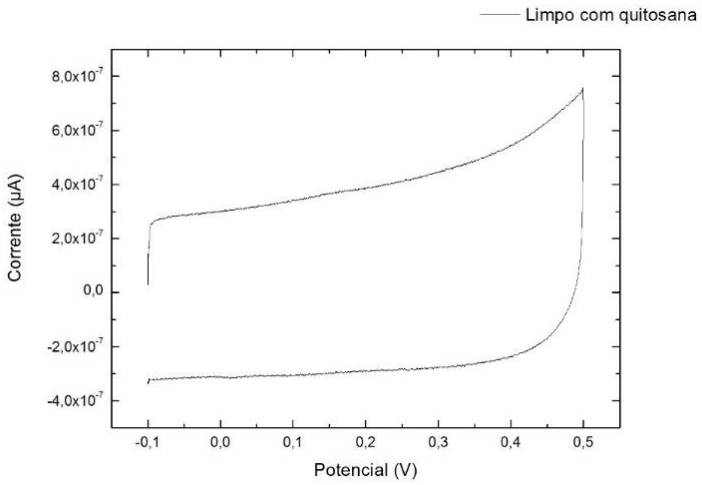
Ao contrário do eletrodo de carbono vítreo, o DDB apresentou superfície ativa para a limpeza possibilitando as varreduras por apresentar grande faixa de potencial para leituras voltamétricas. Estes dados corroboram a literatura que o descreve como apresentando boas características estudo com biossensores por ser inerte, ter boa resistência a corrosão e dureza e baixa corrente de fundo (MONTANARO & PETRUCCI, 2009). Na Figura 18 está apresentado o sistema físico montado e adaptado para a realização das leituras voltamétricas.

Figura 18 - Sistema físico adaptado para a realização das leituras voltamétricas. (Fonte: LAPAM-Regional Catalão-UFG, 2017).



Para os testes com filme de quitosana aderido à superfície do DDB foram realizadas leituras voltamétricas apenas com a modificação do filme de quitosana, seguindo-se os mesmos parâmetros de varredura para verificar se os grupamentos químicos da quitosana não afetaria diretamente na corrente resultante. Na Figura 19, observa-se no voltamograma a ausência de pico relativo a processos de redução/oxidação, por não apresentar material eletroativo na superfície do sensor, isso ocorreu porque após cada leitura voltamétrica para as sequências em estudo a limpeza do eletrodo foi eficiente para a retirada do material imobilizado nas leituras anteriores.

Figura 19 - Voltamograma após limpeza do eletrodo com filme de quitosana formado na superfície de DDB. (Fonte: próprio autor).



Os ensaios iniciais com DDB tiveram como objetivo a análise das correntes obtidas de cada um dos materiais analisados, a fim de comparar as diferentes sequências presentes na superfície do eletrodo.

Ao desenvolver o biossensor foi observado que o composto redox Ferroceno se ligou a locais inespecíficos para cada uma das cadeias, isso é confirmado a partir da variação de valores de correntes para cada sequência analisada. Não é possível prever a estrutura molecular formada na superfície do sensor após a hibridização em superfícies sólidas. O que comprovou a ligação e especificidade do biossensor para cada cadeia de DNA formada foi a forma de interação entre Ferroceno e as cadeias híbridas, gerando uma corrente que varia de acordo com o material em análise.

Os valores de correntes apresentados na Tabela 1 e 2 são referentes aos resultados de correntes obtidas nas leituras de dsB07 (sequência complementar ao aptâmero), ssB07 (apenas aptâmero) para análise do comportamento da fita simples imobilizada em comparação com a sequência complementar, C10 (aptâmero adotado como controle negativo), os quatro sorotipos virais de DENV (DENV1, 2 3 e 4) e leitura para Ferroceno com eletrodo de trabalho limpo com e sem formação de filme de quitosana, respectivamente.

Os dados de desvio padrão (DP) comprovam o grau de reprodutibilidade das análises 1, 2 e 3, e afirma-se que, quanto mais o valor se aproxima de zero (0) mais próximos estavam os valores de correntes. Por exemplo, na Tabela 1, DENV4 apresentou DP de 0,017 comprovando que dentre todos os dados obtidos esta sequência

foi a que apresentou maior reprodutibilidade no biossensor, o oposto ocorreu com C10 que o DP é de 0,763.

Tabela 1 - Valores de correntes e potenciais para sequências utilizadas para análises no biossensor com formação de filme de quitosana.

Material	Análise 1 (µA)	Análise 2 (µA)	Análise 3 (µA)	Média das análises (µA)	Desvio padrão
Ferroceno	0,064	0,383	0,626	0,357	0,192
ssB07	0,575	0,83	0,479	0,628	0,181
dsB07	0,852	1,09	0,792	0,911	0,157
C10	0,928	2,34	1,13	1,468	0,763
DENV1	0,608	0,63	0,952	0,73	0,192
DENV2	0,681	0,63	0,783	0,698	0,077
DENV3	0,813	0,78	0,787	0,793	0,017
DENV4	0,772	1,16	1,165	1,032	0,225

Tabela 2 - Valores de correntes e potenciais para sequências utilizadas para análises no biossensor sem formação de filme de quitosana.

Material	Análise 1 (µA)	Análise 2 (µA)	Análise 3 (µA)	Média das análises (µA)	Desvio padrão
Ferroceno	0,931	0,918	0,743	0,864	0,104
ssB07	1,149	1,751	1,386	1,428	0,303
dsB07	1,146	0,982	0,467	0,865	0,354
C10	1,715	0,778	0,958	1,150	0,497
DENV1	1,176	1,551	0,886	1,204	0,333
DENV2	0,970	1,396	0,945	1,103	0,253
DENV3	1,883	1,824	1,055	1,587	0,461
DENV4	1,447	1,878	0,972	1,402	0,453

Ao iniciar a análise dos dados ressalta-se a importância da utilização da sonda redox para ampliação do sinal, neste caso, o ferroceno é o composto indicador de reação redox utilizado nas análises eletroquímicas, o qual possibilitou a obtenção das respostas referentes ao material analisado através da técnica de voltametria cíclica. Esta sonda redox foi capaz de interagir com todas as cadeias de ácidos nucléicos

imobilizadas no sensor, demonstrando a variação no valor de corrente a cada mudança de estrutura e sequência imobilizada.

A princípio, o dado analisado foi com análises de ferroceno em concentração de 0,4 mM, com e sem formação de filme de quitosana. Observou que o valor de corrente para Fc^+ foi o menor obtido em todas as análises iniciais, o que era esperado. Neste caso ocorre o impedimento de transporte eletrônico no eletrodo nu. O inverso ocorreu quando o eletrodo apresentou algum tipo de material imobilizado em sua superfície, elevando o valor da corrente.

Para análise com ferroceno no eletrodo sem filme de quitosana adotou-se a mesma concentração de sonda redox, e o valor de corrente obtido foi significativamente mais elevado em comparação à análise do ferroceno com filme de quitosana, esse dado pode ter sido elevado porque, o mesmo eletrodo foi utilizado para todas as análises realizadas, e este fenômeno pode ter sobrecarregado o transdutor (TELES, PRAZERES & LIMA-FILHO, 2007).

O ferroceno (Fc^+) sendo um ligante eletroativo é muito utilizado como sonda redox para marcação covalente das cadeias de DNA. Neste estudo, foi possível observar variações nos valores de correntes obtidos como resultados das leituras voltamétricas para cada uma das cadeias que eram imobilizadas no sensor, pois a interação dar-se-á de acordo com a natureza da cadeia de ácido nucléico na superfície do eletrodo (ABNOUS et al, 2016).

Para as leituras voltamétricas do eletrodo com filme de quitosana verificou-se que o composto eletroativo demonstrou maior afinidade pela dupla cadeia de DNA, ou seja, a cadeia formada pela fita simples do B07 e sua sequência complementar, o Fc^+ interagiu melhor em locais de ligações do sulco de dupla fita formada da hibridização das cadeias que foram capturadas pelo aptâmero (JU, YE & GU, 2004). Compreende-se que esses valores são obtidos quando diferentes concentrações de Fc^+ se aproximam do eletrodo de trabalho, gerando correntes equivalentes à reação redox que ocorrem no sensor, originando uma transferência eletrônica.

A partir dos valores de corrente obtidos observou-se que a imobilização do dsB07 com filme de quitosana apresentou corrente de 0,91 µA distanciando 0,29 µA de ssB07, demonstrando a sensibilidade do biossensor em distinguir as fitas simples e duplas de DNA e, maior interação do ferroceno com as cadeias hibridizadas em análise. Todo o processo de caracterização das cadeias formadas no DDB está diretamente

relacionado com o processo de captura, interação e hibridização do aptâmero B07 e das sequências que foram adicionadas.

As análises apresentadas na Tabela 1 com formação do filme de quitosana apresentaram os valores de corrente para dsDNA (0,91 µA), e ssB07 (0,62 µA) e quando comparadas com DENV1, 2, 3 e 4, obteve-se como resultado de corrente 0,73; 0,69; 0,79 e 1,03 µA, respectivamente. Os valores apresentados apresentaram semelhanças com dsB07, e a partir desta comparação verificou-see que as correntes mais aproximadas para esta sequência foi de DENV3 com semelhança de 86,82% e DENV4 com 88,35% apresentando maior grau de hibridização com o aptâmero, e favorecendo a interação com o ferroceno nos sulcos livres formados entre a dupla fita hibridizada. As leituras para a cadeia de fita dupla de DNA (dsB07) foram significativamente maiores comparado ao DNA de fita simples (ssB07) e ao Fe^{+} ($p < 0,05$).

A sequência do aptâmero C10 apresentou grande diferença dos demais valores de corrente obtidos, com diferença de 61,9 e 74,7% com e sem filme de quitosana; respectivamente, em comparação com o valor obtido para o controle positivo dsB07. Principalmente considerando o dado de maior significância estatística que foi o ensaio com quitosana, esta diferença é bem acima do observado com os sorotipos virais, provavelmente devido a um limite de hibridização e formação de um resultado falso positivo. Este fato é comprovado pelo resultado do *dot blot* realizado anteriormente, em que a sequência foi previamente desnaturada para realização do teste.

Estes dados requerem maior avaliação sobre a interação destas sequências na superfície do eletrodo, bem como para avaliação de falto positivo, por ambos apresentarem estruturas conformacionais para imobilização no sensor. As sequências dos dois aptâmeros (B07 e C10) utilizados podem ainda apresentar regiões de homologia, já que foram selecionados com especificidade para a mesma região do vírus e, podem estar interagindo em pontos específicos não necessariamente devido à hibridação e interação seletiva das cadeias alvo.

Outros pesquisadores obtiveram resultados com grande semelhança aos apresentados, tais como aqueles publicados por Oliveira e outros pesquisadores (2015) que desenvolveram um biossensor eletroquímico específico para o sorotipo 3 do vírus da dengue utilizando uma sequência oligonucleotídica sintética como elemento bioreconhecedor. No entanto, neste estudo, não foi utilizado um outro ácido nucleico como controle negativo de hibridização de cadeias de DNA. Abnous (2016), por

exemplo, realizou a produção de um aptasensor para a detecção de ciprofloxacina o qual apresentou variações de correntes mais elevadas quando as sequências apresentaram grande nível de hibridização entre si, favorecendo a interação com o Fc^{+}.

Os resultados dos valores de corrente obtidos são baseados nos sítios de oxidação das bases nitrogenadas que compõem a sequência hibridizada. Dentre as bases que formam os ácidos nucléicos, a guanina é conhecida e utilizada como biomarcados usual para biossensores, pois apresenta maior potencial de oxidação entre as demais bases (SANTOS, 2014). Portanto, os sinais de hibridização detectados podem ser obtidos através da transferência de elétrons entre as duas bases mais eletroativas do DNA que são guanina e adenina.

O aumento do pico de oxidação gerado pode ser facilmente obtido a partir da oxidação das bases purinas do DNA em análise. A oxidação da guanina e adenina é realizada em duas etapas, com a perda de quatro elétrons e quatro prótons (PALECEK, 1983). A detecção foi também facilitada com a presença do ferroceno que interagiu com a molécula de DNA através da afinidade por regiões de sulcos livre e desta forma, o sinal redox é aumentado ou diminuído com cada uma das sequências, o que pode ser observado a partir da Tabela 1 que a sonda redox apresentou melhor interação pelos híbridos com maior índice de hibridização.

Ao colocar em discussão a utilização de DDB com imobilização direta do aptâmero em sua superfície ainda permanece por se esclarecer as informações em nível molecular de como se dão as interações nos biossensores. Neste sentido, algumas análises em nanoescala estão sendo desenvolvidas para estudar as interações celulares e moleculares em tempo real, a fim de fornecer aos biossensores sensibilidade superior aos métodos convencionais (KOHLES et al., 2011).

Outro fator que deve ser estudado durante a construção do biossensor é a formação do filme de quitosana (modificação da superfície do eletrodo). Uma variedade de materiais já tem sido utilizada e, favorecem a imobilização do elemento de bioreconhecimento, colaborando diretamente na estabilidade e sensibilidade da sequência, reduzindo o tempo de resposta, e possibilitando limites de detecção menores (ZHANG et al., 2014).

Portanto, ressalta-se nesta etapa do desenvolvimento do aptasensor que a hibridização das cadeias imobilizadas foi determinante para a variação da corrente para as leituras realizadas. A modificação da superfície do eletrodo com a formação do filme (polímero inerte) pode ter melhorado a estabilidade do material imobilizado,

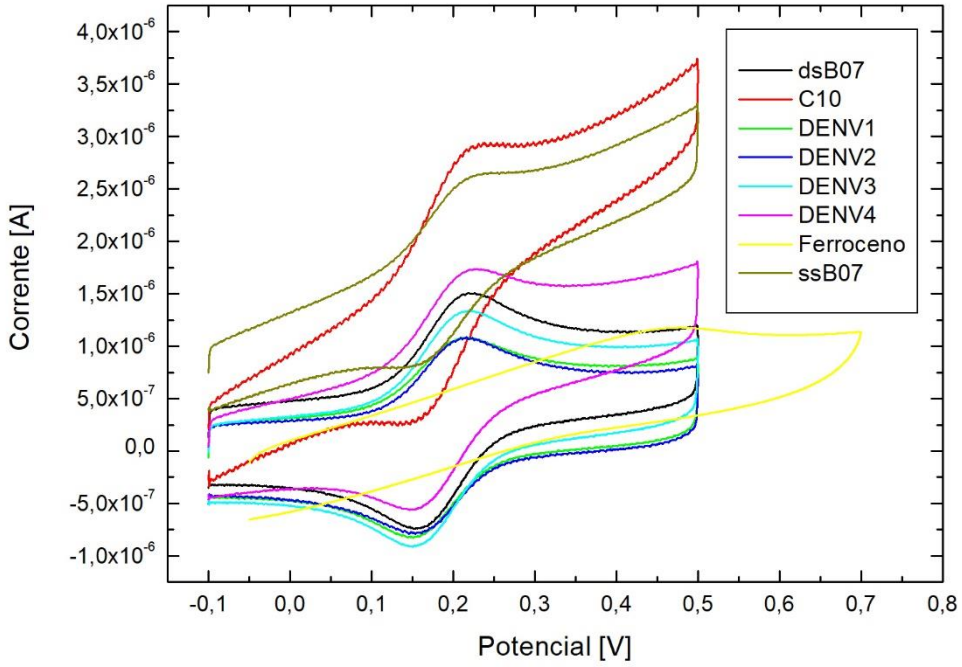
favorecendo os valores de correntes obtidos, trazendo mais coerência aos dados que foram comparados. A instabilidade do material imobilizado diretamente no sensor de leitura e a falta de conhecimento sobre os pontos de ligação do aptâmero na superfície sensora, dará origem a uma estrutura tridimensional não conhecida, desfavorecendo a reprodutibilidade do biossensor pela incapacidade de descrever a organização das sequências após imobilização.

Os testes de hibridização da região 5'UTR para cada um dos sorotipos de DENV utilizando o biossensor eletroquímico DDB com e sem quitosana que foram apresentados na Tabela 1, demonstram que os valores de corrente para DENV 1, 2, 3 e 4 de 0,73, 0,69, 0,79 e 1,03 µA, respectivamente, aproximaram-se da dsB07 em 0,91 µA. Os valores de correntes faradaica obtidos para DENV (1, 2, 3 e 4) foram comparados aos obtidos para dsDNA (dupla fita do aptâmero) no eletrodo como quitosana os quais foram aproximados conforme esperado; pois, a dupla fita foi utilizada como controle positivo, sendo possível comprovar afinidade do aptasensor com as sequências de DENV.

Os resultados de correntes obtidos através das leituras de DENV devem ser comparados aos valores finais de corrente de dsB07 (controle positivo) e ssB07 (fita não hibridizada), para que possam ser analisados os graus de hibridização entre o aptâmero B07 e as sequências de DENV. A maior interação do ferroceno com as cadeias hibridizadas, fez com que os valores de correntes de pico fossem relativamente mais elevados em comparação com as sequências que não se hibridizaram, as fitas simples. De acordo com Teles (2006) as substâncias redox ligam-se com maior afinidade nessas cadeias, e desta forma, a concentração da sonda aumentará gradativamente após a ocorrência da hibridização

A resposta eletroquímica obtida é o pico de corrente formado através da concentração de material redox presente no sensor que participa da transferência eletrônica que ocorre na superfície do eletrodo de trabalho, este fato é observado nas Figuras 20 e 21, a partir da apresentação dos voltamogramas cíclicos obtidos exemplificando as diferenças observadas nos resultados das análises com e sem quitosana para todas as sequências analisadas.

Figura 20 - Voltamograma cíclico obtido a partir dos valores de correntes das sequências analisadas com DDB com filme de quitosana. (Fonte: próprio autor).

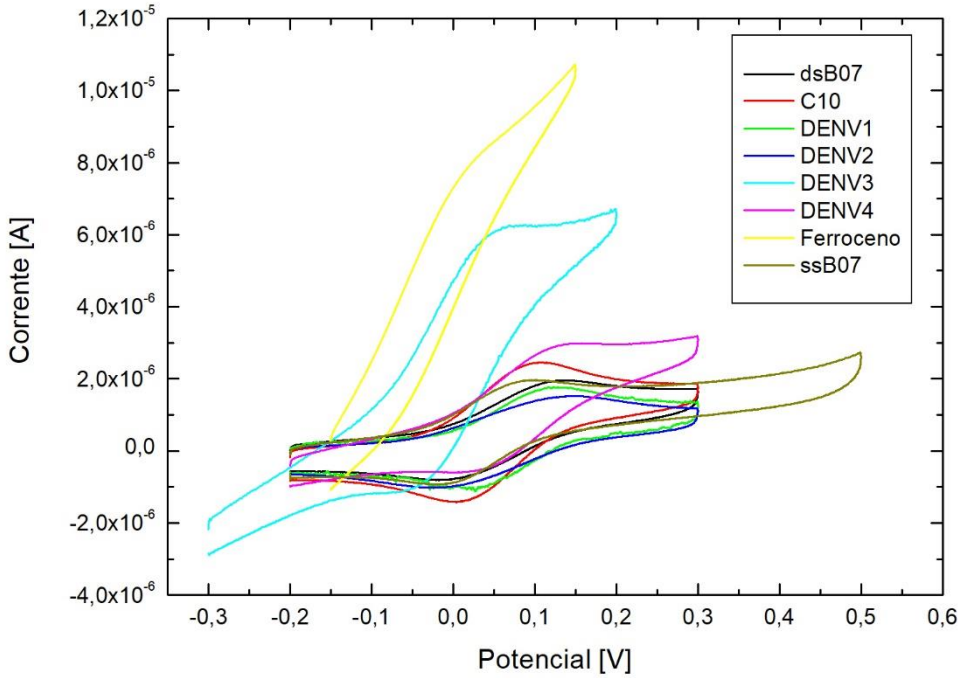


As Figuras 20 e 21 foram apresentadas no intuito de exemplificar as variações observadas nos ensaios previamente às análises para obtenção da corrente faradaica. Embora seja necessária a correção dos dados para a obtenção da corrente faradaica, é possível se observar na Figura 20 que todos os picos referentes às correntes no voltamograma foram maiores do que o valor para eletrodo nu com ferroceno, indicando a interação entre alvo e aptâmero. Além disso, os picos apresentados para C10 e ssB07 foram semelhantes, podendo corroborar com a hipótese de que a hibridização de C10 ao B07 seja um falso positivo. Ainda, os picos apresentados para os sorotipos virais foram os mais próximos ao híbrido dsB07 utilizado como controle positivo.

Para a formação do filme de quitosana ocorreu o aumento da hibridização elevando o valor de corrente final, sendo que pode ser levado em consideração a formação de *stem loop* após a hibridização, onde a sonda redox pode ser capaz de interagir, aumentando o valor de corrente. Os *Stem loops* são estruturas que apresentam hastes (*stem*) formadas pelo emparelhamento de bases complementares e no topo uma pequena alça (*loop*) que pode ser chamada também de bolha por não apresentar bases complementares capazes de se ligarem (KANNAN & ZACHARIAS, 2007).

O mesmo não ocorreu quando não se realizou a formação do filme de quitosana na superfície do sensor (Figura 21) em que a sonda redox foi capaz de potencializar o sinal da hibridização formada no eletrodo sólido, mas de maneira instável.

Figura 21 - Voltamograma cíclico obtido a partir dos valores de correntes das sequências analisadas com DDB sem filme de quitosana. (Fonte: próprio autor).



Por meio das variações nos valores de correntes a partir dos picos de oxidação/redução para ambos os casos observados em todas as análises aqui realizadas é possível afirmar que a sonda redox foi capaz de se interagir com locais livres formados a partir da hibridização. Desta forma, no estudo aqui realizado foi possível diferenciar as cadeias de ácidos nucléicos a partir dos valores de correntes, pois cada para cada uma das sequências foram apresentadas grandezas diferentes, confirmando a aplicabilidade do biossensor em detectar pequenas concentrações.

O fato de não ser capaz de descrever a estrutura molecular do aptâmero na superfície sólida, não se conhecer os pontos específicos de ligação das cadeias após imobilização e como ocorre a captura e hibridização da sonda e alvo, torna complexa a caracterização detalhada do biossensor. Por outro lado, o processo de hibridização entra as sequências infere a ocorrência de mudanças conformacionais, possibilitando a

interação da sonda redox em diferentes locais da cadeia hibridizada, o que altera e torna característico o sinal analítico gerado facilitando a leitura dos dados analisados, e tornando o biossensor mais sensível quando a distinção de cadeias simples e duplas.

Portanto, sabe-se que da mesma forma que acontece *in vivo*, os ácidos nucléicos são capazes de se hibridar fortemente na superfície do sensor pela complementariedade de bases, mas os mecanismos moleculares de hibridização em suportes sólidos são relativamente indescritíveis e de difícil previsão pela não identificação de técnicas que monitorem (CHAN et al., 1997).

De acordo com Mortimer, Kidwell e Doudna (2014) uma melhor compreensão em nível molecular pode facilitar a escolha do ambiente em que ocorre a interação entre moléculas na superfície do eletrodo, sendo importante para garantir a sensibilidade e reprodutibilidade do biossensor para que então possa ser comercializado para técnicas de análises de sequências especificas. Esta última questão levantada vale principalmente para o estudo em que o sensor não foi modificado pelo filme de quitosana. Os valores de correntes para todos os sorotipos virais são resultados que apresentam grande discrepância em comparação ao controle positivo adotado. O que não ocorre para o sensor modificado, onde é possível fazer a comparação dos dados demonstrando que quanto maior o grau de hibridização, maior será o valor de corrente.

Desta forma, afirma-se que filmes poliméricos podem favorecer o resultado dos dados obtidos. Vale destacar que várias técnicas de imobilização foram descritas para buscar métodos que não alterem ou afetem a estrutura e funcionalidade do bioelemento, aumentando a estabilidade do material imobilizado. Esses eletrodos podem ser modificados por meio de ligações covalentes ou adsorção (YANG et al., 1997). Estudos comprovam que é inapropriado que a imobilização por meio de ligação covalente possa ser realizada, pelo fato de alguns sensores apresentarem em sua superfície grupamentos que podem interferir diretamente na molécula de DNA imobilizada (SUKHORUKOV et al.,1996).

Os resultados obtidos sem a formação do filme de quitosana foram relevantes para a pesquisa por comprovar que o filme polímero na superfície do sensor tem a capacidade de colaborar para a estabilidade do material, sem um suporte no sensor a cadeia tornar-se mais instável, sendo a técnica de imobilização direta no sensor menos eficiente. As técnicas de imobilização com a formação de mono ou multicamadas utilizando método de Langmuir-Blodgett ou ainda preparar filmes com

adsorção podem ser alternativas essenciais para garantir o bom funcionamento do aptasensor (SKURIDIN et al., 1996).

As análises de estabilidade do aptasensor em função do tempo do eletrodo modificado com filme de quitosana estão apresentadas na Figura 22 e sem formação de filme de quitosana na Figura 23. Além da especificidade do aptâmero para as sequências alvo, ressalta-se que mesmo com a semelhança no processo de hibridização em solução e em suportes sólidos, o tempo em que as interações ocorreram nos dois casos foi diferente e geralmente para a imobilização a velocidade é relativamente inferior que em análises em meios líquidos. Esta ineficiência das cadeias de ácidos nucléicos em hibridar em superfícies sólidas, é justificada porque ao se imobilizar a sequência perde a atividade de alguns grupos que estão comprometidos no processo de ligação com o sensor (GAO et al., 2006).

Tanto a Figura 22 quanto a Figura 23 demonstraram o decaimento dos valores de corrente com o passar do tempo de análise. Nestes casos, a dispersão da concentração da espécie redox na superfície do sensor pode ter afetado diretamente na redução da corrente de pico gerada, pois o resultado foi dependente da transferência eletrônica na superfície do transdutor. Esta intensidade do sinal é obtida pela quantidade de sonda redox que se interage com o material biológico (SETHI, 1994).

O decréscimo do pico em ambas as situações indicou a variação da grandeza elétrica obtida dos processos redox da reação biológica e/ou bioquímica ocorrida no biossensor, e assim, detectado na superfície do eletrodo. A Figura 22 demonstrou que o comportamento dos valores de corrente para DENV1, 2, 3 e 4 permaneceram similares as fitas simples e duplas; ou seja, o comportamento das fitas alvo apresentaram perfis correspondentes ao controle positivo utilizado para caracterização do biossensor.

A Figura 23 (DDB – sem quitosana) apresenta dados que corroboram com o comportamento de dispersão da molécula eletroativa para a solução, onde demonstra o decaimento dos valores de correntes, mas este por sua vez, não apresenta valores aproximados do hibrido do B07 e, aproximam seus valores para ssB07, não favorecendo a aplicabilidade do aptasensor em estudo.

Figura 22 – Variação dos valores de correntes referentes ao pico de oxidação dependente da variação do tempo para a análise com DDB revestido com filme de quitosana. (Fonte: próprio autor).

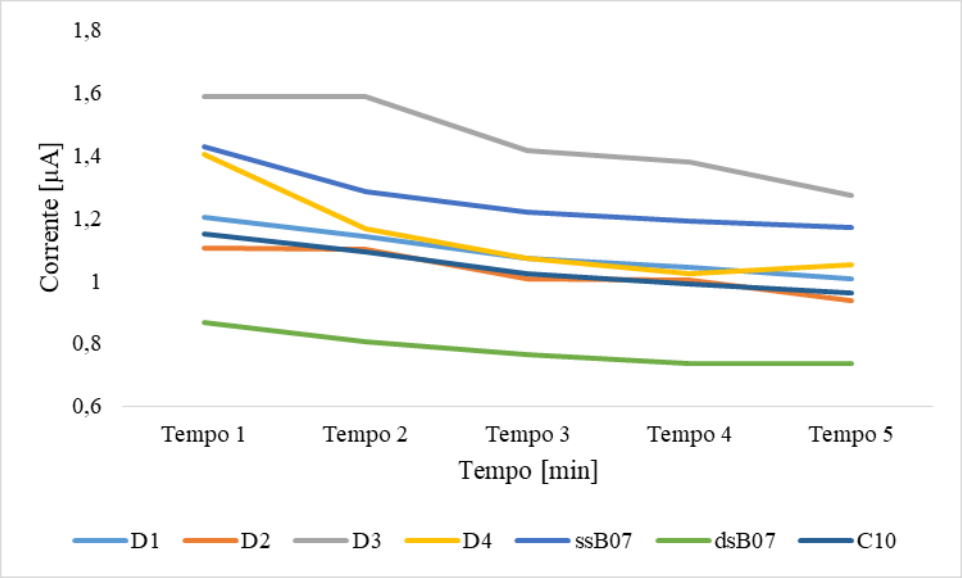
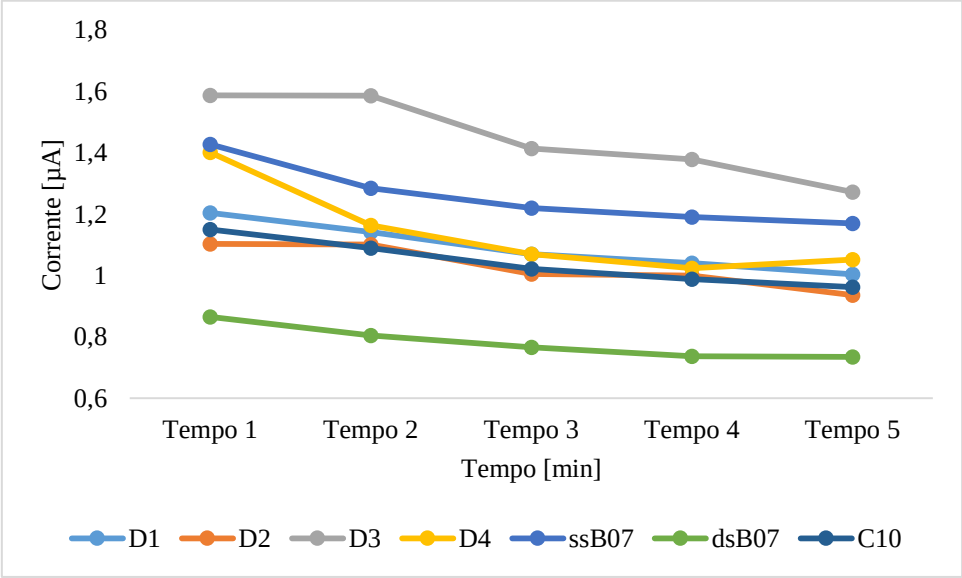


Figura 23 - Variação dos valores de correntes referentes ao pico de oxidação dependente da variação do tempo para a análise com DDB sem filme de quitosana. (Fonte: próprio autor).



Zamay e colaboradores (2016) desenvolveram um aptasensor eletroquímico para detecção de proteínas relacionadas ao câncer de pulmão, demonstrando que pode ocorrer a diminuição do tempo de vida útil da sonda quando o meio adotado para as leituras não é o mesmo no qual o aptâmero foi selecionado. No

estudo destes autores, o pico permaneceu estável em um período de 5 horas, sendo que para este caso o aptâmero já foi selecionado utilizando amostra real como o sangue total.

Portanto, nota-se que a utilização do filme de quitosana foi viável para a obtenção de dados mais significativos em se tratando do desenvolvimento do aptasensor, verificando que o pico para C10 foi o mais elevado para o sensor modificado e ssDNA (B07 – fita simples), enquanto os valores de DENV permaneceram intermediário ao ssDNA e dsDNA, como controles adotados no presente trabalho.

7– CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de análises *in silico* e de biologia molecular confirmaram a seletividade e afinidade de interação entre o aptâmero B07 e a região 5’ UTR dos sorotipos virais de dengue.

O biossensor eletroquímico desenvolvido utilizando eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), ferroceno como sonda redox, e o aptâmero B07 como elemento de bioreconhecimento foi capaz de identificar em sua superfície cadeias simples e hibridizadas de ácidos nucleicos por meio da voltametria cíclica.

O DDB quando revestido com filme de quitosana apresentou melhor capacidade de distinção entre as cadeias formadas no sensor, o que pode ser devido ao aumento da estabilidade da sonda na superfície do eletrodo.

O aptasensor desenvolvido foi capaz de diferenciar as cadeias simples do B07 daquelas hibridizadas com os sorotipos virais em estudo. O aptâmero C10 também hibridizado ao B07 pode ser devido ao fato de que foram selecionados em um mesmo momento como ligantes de DENV ou pode representar um falso positivo cujas análises sobre esta interação ainda permanecem por se esclarecer. Por outro lado, tais interações não foram apresentadas nos ensaios não conformacionais como o *dot-blot*.

As análises com variação de tempos demonstraram uma redução da concentração de material eletroativo na superfície do eletrodo, pois o valor de corrente capacitiva detectada decaiu gradativamente com o passar do tempo.

8 – PERSPECTIVAS FUTURAS

Para melhorar o desempenho do biossensor estuda-se a possibilidade de se colocar ambos os aptâmeros, B07 e C10 na superfície do eletrodo como sondas, ou alterar o material do eletrodo de trabalho aqui utilizado.

Outro ponto será otimizar o sistema físico fechado para atender melhores condições para as varreduras, podendo assim confeccioná-la com algum material de baixo custo e fácil acessibilidade, fazendo com que a célula eletroquímica possa ser utilizada com volume menor, para leituras com pequenas quantidades e em baixas concentrações.

O aptasensor pode ainda, ser testado nas leituras com amostras reais para se verificar o limite de detecção, e assim, otimizá-lo para que o mesmo possa ser miniaturizado e torná-lo acessível para as análises clínicas para detecção do vírus da dengue.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNOUS, K.; DANESH, N. M.; RAMEZANI, M.; TAGHDISI, S. M.; EMRANI, A. S.; "A novel electrochemical aptasensor based on H-shape sctructure of aptamer-complementary strands conjugate for ultrasensitive detection of cocaine". Sensors Actuators, B Chemistry.; 224: 351-355, 2016.

ALEIXO, L. M.; "Voltametria: Conceitos e Técnicas". ChemKeys, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2013.

ARRUDA, R. A. R.; "Investigação de Alterações Estruturais de Aptâmeros Ligantes à Região 5' Não Traduzida no Genoma do Vírus da Dengue Baseada em Técnicas Moleculares". Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, Catalão, 81p, 2016.

BARRETO, M. I. & TEIXEIRA, M. G. "Dengue no Brasil: situação epidemiológica e contribuições para uma agenda de pesquisa". Estudos avançados, v. 22, n. 64, 2008.

BINNING, J. K.; LEUNG, D. W.; AMARASINGHE, G. K.; "Aptamers in virology: recent advances and challenges". Front. Microbiol.. 3: 164, 2012.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim_15_jan_2009JaneiroNovembro. Disponível em: <http://www.combatadengue.com.br/img/down./pdf>. Acesso em: 24/08/2016, 2009.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: diagnóstico e manejo clínico. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Melhora na Assistência reduz casos graves e mortes por dengue, 2016. < http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs> . Boletim Virtual. Acesso: 04/10/2016.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. "Electroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações". Oxford University Press,; 5: 236-244, 416-418, 1996.

BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H . P.; GUTZ, I.; LA-SCALEA, M. A.; CRUZ, M .L.; "Voltammetric Behavior of Nitroimidazoles at a DNA-Biosensor". Electroanalysis,; 9: 1132, 1997.

CHAMBERS, J. P. et al. Biosensor Recognition Elements. Curr. Issues Mol. Biol., v.10, p.1-12, 2008.

CHAMBERS, T.J., et al.., "Flavivirus genome organization, expression, and replication". Annu Rev Microbiol,; 44: 649-688, 1990.

CHAN, V.; GRAVES, D. J.; FORTINA, P.; McKENZIE, S. E.; "Adsorption and surface diffusion of DNA oligonucleotides at liquid/solid interfaces". Langmuir, 13: 320-329, 1997.

CHATURVEDI, U. C. “The curse of dengue”. Indian J Med Res.; 124: 467 – 470, 2006

CHIU, T. C.; HUANG, C. C.; “Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors”. Sensors.; 9: 10356-1388, dez, 2009.

CHUSHAK, Y. & STONE, M.O. “In silico selection of RNA aptameros”. Nucleic Acids Res., v.37(9), 2009.

CLARK, D. P.; PAZDERNIK, N. J. “Biotechnology: Academic Cell Update Edition”. Editora: Academic Press, p. 678, 2011.

CLYDE, K.; KYLE, J; HARRIS, E. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. Journal of Virology, v.80 (23), p: 11418-11431, 2006

CNOSSEN, E. J. N.; “Seleção de aptâmeros de RNA ligantes à região 5’-UTR do genoma do vírus da Dengue”. Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão. Programa de Pós-Graduação em Química, 2014. Dissertação de Mestrado, 105 f.

CNOSSEN, E. J. N.; SILVA, A. G.; MARANGONI, K.; ARRUDA, R. A. R.; SOUZA, E. G.; SANTOS, F. A. A.; FUJIMURA, P. T.; YOKOSAWA, J.; GOULART, L. R.; NEVES, A. F.; “Characterization of oligonucleotide aptamers targeting the 5’-UTR from dengue vírus”. Future Medicinal Chemistry.; 9(6): 541-552, 2017.

DU, P.; ZHOU, B.; CAI, C. “Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode". Journal of Electroanalytical Chemistry.; 614: 149–156; 2008.

EDELMAN R. “Dengue vaccines approach the finish line”. Clinical Infectious Diseases.; 45: 56–S60, 2007.

FERNANDES, E. G. R.; “Imobilização de enzimas em plataformas (Sub)microestruturadas para aplicação em biossensores”. Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Interunidades Ciencia e Engenharia de Materiais, São Carlos, 155p, 2012.

FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER R., “Exploitation of cellular pathways by Dengue vírus”. Curr Opin Microbiol.; 14(4): 470- 475, 2011.

FRAGA, C. A. M.; “Razões da Atividade Biológica: Interações Micro e Biomacro-moléculas”. Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola.; Nº 3, Maio, 2001.

GAO, Y.; WOLF, L. K.; GEORGIADIS, R.M.; “Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison”. Nucleic Acids Research.; 34: 3310-3377, 2006.

GEBHARD, L. G.; FILOMATORI, C. V. & GAMARNICK, A. V. “Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome”. Viruses. 3: 1756, 2011.

GOLD, L.; POLISKY, B.; UHLENBECK, O.; YARUS, M.; “Diversity of oligonucleotide functions”. Annu Ver Biochemistry.; 64: 763 – 797, 1995.

GOMES FILHO, S. L. da R.; Aptassensor eletroquímico para detecção de troponina cardíaca T (cTnT) um marcador para infarto agudo do miocárdio. Recife, Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde, 2015. Tese de doutorado, 75 f.

GUBLER, D. J. “Dengue and dengue hemorrhagic fever”. Clinical Microbiology Reviews, v. 11, n. 3, p. 480-496, 1998.

GUBLER, D. J. “Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century”. Trends in Microbiology, Cambridge.; 10(2): 100 -103, 2002.

GUZMÁN, M.G & KOURI, G. “Dengue diagnosis, advances and challenges”. Int J of Infect Dis., 8: 80, 2004.

GUZMAN, Q.; ISTÚRIZ, R. E.; “Update on the global spread of dengue”. Internacional Journal of Antimicrobial Agents.; 36: 40-42, 2010.

HERMANN, T. & PATEL, D. J. “Adaptive recognition by nucleic acid aptamers”. Science.; 287: 820-825, 2000.

HU, R.; WEN, W.; WANG, Q.; XIONG, H.; ZHANG, X.; GU, H.; WANG, S.; “Novel electrochemical aptamer biosensor based on an enzyme-gold nanoparticle dual label for the ultrasensitive detection of epithelial tumour marker MUC1”. Biosensors & bioelectronics.; 53: 384–389, 2014.

JU, H.; YE, B.; GU, J.; “Supermolecular Interaction of Ferrocenium with Yeast DNA and Application in Electrochemical Sensing for Hybridization Recognition of Yeast DNA”. Sensors.; 4(5): 71-83, 2004.

KANNAN, S.; ZACHARIAS, M.; “Folding of a DNA Hairpin Loop Structure in Explicit Solvent Using Replica-Exchange Molecular Dynamics Simulations”. Biophysical Journal.; 93(9):3218-3228, 2007.

KOHLES, S. S. et al. A Multivariate Logistical Model for Identifying the Compressive Sensitivity of Single Rat Tactile Receptors as Nanobiosensors. J Nanotechnol Eng Med, v.2, n.1, fev 2011.

LARA, F. J. S. Hibridação de Ácidos Nucléicos. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2002. 127 p.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H.; GUTZ, I. G. R.; “Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise”. Química Nova.; 22: 417-424, 1999.

LAZCKA, O.; del CAMPO, F. J.; MUNOZ, F. X.; “Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors”. Biosensors and Bioelectronics.; 22 : 1205-1217, 2007.

LEVY-NISSENBAUM, E.; RADOVIC-MORENO, A. F.; WANG, A. Z.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C.; "Nanotechnology and aptamers: applications in drug delivery". Trends Biotechnology.; v. 26(8): 442 – 449, 2008.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. "Molecular biology of flaviviruses". Advances in Virus Research.; 59: 23 – 61, 2003.

LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y.; "Functional Nucleic Acid Sensors". Chem Ver.; 10: 1948-1998, 2009.

LIU, S.; YE, L.; HE, P.; FANG, Y.; "Voltammetric determination of sequence-specific DNA electroactive intercalator on graphite electrode". Analytical Chimical Acta.; 335: 239-243, 1996.

LIU, X.; FARMERIE, W.; SCHUSTER, S.; TAN, W.; "Molecular beacons for DNA biosensors with micrometer to submicrometer dimensions". Analytical Biochemistry.; 283: 56 – 63, 2000.

LOU, X. *et al.*. "Micromagnetic Selection of Aptamers in Microfluidic Channels". PNAS.; 106: 2989-2994, 2009.

LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; TURNER, A. P. F.; MASCINI, M.; "Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridization sensors". Biosensors & Bioelectronics,; 19: 515 – 530, 2004.

MAIA, D. J.; DE PAOLI, M. A.; ALVES, O. L.; "Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras". Química Nova.; 23: 204-215, 2000.

MARANGONI, K.; NEVES, A. F.; ROCHA, R. M.; FARIA, P. R.; ALVEZ, P. T.; SOUZA, A. G.; FUJIMARA, P. T.; SANTOS, F. A. A.; ARAUJO, T. G.; WARD, L. S.; GOULART.; "Prostate-specific RNA aptamer: promising nucleic acid antibody-like câncer detection". Scietific Reports.; 5: 12090, 2015.

MCBRIDE, W. J. H.; BIELEFELDT-OHMANN, H.; "Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology". Microbes and Infection.; 2: 1041−1050, 2000.

MEHROTRA, P.; "Biosensors and their applications – A review". Journal of Oral Biology and Craniofacial Research,; 6(2): 153-159, 2016.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. Analytical Sciences, v.20, p.1113-1126, ago 2004.

MELO, A. F. Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis. 2008. 104f. (Dissertação Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

MENCIN, N.; ŠMUC, T.; VRANIČAR, M.; MAVRI, J.; HREN, M.; GALEŠA, K.; KRKOČ, P.; ULRICH, H. & ŠOLAR, B. "Optimization of SELEX: Comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers". J. Pharm. Biom. Anal.; 91: 151-159, 2014.

MERSAL, G. A. M. “Electrochemical Sensor for Voltammetric Determination of Catechol Based on Screen Printed Graphite Electrode”. Internacional Journal Electrochemical Science.; 4: 1167–1177, 2009.

MIYAZAKI, Y.; FUJITA, M.; NOMAGUCHI, M.; ADACHI, A.; “Structural Biology for Virus Research”. Front Microbiolol.; 3: 91, 2012.

MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, C. S.; “Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion”. Nature.; 427(6972): 313-319, 2004.

MONTANARO, D.; PETRUCCI, E.; “Electrochemical treatment of Remazol Brilliant Blue on a boron-doped diamond electrode”. Chemical Engineering Journal.; 153: 138-144, 2009.

MORTIMER, S. A.; KIDWELL, M. A.; DOUDNA, J. A.; “Insights into RNA structure and function from genome-wide studies”. Genetics;15:469–479, 2014.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. “Microbiologia Médica”. 7ªd. Editora: Elsevier Brasil, 888p, 2014.

MUSSINI, P. R.; “Analytical Electrochemistry”. Electrochemical Acta.; 53: 3446-3448, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; “Lehninger – princípios de bioquímica. 3ª ed. São Paulo, SP. Editora: Sarvier, 193p, 2002.

OLIVEIRA, N. SOUZA, E.; FERREIRA D.; ZANFORLIN. D.; BEZERRA. W.; BORBA, M. A.; ARRUDA, M.; LOPES, K.; NASCIMENTO, G.; MARTINS, D.; CORDEIRO, M.; LIMA-FILHO, J.; A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences. Sensor, 15, 15562-15577, 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. “Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Geneva, New Edition, 2009.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q.; “Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos”. Revista Virtual de Quimica.; 5(4), 2013.

PALECEK, E. In: Topics in Bioelectrochemitry and Bioenergitcs, Milazzo, G.; Ed.; Wiley, New York, 5: 65, 1983.

PASTERNAK, J. J.; “Genética molecular humana”. Editora: Editora Manole. 497 p., 2002.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T.; “Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas”. Química Nova.; 25: 1012-1021, 2002.

PINTO, A.; POLO, P. N.; RUBIO, M. J.; SVOBODOVA, M.; LERGA, T. M.; O'SULLIVAN, C. K.; "Apta-PCR". Methods in molecular biology.; 1380: 171-177, 2016.

PIVIDORI, M. I.; MERKOÇI, A.; ALEGRET, S.; "Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods". Biosensors & Bioelectronics.; 15: 291 – 303, 2000.

POLACEK, C.; FOLEY, J.E. & HARRIS, E. "Conformational Changes in the Solution Structure of the Dengue Virus 5' End in the Presence and Absence of the 3' Untranslated Region". Journal of Virology, 83: 1166, 2009.

REUTER, J. S.; MATHEWS, D. H.; RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. BMC Bioinformatics 11, 129, 2010.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; WILSCHUT, J. & SMIT, J.M. "Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity". Cellular and Molecular Lifre Sciences.; 67: 2786, 2010.

ROMANO, C. M.; MATOS, A. M.; ARAUJO, E. S.; VILLAS-BOAS, L. S.; SILVA, W. C.; OLIVEIRA, O. M.; CARVALHO, K. I.; SOUZA, A. C.; RODRIGUES, C. L.; LEVI, J. E.; KALLAS, E. G.; PANNUTI, C. S.; "Characterization of Dengue virus type 2: new insigths on the 2010 Brazilian epidemic". PloS One.; 5(7): 11811, 2010.

ROSATTO, S. S. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e silica modificada, Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química – UNICAMP, 2000. Tese de doutorado, 115 f.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

SANTOS, C. da C.; "Desenvolvimento de plataformas eletroquimicas funcionalizadas com ácido poli(4-aminobenzóico) aplicadas em biossensores". Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Dissertação de Mestrado, Diamantina, 107p, 2014.

SANTOS, C. M. L. dos. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico de DNA para detecção do Papilomavírus humano, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UFPE, 2008. Dissertação de Mestrado, 64 f.

SETHI, R. S.; "Transducer aspects of biosensors". Biosensors and Bioelectronics", 9: 243 – 264, 1994.

SI, Y.; LEE, M. Y.; "Zika vírus: Na emerging Flavivirus". Journal Microbiology.; 55(3): 204-219, 2017.

SILVA, J. J. B.; "Desenvolvimento de biossensores eletroquímico e piezelétrico de DNA para diagnósticos clínicos", Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Universidade Federal do Pernambuco, 2004. Tese de Doutorado, 114 p.

SILVA, L. M. da C.; “Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e ureia como foco na aplicação ambiental”. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001. Escola de Química, Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 54 f.

SKURIDIN, S. G.; YEVDOKIMOV, Y. U.; EFIMOV, V. S.; HALL, J. M.; TURNER, A. P. F.; “A new approach for creating double-strand DNA biosensors”. Biosensors and Bioelectronics.; 11: 903, 1996.

STEMPOKOWSKA, I.; LIGAJ, M.; JASNOWSKA, J.; LANGER, J.; FILIPIAK, M.; “Electrochemical coding technology for simultaneous detection of multiple DNA targets”. Journal Am. Chemistry Society.; 125: 3214-3215, 2003.

STIASNY, K; HEINZ, F.X. Flavivirus membrane fusion. Journal of General Virology, v. 87, p. 2755-2766, 2006.

STOLTENBURG, R.; REINEMANN, C.; STREHLITZ, B.; “SELEX – A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands”. Biomolecular Engineering.; 24: 381 – 402, 2007.

SUKHORUKOV, B. L.; MONTREL, M. M.; PETROV, A. L.; SHABARCHINA, L. I.; SUKHORUKOV, G. B.; “Multilayer filmes containing imobilizes nucleic acids. Their structure and possilities in biossensor applications”. Biosensors & Bioelectronics.; 11: 913 – 922, 1996.

TELES, F. S. R. R. “Desenvolvimento de um biossensor para detecção e identificação do vírus da dengue em fluidos biológicos”. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 2006. Tese de Doutorado, 106 f.

TELES, F. S. R. R.; PRAZERES, D. M. F.; LIMA-FILHO, J. L.; “Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator”. *Sensors*,; *7*, 2510-2518, 2007.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Biosensors & Bioelectronics, v.16, p.121-131, 2001.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. “Eletroquímica – Princípios e Aplicações”. 2. ed. São Paulo: Editora Da Universidade de São Paulo, 220 p, 2005.

TOTHILL, I. E.; “Biosensors for câncer markers diagnosis”. Semiars in cell & developmental biology. 20(1): 55-62, 2009.

TUERL, C.; GOLD, L. “Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase”. Science.; 249: 505 – 510, 1990.

WANG, E. L. S.; GOODING, J. J.; “Charge transfer through DNA: a selective electrochemical DNA biossensor”. Analytical Chemistry.; 78: 2138 – 2144, 2006.

WANG, E.; NI, H.; XU, R.; BARRETT, A. D.; WATOWICH, S. J.; GUBLER, D. J.; WEAVER, S. C.; “Evolutionary relationship of endemic/epidemic and sylvatic dengue viroses”. Jounal of Virology.; 74: 3227 – 3234, 2000.

WANG, J.; “DNA biosensors based o Peptide Nucleic Acid (PNA) recognition layers. A review”. Biosensors and Bioelectronics.; 13: 757 – 762, 1998.

WANG, R.; ZHAO, J.; JIANG, T.; KWON, Y. M.; LU, H.; JIAO, P.; LIAO, M. & LI, Y. “Selection and characterization of DNA aptamers for use in detection of avian influenza virus H5N1”. Journal of Virological Methods.; 189(2): 362-369, 2013.

WANG, Y.; YE, Z. & YING Y. “Detection of immunoglobulin E using an aptamer based dot-blot assay”. Chinese Science Bulletin.; 58(24): 2938-2943, 2013.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R.; “Prospects for a dengue vírus vaccine”. Nature Reviews.; 5: 518-528, 2007.

YANG, M.; McGOVERN, M. E.; THOMPSON, M.; “Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry”. Analytical Chemistry Acta.; 346: 259-275, 1997.

YANG, X.; QIAN, J.; JIANG, L.; YUTING, Y.; WANG, K.; LIU, Q.; WANG, K.; “Ultrasensitive electrochemical aptasensor for ochratoxin A based on two-level cascaded signal amplification strategy”. Bioelectrochemistry.; 96: 7–13, 2014.

YOON, J. Y.; “Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors”. Springer, 2012.

ZAMAY, G. S.; ZAMAY, T. N.; KOLOVSKII, V. A.; SHABANOV, A. V.; GLAZYRIN, Y. E.; VEPRINTSEV, D. V.; ZAMAY, A. S.; “Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples”. Scientific Reports,; 6: 34350, 2016.

ZHANG, W.; ASIRI, A. M.; LIU, D.; DU, D.; LIN, Y. “Nanomaterial based biosensors for environmetal and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents”. Trends in Analytical Chemistry.; 54: 1-10, 2014.

ZHOU, J.; BATTING, M. R.; WANG, Y.; “Aptamer-based molecular recognition for biosensor development”. Analytical and Bioanalytical Chemistry.; 398: 2480, 2010.

ZHU, J.; LI, T.; HU, J. & WANG, E. “A novel dot-blot DNAzyme-linked aptamer assay for protein detection”. Analytical and Bioanalytical Chemistry.; 397(7): 2923-2927, 2010.