



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Tese de Doutorado

**Utilização de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ como
nanoplataforma para o desenvolvimento de genoensaios
eletroquímicos para detecção de milho**

Juliana Beatriz Sousa

Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior
Orientador

Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima de Sá Barroso
Coorientadora

**Teresina - PI
2018**

Juliana Beatriz Sousa

**Utilização de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄@Au como
nanoplataforma para o desenvolvimento de genoensaios
eletroquímicos para detecção de milho**

Tese de Doutorado apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia – Área de Concentração: Biotecnologia em Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima de Sá Barroso

Teresina - PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S725u Sousa, Juliana Beatriz.
 Utilização de nanopartículas magnéticas de
 Fe₃O₄@Au como nanoplataforma para o desenvolvimento
 de genoensaios eletroquímicos para detecção de milho /
 Juliana Beatriz Sousa. – 2018.
 116 f. : il. color.

 Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí,
 Rede Nordeste de Biotecnologia, Programa de Pós-
 Graduação em Biotecnologia, Teresina, 2018.
 “Orientador: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior”.
 “Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima de Sá
 Barroso”.

 1. Nanopartículas Fe₃O₄@Au. 2. Genossensores
 Eletroquímicos. 3. Gene HMGA. 4. Milho. I. Título.

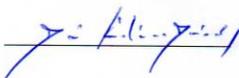
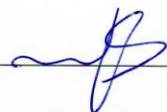
CDD 660.6

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: JULIANA BEATRIZ SOUSA

TÍTULO DO PROJETO: “Utilização de nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄@Au como nanoplataforma para o desenvolvimento de genoensaios eletroquímicos para detecção de milho.”

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Presidente)	<u>SATISFATORIO</u>	
Profa. Dra. Maria de Fátima de Sá Barroso - UNIPORTO (Coorientadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. José Arimateia Dantas Lopes - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Cícero Alves Lopes Júnior - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Samya Danielle Lima de Freitas – UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Suely Moura Melo - FACID (Examinadora)	<u>SATISFATORIO</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 20 de dezembro de 2018.

HORÁRIO: 08h

LOCAL: Auditório do Departamento de Química - UFPI

*Dedico este trabalho a Meus pais, Francisco das Chagas e
Irenilde, a meu Marido Raphael Diego, minha filha Clarisse e
minhas irmãs Fernanda e Renata que por amor me apóiam e me
dão incentivo na realização de sonhos*

AGRADECIMENTOS

- A Deus, meu refúgio, fortaleza e abrigo;
- Ao Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior pela orientação, pelos ensinamentos, desde a graduação, por contribuir para o meu crescimento profissional, por acreditar em meu potencial e me oferecer oportunidades para uma formação de alto nível;
- À Dra. Maria de Fátima Barroso, pela orientação do meu doutorado sandwich em Porto, pela paciência, amizade, cuidado e abrigo e por crer em meu potencial para a realização deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Joilson Ramos-Jesus pelo apoio, auxílio, incentivo e por ser um amigo mais que irmão;
- À Prof.^a Dr.^a. Cristina Delerue-Matos pelo incentivo à pesquisa através do projeto GMOSensor;
- À Dra. María Jesús Lobo Castañón pelo apoio e pelos ensinamentos no desenvolvimento deste projeto;
- À Dra. Clara Pereira pelos ensinamentos passados com respeito à síntese e recobrimento da nanopartículas magnéticas com Au;
- À Prof.^a Dr.^a. Rosana Fonseca pelo apoio e amizade;
- A coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO pela ajuda sempre que solicitados;
- Aos amigos: Paula Paiga, Emmanuel Odela, Thalyta, Suely e Jardes pelo carinho, companheirismo, auxílio e parceria;
- Agradeço o financiamento deste trabalho pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) / MEC e FEDER no âmbito do Programa PT2020 UID / QUI / 50006 / 2013–14 POCI / 01/0145 / FEDER / 007265) e pelas Ações Marie Curie FP7-PESSOAS -2013- IRSES através do projeto no. 612545 intitulado “GMO sensor - Monitoring genetically modified organisms in food and feed by innovative biosensor approaches”, cadastrado junto à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Piauí sob o número CCN 001/2014;
- Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

*“Ser químico é pesquisar, é dedicar-se, é buscar
novas tecnologias, é ter o desafio de aprimorar o que
já é sabido e procurar inovar, ...”
(Luciana Magalhães)*

LISTA DE ABREVIATURAS

- anti-FITC-peroxidase – anticorpo da fluoresceína conjugado à peroxidase
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- CE - Comunidade Européia
- CP- Capture Probe – Sonda de Captura
- cry1AB - o gene truncado oriundo da bactéria *B. thuringiensis* (Bt)
- DNA - ácido desoxirribonucléico
- DC *Sputtering* - *Sputtering* por corrente direta
- EDC – 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida]
- EU – União Européia
- EUA – Estados Unidos da América
- Fe₃O₄ – Nanopartículas magnéticas de ferro (magnetita)
- Fe₃O₄@Au – Nanopartículas magnéticas de ferro recobertas com ouro
- Fe₃O₄@Au-SAM – Nanopartículas Fe₃O₄@Au funcionalizadas com SAM
- FITC - iso-tiocianato de fluoresceína
- GM –Geneticamente Modificado
- GMO - do inglês “Genetically Modified Organisms”
- HAuCl₄ - ácido cloroáurico
- HMG – (do inglês High Mobility Group) Proteínas do grupo de alta mobilidade
- HMGA - Proteínas do grupo de alta mobilidade, família A
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
- LOD – Limite de detecção
- LOQ – Limite de quantificação
- MCH – 6 mercaptohexan-1-ol
- MCHAc – ácido 6-mercaptohexanóico
- MON810 – Evento de milho geneticamente modificado da Monsanto resistente a insetos da ordem lepidóptera
- NHS – N-hidroxissuccinimida
- NP – Nanopartículas
- NPM – Nanopartículas magnéticas
- MNP – (do inglês Magnetic nanoparticles)
- NMP - N-metilpirrolidona

- nt - Nucleotídeos
- OGM – Organismo Geneticamente Modificado
- pb – Pares de base
- PCR – (do inglês Polymerase Chain Reaction) Reação em Cadeia da Polimerase
- POD – Peroxidase
- RSD – Desvio padrão relativo
- R^2 - coeficiente de determinação da regressão
- SAM – (do inglês “self-assembled monolayer) Monocamadas Auto Montadas
- ssDNA - Fita simples de DNA
- dsDNA - Fita dupla de DNA
- SP - Signalling Probe – Sonda Sinalizadora
- T – Target – Sonda Alvo
- TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão
- TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
- UV – Ultravioleta
- Vis – Visível
- λ – comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Sequência de oligonucleotídeos: sonda alvo, sonda de captura, sonda sinalizadora e iniciadores.....	51
TABELA 2 -	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores	62
TABELA 3 -	Otimização do Genoensaio com e sem BSA, realizado utilizando SAM: MCH e MCHAc (6:1).....	77
TABELA 4 -	Razão MCH:MCHAc e massa de Fe ₃ O ₄ @Au.....	79
TABELA 5 -	Valores correspondentes às intensidades de corrente para os ensaios 1 e 2, intensidade média de corrente dos dois ensaios e do respectivo desvio padrão para cada concentração de DNA alvo variando de 0,0 a 10,0 nM.....	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	(A) Esquema representativo de um cassete usado na transformação do evento milho MON810. (B) Esquema representativo do inserto no evento MON810. P35S: Região promotora 35S CaMV do vírus do mosaico da couve-flor, hsp70: íntron de proteína de choque térmico proveniente do gene hsp70 de milho usada para aumentar a expressão do transgene, cryAb: gene que codifica a proteína Cry1Ab de <i>B. thuringiensis</i> e confere resistência ao ataque da broca européia do milho, NOS: terminador de nopalina sintase.....	23
FIGURA 2 -	Esquema representativo de um genossensor. A hibridização entre sonda e alvo ocorre na camada de reconhecimento do transdutor.....	29
FIGURA 3 -	Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódicas (Ipc) e anódica (Ipa).....	33
FIGURA 4 -	Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eletrodos: eletrodo de trabalho (A); eletrodo de referência (B); eletrodo auxiliar (C).....	34
FIGURA 5 -	Esquema de emparelhamento entre os alcanotióis (ex: ácido 6-mercaptohexanóico) e o retículo do ouro numa camada auto-organizada.....	37
FIGURA 6 -	Mecanismo de ativação dos grupamentos carboxílicos por meio da reação com EDC/NHS, onde (1) simboliza a superfície funcionalizada e (2) simboliza a biomolécula.....	41
FIGURA 7 -	Adição do ácido oleico e oleilamina à solução de hexadecan-1-ol $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ em 35 mL de NMP. (A) solução incolor.....	54
FIGURA 8 -	Reação com a solução $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ a $200 \text{ }^\circ\text{C}$. (B) solução acastanhada.....	55

FIGURA 9 -	Posição do ímã na lateral do béquer de 50 mL, segunda lavagem.....	56
FIGURA 10 -	Sistema fechado em atmosfera inerte contendo o ferrofluido (Fe_3O_4) em tolueno. (C) sistema fechado com tampa de vidro rosqueada.....	57
FIGURA 11 -	Adição da solução contendo o $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, a oleilamina e o tolueno anidro.....	58
FIGURA 12 -	Procedimento manual de montagem do eletrodo base.....	60
FIGURA 13 -	Voltamograma Cíclico do eletrodo de ouro policristalino em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ no intervalo de potencial de 0,2 até 1,6 V vs. Ag/AgCl e velocidade de varredura 100 mV.s^{-1}	61
FIGURA 14 -	Esquema das etapas do procedimento do genoensaio para detecção do DNA alvo do HMGA do milho.....	64
FIGURA 15 -	Voltamograma do TMB sobre a fase sensora.....	67
FIGURA 16 -	Esquema de disposição dos 3 eletrodos usados para a obtenção das medidas cronoamperométricas.....	68
FIGURA 17 -	Estrutura mais estável da sonda alvo com 79 pb a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $[\text{Na}^+] = 0,298 \text{ mol.L}^{-1}$ obtida à partir do servidor MFold.....	70
FIGURA 18 -	Estruturas complementares: Sonda de captura e indicadora a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $0,298 \text{ mol.L}^{-1}$ de $[\text{Na}^+]$ utilizando o servidor MFold Web.....	71
FIGURA 19 -	Imagens de TEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (1:7) no tamanho de cerca de 10 nm de diâmetro.....	73
FIGURA 20 -	Espectros de UV-Vis das nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (1:4) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (1:7), dispersas em tolueno, com concentrações arbitrárias.....	74
FIGURA 21 -	Representação gráfica da intensidade de corrente média nos últimos 10 s de varredura subtraída do branco em função da concentração de DNA alvo do HMGA na concentração $2,0 \text{ nmol.L}^{-1}$, obtidos em triplicata.....	78

FIGURA 22 -	Representação gráfica da intensidade de corrente média nos últimos 10 s de varredura subtraída do branco em função da concentração de DNA alvo do HMGA na concentração 5,0 nmol.L ⁻¹ obtidos com e sem a lavagem com Tween® 20.....	81
FIGURA 23 -	Cronoamperogramas dos ensaios referentes à amostra de DNA alvo com concentrações crescentes: 0,0 nmol.L ⁻¹ , 0,5 nmol.L ⁻¹ , 1,0 nmol.L ⁻¹ , 2,0 nmol.L ⁻¹ e 5,0 nmol.L ⁻¹	83
FIGURA 24 -	Cronoamperograma para a concentração de 2,0 nmol.L ⁻¹ de DNA alvo em duplicata.....	84
FIGURA 25 -	Representação gráfica da intensidade de corrente média (i) nos últimos 10 s de varredura em função da concentração de DNA alvo do HMGA na faixa de concentração de DNA alvo variando de 0,0 a 10,0 nmol.L ⁻¹	85
FIGURA 26 -	Representação gráfica da intensidade de corrente média (i) nos últimos 10 s de varredura em função da concentração de DNA alvo do HMGA na faixa de concentração de DNA alvo variando de 0,0 a 5,0 nmol.L ⁻¹	86
FIGURA 27 -	Sinal de corrente de uma amostra real diluída a 1:10 de DNA do milho amplificado a partir do material certificado do evento MON810 10% (p/p), com primers específicos para o evento transgênico comparado ao sinal obtido com uma sonda sintética (ssDNA) na concentração 2,0 nmol.L ⁻¹	88

RESUMO

Utilização de nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ como nanoestrutura para o desenvolvimento de genosaios eletroquímicos para detecção de milho

O presente trabalho aborda um avanço tecnológico aplicado ao desenvolvimento de genosaios eletroquímicos através da imobilização de sondas de DNA em nanoestruturas constituídas por nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ núcleo@revestimento. Estas nanoestruturas foram utilizadas na construção de dispositivos analíticos, para a detecção e quantificação do gene endógeno de alta mobilidade HMGA específico do milho a ser utilizado na quantificação relativa do evento de milho Geneticamente Modificado MON810. Um eletrodo de ouro obtido por *sputtering* sobre um filme de poliéster foi utilizado como eletrodo de trabalho para deposição das NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ e para a transdução eletroquímica, usando-se a enzima peroxidase como marcador e amplificador do sinal eletroquímico obtido na reação de hibridização de cadeias complementares do DNA correspondente ao HMGA. Os compostos tiolados ácido 6-mercaptopentanoico e 6-mercaptopentano-1-ol foram usados para funcionalizar as nanopartículas através da formação de bicamadas automontadas. As nanopartículas apresentaram-se esféricas e uniformes com $\cong 10$ nm de diâmetro com elevada eficiência de separação, o que associado à sua biocompatibilidade permitiu uma imobilização do DNA bem orientada. O genosensado foi construído usando-se um formato de hibridização em sanduíche de modo a aumentar a seletividade do ensaio eletroquímico em condições otimizadas: (1) 6 mercaptopentano-1-ol ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) e ácido 6-mercaptopentanoico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) na proporção de 6:1; (2) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ de $0,06 \text{ mg/ensaio}$; (3) hibridização homogênea a 98°C , por 30 min; (4) hibridização heterogênea em 1 hora. Nestas condições, obtiveram-se curvas de calibração com intervalo linear entre $0,0$ e $5,0 \text{ nmol.L}^{-1}$ de DNA com coeficiente de correlação de $0,9995$, LOD de $0,094 \text{ nmol.L}^{-1}$ e LOQ de $0,313 \text{ nmol.L}^{-1}$. A precisão do genosensado variou entre $0,9$ a $1,2 \%$. O método levou ao aumento de sensibilidade e não necessitou de prévia purificação e foi testado em amostras comerciais de milho. Os resultados experimentais mostraram que esta proposta apresenta-se como inovadora e acessível, com potencial para ser aplicada em análises quantitativas para a verificação da conformidade dos regulamentos de culturas GM.

Palavras chave: nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$, genossensores eletroquímicos, gene HMGA, milho

ABSTRACT

Use of Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles as nanoplatform for the development of electrochemical genoassay for the detection of maize

The present work addresses a technological advance applied to the development of electrochemical genoassays through the immobilization of DNA probes in nanoplatforms composed of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄@Au core@shell. This nanoplatform was used in the construction of analytical devices for the detection and quantification of the endogenous high mobility HMGA specific gene to be used in the relative quantification of the genetically modified maize event MON810. A gold electrode obtained by Sputtering on a polyester film was used as a working electrode for the deposition of Fe₃O₄@Au MNP and for the electrochemical transduction, using the peroxidase enzyme as marker and amplifier of the electrochemical signal obtained in the hybridization reaction of complementary strands of the DNA corresponding to HMGA. The thiolated compounds 6-mercaptohexanoic acid and 6-mercaptohexan-1-ol were used to functionalize the nanoparticles by forming self-assembled bilayers. The nanoparticles were spherical and uniform with \cong 10 nm in diameter with high separation efficiency, which combined with their biocompatibility allowed a well-oriented DNA immobilization. The genoassay was constructed using a sandwich hybridization format to increase the selectivity of the electrochemical assay under optimized conditions: (1) 6-mercaptohexan-1-ol (0.1 mol.L⁻¹) and 6-mercaptohexanoic acid (0.1 mol.L⁻¹) in the ratio of 6:1; (2) Fe₃O₄@Au of 0.06 mg/assay; (3) homogeneous hybridization at 98 °C for 30 min; (4) heterogeneous hybridization in 1 hour. Under these conditions calibration curves were obtained with linear interval between 0.0 and 5.0 nmol.L⁻¹ DNA with correlation coefficient of 0.9999, LOD of 0.094 nmol.L⁻¹ and LOQ of 0.313 nmol.L⁻¹. The accuracy of the genoassay ranged from 0.9 to 1.2%. The method led to increased sensitivity and did not require prior purification and was tested in commercial maize samples. The experimental results showed that this proposal is presented as innovative and accessible, with the potential to be applied in quantitative analyzes to check the conformity of genetically modified crop regulations.

Keywords: Fe₃O₄@Au nanoparticles, electrochemical genosensors, HMGA gene, maize

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	17
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 – Organismos Geneticamente Modificados	22
2.2 – Processo de legalização de OGMs	24
2.3 – Métodos analíticos para a detecção e quantificação de OGM	26
2.4 – Genossensores	27
2.5 – Técnicas Amperométricas	30
2.6 – Imobilização do material biológico	35
2.6.1 – Monocamadas auto-organizadas (SAMs)	36
2.6.1.1 – Ativação da superfície da SAM	40
2.7 – Biomoléculas associadas com nanopartículas de ouro	42
2.8 – Nanopartículas magnéticas core@shell de Fe ₃ O ₄ recobertas com Au	44
2.9 – Escolha e pré-tratamento do eletrodo base	46
3 – OBJETIVOS	49
3.1 – Objetivo geral	49
3.2 – Objetivos específicos	49
4 – PARTE EXPERIMENTAL	49
4.1 – Reagentes e Soluções	50
4.2 – Instrumentação	51
4.3 – Metodologia	53
4.3.1 – Síntese de Nanopartículas core@shell (Fe ₃ O ₄ @Au)	53
4.3.1.1 – Procedimento da Síntese de Nanopartículas de magnetita (Fe ₃ O ₄) ...	53
4.3.1.2 – Revestimento das nanopartículas de magnetita (Fe ₃ O ₄) com Au (1:7 ou 1:4)	56
4.3.2 – Preparo do substrato de Au e montagem do eletrodo	59
4.3.3 – Condicionamento dos eletrodos	60
4.3.4 – Funcionalização das nanopartículas Fe ₃ O ₄ @Au com SAM	61
4.3.5 - Extração de DNA de milho e amplificação por PCR	62
4.3.6 - Procedimento do genoensaio em formato <i>sanduíche</i>	63
4.3.6.1 – Monitoramento da reação de hibridização por cronoamperometria	66
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	69

5.1 – Seleção de sondas de DNA para o genoensaio em formato <i>sanduiche</i>	69
5.2 – Caracterização das NPM ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$).....	71
5.3 – Determinação da área eletroativa do substrato de Au no eletrodo de trabalho.....	74
5.4 – Otimização das condições experimentais do genoensaio	75
5.4.1 – Uso da SAM: MCH e MCHAc e influência do BSA como agente de bloqueio..	75
5.4.2 – Eficiência da hibridização do DNA relacionada com a temperatura.....	77
5.4.3 – Concentração de nanopartículas por eletrodo	79
5.4.4 – Lavagem do nanomaterial	80
5.5 – Montagem do genoensaio	82
5.6 – Aplicação do genoensaio para detecção de produtos específicos de PCR do HMGA do milho.....	87
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXO (DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE PATENTE)	103
APÊNDICE A (RESUMO DA PATENTE)	105
APÊNDICE B (REIVINDICAÇÕES DA PATENTE)	107
APÊNDICE C (CAPÍTULO DE LIVRO)	110
APÊNDICE D (ARTIGO SUBMETIDO)	112

1- INTRODUÇÃO

As culturas geneticamente modificadas (GM) tiveram um aumento global de área cultivada de 1,7 milhões de hectares em 1996 para 185,1 milhões de hectares em 2016. Um aumento de \cong 110 vezes em apenas 20 anos que torna a Biotecnologia a tecnologia de culturas mais rapidamente adotada nos últimos tempos (JAMES, 2016). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de alimentos GM, com 49,1 milhões de hectares de área plantada, sendo que os Estados Unidos da América, EUA, mantêm a liderança da produção com 72,9 milhões de hectares (JAMES, 2016). De 1994 até 2016, um total de 40 países, incluindo a União Européia (EU-28), concederam aprovações regulatórias a culturas GM para uso como alimento e/ou ração bem como para liberação ambiental. Destes países, 3.768 aprovações foram emitidas pelas autoridades reguladoras para 26 cultivos e 392 eventos GM (JAMES, 2016).

O milho é a segunda cultura mais cultivada no mundo e com o maior número de eventos GM aprovados para alimentos e rações (218 em 29 países) (JAMES, 2016). O evento MON810 do milho (nome comercial "YieldGard®"), com tecnologia de fabricação desenvolvida pela Monsanto Company, é o terceiro maior em número de aprovações com 52 aprovações em 26 países incluindo a UE-28 (JAMES, 2016). Este evento contém o gene cry1Ab que foi inserido no genoma da planta de modo a conferir resistência ao ataque da broca européia do milho (*Ostrinia nubilalis*). A broca do milho produz uma variação da proteína Cry1Ab, derivada do *Bacillus thuringiensis* expressa no milho MON810 (CARNEIRO, 2009). No Brasil este evento é autorizado para comercialização desde 2007 (JAMES, 2015).

Apesar das vantagens oferecidas pelos Organismos Geneticamente Modificados (OGM), tais como: resistência a insetos; tolerância a herbicidas, à seca e a solos ácidos; aumento na produtividade, aumento na qualidade nutricional dos alimentos, dentre outras vantagens, a sua utilização não é aceita em todo o mundo, pois os consumidores estão preocupados com a sua segurança devido ao desconhecimento dos processos de produção de OGMs. As principais questões que preocupam os consumidores dizem respeito ao potencial fluxo genético dos genes inseridos para outros organismos e potenciais alergenicidades bem como o desconhecimento dos reais impactos da utilização de OGMs no meio ambiente, na

saúde, política, economia e bioética de cada país. (ALBRECHT e MISSIO, 2013; ALVES, 2004; BARROSO et al., 2015; LUCHT e THOMAS, 2015). Por consequência, foram criadas em vários países, agências governamentais de modo a controlar o uso desta tecnologia e regulamentar a segurança dos alimentos OGM e seus derivados estabelecendo regras de rotulagem (MARMIROLI et al., 2008; COTA, 2015).

A necessidade de monitoramento e a verificação da presença e quantidade de OGM em culturas agrícolas e em produtos alimentares, têm gerado o interesse de vários pesquisadores na busca de métodos analíticos de detecção de OGM cada vez mais precisos, sensíveis, rápidos e de baixo custo na detecção destes produtos. Métodos baseados em proteínas e em DNA foram desenvolvidos com o objetivo de garantir a implementação dos regulamentos criados em cada país e a verificação do cumprimento da legislação por parte dos órgãos governamentais (BARROSO et al., 2015).

O DNA possui as vantagens de ser estável, abundante e de fácil amplificação. A detecção de sequências específicas de DNA, especialmente usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), ainda é a estratégia mais eficaz para a detecção de OGM. PCR em tempo real é o padrão ouro para análise quantitativa de OGM, contudo é uma técnica laboriosa, dispendiosa e consome muito tempo, mas vários outros métodos também foram desenvolvidos para a detecção e quantificação de GM (BONFINI et al., 2001; MARMIROLI et al., 2008; DONG, W. et al., 2008). Dentre estas técnicas, os biossensores e especialmente os biossensores eletroquímicos aparecem como uma ferramenta bioanalítica que utiliza dispositivos simples, portáteis, de baixo custo e, na maioria dos casos, descartáveis, para detecção confiável, precisa e específica do evento necessária para a triagem e identificação de culturas GM autorizadas em cada país (ARUGULA et al., 2014; BARROSO et al., 2015; LUCHT e THOMAS, 2015; LIN e PAN, 2016).

A maioria dos biossensores de DNA, também chamados Genossensores, são desenvolvidos com base na medida do sinal eletroquímico produzido pela interação bioquímica entre uma sonda oligonucleotídica, feita a partir de uma fita simples de DNA (ssDNA) ou sonda de captura, imobilizada na superfície de um eletrodo marcada com um indicador eletroquímico que reconhece sua sequência-alvo complementar (WANG J., 2000; AHAMMAD, et al. 2009). Os biossensores

amperométricos têm sido preferidos devido à fácil manipulação e ao fato da concentração do analito ser proporcional à alteração na corrente elétrica (THEVENOT et al., 2001; FURTADO et al., 2008; MONOŠÍK et al., 2012).

Dentre os nanomateriais, com características singulares, que podem ser utilizados como nanoplataformas para detecção biomolecular e proporcionar maior sensibilidade e receptividade a miniaturização estão as nanopartículas (NP) core@shell, que consistem em partículas concêntricas, nas quais, partículas de um material são revestidas com uma camada de outro material (BARROSO et al., 2015). Nas NP core@shell do tipo $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$, o núcleo de Fe_3O_4 proporciona funcionalidades magnéticas, estabilidade em meio biológico corrosivo e podem ser facilmente modificadas enquanto a camada externa de NP de ouro (Au) possui propriedades eletrocatalíticas e óticas, além de ser um componente de atividade plasmônica, oferecendo proteção ao núcleo por ser quimicamente inerte, comparado ao óxido de ferro (SUÁREZ BALLESTEROS, 2012). Além disso, a superfície de ouro pode ser facilmente modificada por moléculas terminais de tiol o que torna as nanopartículas magnéticas (NPM) $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ adequadas para muitas montagens biológicas diferentes (VIDOTTI et al., 2011; FREITAS et al., 2016; MAHMOUDI-BADIKIA et al., 2017).

NP com propriedades magnéticas são de grande utilidade devido à sua fácil manipulação com um campo magnético externo e grande área superficial que permite a imobilização de quantas biomoléculas sejam necessárias. As NP superparamagnéticas, com diâmetro entre 10-20 nm são o material magnético ideal para uso em Genoensaios, pois respondem rapidamente a um campo magnético externo e podem ser facilmente redispersados após a remoção de um ímã devido à ausência de magnetização residual e coercividade, também apresentam grande área superficial e de alta transferência de massa (FREITAS et al., 2016; ROCHA-SANTOS, 2014). Em matrizes complexas de aplicações bioanalíticas, por exemplo, a separação de alguns componentes biológicos do seu ambiente nativo é importante ou mesmo essencial, e a separação magnética é uma das formas mais fáceis de executar esse passo na superfície do transdutor (HE e TOH, 2006; EDEM et al., 2006; ZACCO et al., 2007).

Além das NPM, o uso de monocamadas auto-organizadas (SAM, do inglês “self-assembled monolayer”) tem se tornado um procedimento de modificação de

superfícies eletródicas bastante empregado para a imobilização do material biológico (DONG, S., 1997), principalmente devido à sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas. A modificação com SAM tem o intuito de tornar a superfície de ouro mais hidrófila (FISHER, 2011). Um exemplo de composto que pode ser utilizado para este fim é o ácido 6-mercaptopentanóico (MCHAc) (PLÁCIDO et al., 2018). A imobilização através da formação de SAM requer a introdução de um segundo alcanotiol (camada binária), como exemplo o 6-mercaptopentan-1-ol (MCH) que pode ser usado como espaçador de preenchimento para evitar a adsorção não específica de agentes adsorventes e a adsorção plana de DNA o que dificultaria o evento de hibridização. As bicamadas formadas em ouro previamente modificadas são estáveis e possibilitam a caracterização de compostos eletroativos que possam estar inseridos na própria bicamada. Deste modo, os biossensores são desenvolvidos sem que o ambiente biomimético seja alterado, permitindo a interação de biomoléculas sem causar a diminuição da sua bioatividade (BARROSO et al., 2015).

A escolha do eletrodo base ou substrato, cuja superfície sofre modificações, é também uma etapa importante para o desenvolvimento de biossensores aplicados em investigações eletroquímicas, pois possibilita a utilização de materiais específicos para cada material biológico, objetivando minimizar problemas, como a renovação de superfície, maximizar as potencialidades de imobilização de biomoléculas e as suas distribuições espaciais sobre as superfícies modificadas e a aplicação em análise de campo (HE e TOH, 2006).

Neste trabalho é descrito um Genoensaio eletroquímico preciso, sensível, rápido e de baixo custo para detectar e quantificar de forma relativa o evento de milho GM MON810. O esquema de detecção baseia-se na hibridização em formato *sanduíche* de sondas de captura e detecção do DNA alvo do gene endógeno de alta mobilidade HMGA específico do milho. Uma sonda de captura de DNA é ancorada, com auxílio de uma SAM (MCH/MCHAc) carboxilada e dos agentes acoplantes carbodiimida e hidroxisuccinimida (EDC/NHS), na superfície de NPM Fe₃O₄@Au core/shell que por sua vez estão imobilizadas magneticamente na superfície do eletrodo de trabalho, previamente preparado por deposição do ouro por corrente contínua (DC *Sputtering*) sobre um filme de poliéster (HARSANYI, 1995). A detecção eletroquímica foi realizada por cronoamperometria após marcação enzimática da fita

dupla imobilizada na superfície das NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ dispostas no eletrodo de trabalho magneticamente (HALFORD et al., 2013). O Genoensaio foi aplicado na detecção de amostras reais, sem purificação adicional, após amplificação por PCR de materiais de referência certificados contendo milho MON810 visando atender o cumprimento da legislação e o controle destes produtos GM.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Organismos Geneticamente Modificados

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), OGM é definido como um organismo vivo, cujo genoma foi alterado através da introdução de um gene exógeno capaz de expressar uma proteína adicional que confere novas características, tais como a melhoria das propriedades nutricionais, resistência a herbicidas e proteção contra insetos. Além de outras características consideradas de grande relevância, como: tolerância à seca, a solos ácidos, e ao melhoramento de espécies voltadas ao aquecimento global (ALBRECHT e MISSIO, 2013; MANZANARES-PALENZUELA et al., 2015).

Freqüentemente os termos OGMs e transgênicos são utilizados como sinônimos, porém, existe uma diferença técnica entre estes conceitos. Os OGMs são organismos que foram modificados com a introdução de um ou mais genes provenientes de um ser vivo da mesma espécie do organismo alvo. Por outro lado o termo transgênico é utilizado para designar um ser vivo que foi modificado geneticamente, recebendo um gene ou uma sequência gênica de um ser vivo de espécie diferente. Para a execução de tal processo utiliza-se a tecnologia DNA recombinante. Portanto, o transgênico é um tipo de OGM, mas nem todo OGM é um transgênico (ALVES, 2004).

Os OGM são constituídos por uma inserção de DNA exógeno ou gene "cassete", que contém um "promotor" (P), que controla e inicia a expressão do transgene, a "região de codificação", que define a sequência de aminoácidos de um gene específico e que contém as características que se pretendem, e um "terminador de expressão" (t) que indica a finalização da leitura do gene que foi inserido. Além disso, pode ser utilizado um gene marcador que serve para selecionar as células que, de fato, tenham sido transformadas (CÁNOVA, 2014; CONCEIÇÃO, et al. 2006).

O milho MON810 (YieldGard®) resistente a insetos da ordem Lepidóptera, por exemplo, tem como região reguladora o promotor 35S do RNA ribossômico do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV); como região codificadora o gene cry1Ab que codifica a proteína Cry1Ab do *Bacillus thuringiensis*, que confere resistência ao

ataque da broca europeia do milho (*BCE, Ostrinia nubilalis*). A inserção do fragmento de DNA recombinante foi realizada através da técnica de biobalística, onde uma partícula de metal, geralmente ouro ou tungstênio, revestida com o fragmento de interesse é projetada com alta pressão no tecido da planta para que atinja o núcleo da célula, fazendo com que o fragmento de DNA contendo o gene de interesse se integre ao DNA da planta (CELLINI et al., 2004). No entanto, a inserção do gene *cry1Ab* no milho MON810 foi incompleta, devido a rearranjos que ocorreram na transformação genética, assim a proteína expressa diminuiu de tamanho, pois parte da região 3' da construção original não foi integrada no genoma do milho. Somente foram integrados o promotor constitutivo 35S e uma parte do gene *cry1Ab*, contudo, houve deleção completa do terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens* responsável por determinar o final do processo de transcrição do gene (HERNANDEZ et al., 2004).

A Figura 1 mostra um esquema representativo de uma cassete do evento milho MON810.



Fonte: (adaptado de CÁNOVA, 2014).

Figura 1: (A) Esquema representativo de um cassete usado na transformação do evento milho MON810. (B) Esquema representativo do inserto no evento MON810. P35S: Região promotora 35S CaMV do vírus do mosaico da couve-flor, hsp70: íntron de proteína de choque térmico proveniente do gene hsp70 de milho usada para aumentar a expressão do transgene, *cryAb*: gene que codifica a proteína *Cry1Ab* de *B. thuringiensis* e confere resistência ao ataque da broca europeia do milho, NOS: terminador de nopalina sintase.

A detecção de qualquer uma das regiões, mostradas na Figura 1, em uma planta GM, presentes exclusivamente na construção transgene, possibilita sua

discriminação daquelas não GM (CONCEIÇÃO, et al. 2006; ALBRECHT e MISSIO, 2013).

2.2 – Processo de legalização de OGMs

Existem aspectos positivos como: resistência a insetos, a herbicidas, a condições adversas de solo e clima, aumento do potencial nutricional dos alimentos dentre outros, que fazem com que os OGMs sejam objeto de intensa especulação por parte dos cientistas, empresários e políticos, porém, estamos ainda diante de um processo de consolidação de uma nova tecnologia que pode produzir efeitos adversos (ALVES, 2004; ALBRECHT e MISSIO, 2013; BARROSO et al., 2015; LUCHT e THOMAS, 2015). Os riscos, que levam a efeitos adversos, em relação à produção e consumo de OGMs, descritos na literatura, estão divididos basicamente em duas categorias: riscos à saúde humana e ao meio ambiente. No primeiro caso, foi estudado o risco de que plantas geneticamente modificadas possam vir a secretar substâncias incomuns ou inexistentes em alimentos convencionais, as quais serão ingeridas e, em consequência da modificação genética, possam acarretar processos alérgicos e disfunções fisiológicas, desencadeando novas doenças (KREUZER e MASSEY, 2002). Estudos científicos apontam que a ingestão de OGMs não causa riscos identificáveis para a saúde dos consumidores, contudo, persiste o argumento de que o prazo de duração destes experimentos é insuficiente para identificação de possíveis efeitos danosos. Em relação ao meio ambiente, destacam-se: a) risco de eliminação de espécies animais e microorganismos do ecossistema (LOSEY et al., 1999); b) risco de contaminação de espécies convencionais (naturais) por troca de pólen com culturas transgênicas – hibridização; c) risco de geração de novos vírus que causem doenças, bactérias infecciosas, genes resistentes a certos antibióticos e geração de doenças decorrentes da manipulação genética, nos vegetais, animais e também no homem (ULTCHAK, 2018).

De modo a testar e a garantir a segurança dos OGMs, a Academia Nacional de Ciências, Engenharia e Medicina dos Estados Unidos, realizou uma extensa investigação sobre o cultivo de OGM e a utilização dos OGMs como ingredientes em alimentos e rações. Deste trabalho foi concluído que não existem diferenças para a

segurança do ambiente entre as culturas e os alimentos GMs quando comparados com os seus homólogos convencionais. Para mais, não foi encontrada relação entre os transgênicos e problemas ambientais. No que se refere à saúde pública não se encontraram evidências de que os alimentos transgênicos sejam causa de obesidade, doenças gastrointestinais, diabetes, doenças renais, autismo, alergias ou câncer. Contudo um aumento do financiamento em pesquisas que utilizam engenharia genética será necessário para entender e melhorar características complexas, tais como tolerância à seca e fixação de nitrogênio (GOULD et al., 2016).

Apesar das vantagens oferecidas pelos OGMs, a sua utilização não é aceita em todo o mundo. No Brasil os alimentos transgênicos foram introduzidos de uma forma ilegal estando atualmente em processo de legalização. Porém, os movimentos sociais de oposição à utilização de alimentos GMs são muito expressivos. Sendo uma consequência natural da falta de informação científica sobre os seus efeitos benéficos e maléficos bem como a falta de informação por parte dos agricultores e industriais aos consumidores. Estas abordagens e receios por parte dos consumidores em todo o mundo deram origem à criação de agências governamentais de modo a controlar o uso desta tecnologia e regulamentar a segurança dos alimentos transgênicos e seus derivados estabelecendo regras de rotulagem obrigatória (SILVA, 2016).

Na UE a legislação é rigorosa e exige um limite em porcentagem, para a presença tecnicamente inevitável de OGMs, fixado em 0,9%, acima do qual devem ser rotulados como alimentos para consumo humano e animal de produtos alimentares que consistam de OGMs, que os contenham, ou que sejam obtidos a partir de OGMs. O Regulamento CE 1830/2003 estabelece que os alimentos que contenham níveis de OGM superiores ao limite devem ser rotulados como "este produto contém OGM". Para os OGMs não aprovados, que não foram avaliados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, o nível de tolerância é de 0,0%. Além disso, a UE exige a rastreabilidade dos OGM e dos produtos fabricados a partir de OGM em todas as etapas de colocação no mercado através das redes de produção e distribuição (EUROPEAN COMMISSION, 2003).

No Brasil, uma legislação específica para rotulagem de alimentos GM foi inicialmente publicada em 2001, estabelecendo o limite de 4% para presença

acidental de soja transgênica entre os grãos comercializados no país. Em 2003, mediante Decreto Nº 4.680 de 25 de abril, a rotulagem passou a ser obrigatória para produtos embalados, a granel ou *in natura*, que contêm ou que são produzidos a partir de OGMs, acima do limite de 1,0% do produto final (MARCELINO et al., 2007).

A necessidade de monitoramento e verificação da presença e da quantidade de OGM em culturas agrícolas e em produtos alimentares têm gerado o interesse de vários pesquisadores na busca de métodos analíticos cada vez mais precisos, sensíveis, rápidos e de baixo custo na detecção destes produtos de modo a garantir a implementação destes regulamentos e verificação do cumprimento da legislação por parte dos órgãos governamentais, para auxiliar os fabricantes a melhorar a sua produção de alimentos e rações em termos de análise de riscos em pontos críticos de controle, a triagem de avaliação de riscos e as boas práticas de fabricação e para assegurar os direitos do consumidor à informação (BARROSO et al., 2015)

2.3 – Métodos analíticos para a detecção e quantificação de OGM

Culturas e alimentos GM podem ser identificados através de vários tipos de biomoléculas, tais como proteínas específicas, RNA, DNA e metabólitos. Dentre estas biomoléculas, o DNA é a única molécula que possui as vantagens de ser estável, abundante e de fácil amplificação. Assim, a detecção de sequências específicas de DNA, especialmente usando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês), ainda é a estratégia mais eficaz para a detecção de OGM. PCR em tempo real é considerado o padrão ouro para a determinação quantitativa de OGM, devido à sua versatilidade, sensibilidade e potencial de alto rendimento. Várias metodologias utilizadas em procedimentos de rotina, baseadas em proteínas e DNA têm sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de GM (AHMED, 2002). No entanto, estas metodologias convencionais, tais como, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês) para a detecção de proteínas e PCR para a detecção de DNA são laboriosas, dispendiosas e requerem muito tempo de análise e profissionais especializados. Neste sentido, os biossensores aparecem como uma ferramenta bioanalítica com a possibilidade de utilizar dispositivos simples, portátil e de baixo custo para a avaliação OGM.

A detecção do evento específico é necessária para a triagem e identificação de culturas GM autorizadas em cada País (EUROPEAN COMMISSION, 2003; LIN e PAN, 2016). Um aspecto crucial na análise de alimentos contendo OGM é a sua quantificação, pois dependendo da sua concentração final no alimento, este será ou não rotulado como alimento contendo ingredientes GMs. A análise quantitativa de alimentos, por exemplo o milho GM requer a estimativa da quantidade do evento transgênico em relação a um gene endógeno. Ou seja, é uma quantificação relativa que serve como controle positivo para a presença de DNA de milho OGM. Um "gene endógeno" é um gene próprio da célula ou do organismo (EMBRAPA, 2014; CONCEIÇÃO et al., 2006).

As proteínas do grupo de alta mobilidade (HMG, do inglês) são genes endógenos do milho e receberam essa denominação devido à sua alta mobilidade eletroforética em géis de uréia (GOODWIN et al., 1973). Sua alta mobilidade eletroforética está diretamente relacionada à composição de aminoácidos desses polipeptídeos, constituídos por muitos resíduos de aminoácidos básicos e ácidos, e representam uma família de pequenas e abundantes proteínas cromossômicas não histonas associadas à cromatina eucariótica (HMGA, 2016). Esta família de proteínas nucleares não-histonas é o segundo grupo de proteínas cromossomais mais abundantes, cujas funções relacionadas ao DNA são a transcrição, replicação, recombinação e reparação, envolvendo modificação na estrutura do DNA e organização da fibra de cromatina (BUSTIN, 1999). Dessa forma, as HMGs são denominadas de proteínas arquitônicas do DNA (AGRESTI e BIANCHI, 2003). Neste sentido a aplicação de biossensores baseados no gene endógeno HMGA para detecção e quantificação de OGM representa uma técnica promissora a ser explorada

2.4 – Genossensores

Um biossensor é um dispositivo analítico que usa de forma integrada um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) (anticorpos, enzimas, ácido nucléico, dentre outros) em contato direto com um elemento de transdução físico ou físico-químico, para gerar um sinal mensurável, proporcional à concentração do analito em estudo, e produzir uma informação analítica específica,

quantitativa ou semi-quantitativa (LOWE, 1984; IUPAC, 1997). Idealmente, é um dispositivo que é capaz de responder continuamente, de forma reversível, e não perturbar a amostra (LUONG et al., 2008). Devido a sua especificidade os biossensores têm melhor seletividade e, portanto, uma quantificação mais exata, além disso, atraem atenção por serem de fácil preparação, custo relativamente baixo, apresentarem boas perspectivas de miniaturização do sistema e, conseqüente, portabilidade (RIBOVSKI, 2015).

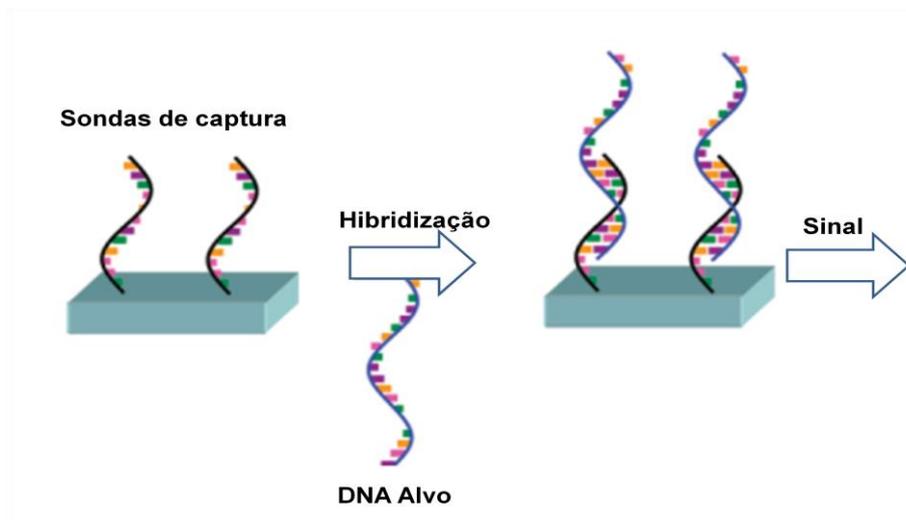
A combinação de ácidos nucléicos com um transdutor apropriado forma um tipo importante de biossensor com desempenho intimamente ligado às propriedades físicas do DNA e do RNA como pureza e comprimento da cadeia. Eles são denominados genossensores (MUSSINI, 2008).

Nos Genossensores é detectada a reação de hibridização entre 2 cadeias complementares de DNA (YOON, 2012). Um Genossensor é muitas vezes apresentado como um eletrodo quimicamente modificado por ácido nucléico e se caracteriza como um dispositivo analítico avançado, com a perspectiva de diagnóstico apresentando alta sensibilidade e especificidade, além de baixo custo com a possibilidade de detectar qualquer sequência de DNA (OZSOZ, 2012; SASSOLAS et al., 2008).

Este tipo de sensor pode conter sequências de DNA com 20 a 40 pares de bases que são imobilizadas em uma plataforma eletrolítica (KAVITA, 2017; WOLCOTT, 1992; WANG, 1999). Segundo Wolcott (1992), sondas mais curtas são mais eficazes na estabilização da hibridização com a sequência alvo do que as sondas mais longas, além disso, foi demonstrado que sondas com menos de 15 pb levam à redução da sensibilidade do sensor, enquanto sondas com maior número de pares de bases levam à falta de resposta do sensor (GODA et al., 2013). Esta imobilização tem como função promover uma modificação específica de uma das extremidades da sequência (5' ou 3'), ou com a ligação de um linker bifuncional que vai se ligar na plataforma e na extremidade da sequência do DNA alvo (BEAUCAGE, 2001). Assim, sequências de bases nitrogenadas são usadas para determinar a presença da sua sequência complementar, gerando um sinal que pode ser monitorado, fazendo destes dispositivos uma excelente ferramenta para detectar espécies de vírus e bactérias mesmo em matrizes mais complexas (MUSSINI, 2008; YOON, 2012).

A detecção eletroquímica de uma molécula de DNA apresenta uma ligação de alta afinidade, sensibilidade e seletividade pela complementaridade das bases de nucleotídeos, no processo de hibridização como representado na Figura 2 (BORGSMANN et al., 2011).

Figura 2: Esquema representativo de um genossensor. A hibridização entre sonda e alvo ocorre na camada de reconhecimento do transdutor.



Fonte: (adaptado de SOUZA, 2014).

O reconhecimento do DNA alvo em associação com um elemento transdutor se dá basicamente de duas formas: por oxidação direta ou catalisada de bases de DNA, ou por resposta eletroquímica gerada por enzima ou outro marcador redox (moléculas capazes de sofrer oxidação e redução) por uma reação específica com o DNA alvo e uma biomolécula marcada com enzima conhecida como conjugado. Por conseguinte, a medida da corrente elétrica será correlacionada em função do produto da reação enzimática após a adição do substrato na célula eletroquímica (MARRAZZA et al., 2001; MURPHY, 2006; FURTADO, 2008; WANG, Y., 2008; SOUZA, 2014). Portanto, basicamente, um sensor eletroquímico para a detecção de DNA é baseado na imobilização de uma sonda de oligonucleotídeo sobre a superfície do eletrodo e a detecção subsequente da cadeia complementar (o alvo) por hibridização.

Estes tipos de dispositivos têm sido amplamente relatados na literatura no qual se imobiliza DNA de OGM's sobre uma superfície de carbono ou eletrodos de ouro (CARPINI et al., 2004; MERIC et al., 2004; LUCARELLI et al., 2005; WANG, J.

et al., 2009), ou nanoestruturas complexas, tais como compósitos de grafeno-nanobastões de TiO_2 (GAO et al., 2012) e nanotubos de carbono (WANG, Q. et al., 2011). A utilização de materiais nanoestruturados tem aumentado intensamente uma vez que estes nanomateriais constituem novas plataformas para detecção biomolecular que proporcionam maior sensibilidade e receptividade à miniaturização (GASPARAC et al., 2004; SOLEYMANI et al., 2009; BIN et al., 2010; BARROSO et al., 2015).

O desempenho dos biossensores de DNA é fortemente influenciado pelas propriedades físicas do DNA, como por exemplo, pureza e comprimento médio da cadeia (RAVERA et al., 2007). A maioria dos biossensores de DNA é desenvolvida com base na imobilização de uma sonda feita a partir de uma fita simples de DNA (ssDNA) na superfície de um eletrodo marcada com um indicador eletroquímico que reconhece sua sequência-alvo complementar (WANG, J., 2000; AHAMMAD et al., 2009).

2.5- Técnicas Amperométricas

Os biossensores amperométricos apresentam funcionamento baseado na medida da corrente por uma reação química produzida pelas espécies eletroativas, sujeitas a oxidação ou redução no eletrodo, medindo a transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa (THÉVENONT et al., 2001; WANG, Y., 2008;) que medem a corrente resultante de alterações de oxidação ou de redução de espécies eletroativas produzida por um potencial colocado entre dois eletrodos. Durante as análises, o potencial é mantido constante, as alterações de corrente verificadas são correlacionadas diretamente com a concentração das espécies eletroativas presentes, com a sua produção, ou com a taxa de consumo na camada biocatalítica. Ou seja, as reações de oxidação e redução que envolvem determinado analito para a medição de suas concentrações geram um fluxo de corrente entre os eletrodos, o qual, dentro de certas condições, é proporcional à concentração do analito que se deseja mensurar (KOZAN, 2007). Os biossensores amperométricos têm sido preferidos pela fácil manipulação e pelo fato da concentração do analito ser proporcional à alteração na corrente elétrica. Na medida amperométrica, quando são utilizadas enzimas como a glicose oxidase que catalisa reações de oxirredução, o

material biológico não necessita de um marcador. No caso do uso de anticorpos ou DNA, a interação com o analito gera poucos íons redox, sendo necessária a conjugação a uma enzima catalítica como a peroxidase (THÉVENONT, 2001; FURTADO et al., 2008; MONOŠÍK et al., 2012). Os principais métodos amperométricos aplicados na análise qualitativa de analitos através do uso de biossensores são a cronoamperometria e cronopotenciometria, a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial (LIMA, 2011). Neste contexto será dado ênfase à voltametria cíclica e à cronoamperometria.

A cronoamperometria consiste na aplicação de um potencial fixo e o registro da corrente em função do tempo, a resposta da corrente e sua variação é monitorada durante um intervalo de tempo suficiente para que haja completa redução ou oxidação do composto estudado. O processo de cronoamperometria envolve a variação do potencial do eletrodo de trabalho a partir de um valor no qual nenhuma reação faradaica ocorre, ou seja, um potencial em que a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo é igual a zero. Um eletrodo de trabalho fixo e uma solução sem agitação são usados neste caso (BOCKRIS e REDDY, 2002; ZOSKI, 2007). A dependência da corrente em função do tempo é então monitorada. Como o transporte de massa nessas condições é unicamente feito por difusão, a curva tempo-corrente reflete a mudança no gradiente de concentração nas proximidades da superfície do eletrodo de trabalho. Isso envolve uma extensão gradual da camada de difusão associada com o esgotamento do reagente, e inclinação, portanto, diminuição da concentração nas proximidades da superfície do eletrodo de trabalho (WANG, J. 2006).

A voltametria cíclica se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida, em função de um potencial, entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. Assim, informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial neste comparado ao de referência. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i_R), ou seja, $i_R = f(E)$. O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma e a magnitude da corrente obtida

pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução (Reação 1), pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na cela eletroquímica. Obviamente existe a necessidade de o analito ser capaz de sofrer a reação redox na janela de potencial estudada (PERES et al., 2007).

Reação 1: Representação de uma reação de redução, sendo O a forma oxidada e R a forma reduzida.



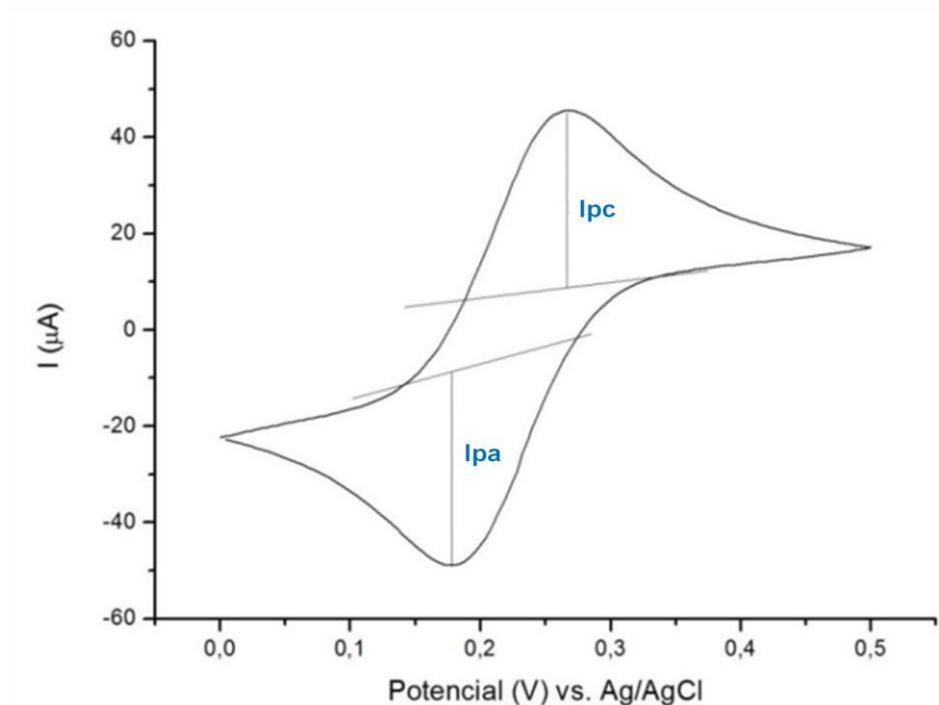
Fonte: (PERES et al., 2007).

A voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a aquisição qualitativa de informações sobre reações eletroquímicas (BOCKRIS e REDDY, 2002), pois fornece informações importantes sobre a termodinâmica dos processos redox, a cinética das reações heterogêneas de transferência eletrônica e sobre as reações de acoplamento ou processos de adsorção (BOCKRIS e REDDY, 2002; PERES et al., 2007). Em uma varredura de voltametria cíclica, facilmente e rapidamente se descobre a localização dos potenciais redox das espécies eletroativas além de se obter uma avaliação prática dos efeitos do meio sobre o processo redox.

A Figura 3 representa uma voltametria cíclica, com a realização de varreduras de potencial em vários ciclos sucessivos, observando-se os picos catódicos e anódicos da espécie eletroativa (KISSINGER e HEINEMAN, 1996; SADIK et al., 2009; TRINDADE, 2015). Parte-se de um determinado potencial e faz-se a varredura de uma determinada gama de potenciais. Depois se inverte o sentido, ou seja, efetua-se a varredura no sentido inverso da mesma gama de potenciais. O ponto de partida e de chegada é o mesmo.

Nesta técnica, realiza-se a varredura de potencial direto e inverso em vários ciclos sucessivos observando-se a oxidação e/ou a redução da espécie eletroativa (Figura 3). Os parâmetros mais importantes num voltamograma desta técnica são os potenciais de pico catódico e anódico e as intensidades de corrente do pico catódico e anódico.

Figura 3: Voltamograma cíclico demonstrando as correntes catódicas (I_{pc}) e anódica (I_{pa}).



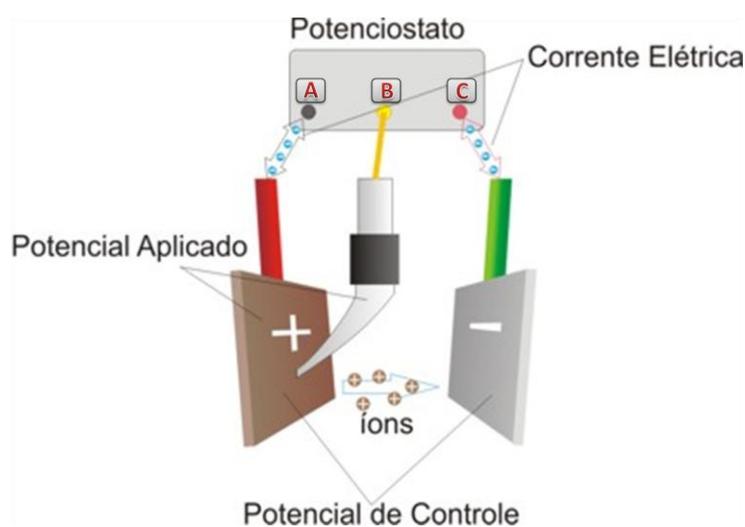
Fonte: (adaptado de TRINDADE, 2015).

O equipamento necessário para uma análise voltamétrica é essencialmente formado por uma célula eletroquímica, na qual pelo menos dois eletrodos (um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência) são imersos em solução eletrolítica, e um potenciostato, aparelho eletrônico que controla o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e permite medir a corrente que o atravessa (SILVA, 2004; HAMMOND et al., 2016).

As células eletroquímicas utilizadas em voltametria podem ser compostas por dois, três ou mesmo quatro eletrodos. Sendo os sistemas de dois e três eletrodos, mais comuns com propósito analítico. Nos sistemas de dois eletrodos tem-se um eletrodo de trabalho de superfície relativamente pequena e um eletrodo de referência de área relativamente grande. Em tais sistemas o potencial é aplicado no eletrodo de trabalho frente a um eletrodo de referência, de modo que apenas o eletrodo de trabalho se polarize. Essa configuração apresenta alguns inconvenientes, pois a corrente resultante da varredura percorre o eletrodo de referência; outra limitação é a resistência da célula: quando ela aumenta, como no caso de meio não aquoso, aumentará a corrente que passará através dos eletrodos,

o que provocará distorções nos voltamogramas, tornando inviável a utilização da técnica nessas condições. Por causa destas limitações, os sistemas com três eletrodos são mais frequentemente empregados (Figura 4). O terceiro eletrodo é chamado de eletrodo auxiliar ou de contra-eletrodo, podendo ser de platina, ouro, carbono vítreo, dentre outros. Esse eletrodo é introduzido para assegurar uma situação potencioestática e, nessa configuração, os eletrodos são conectados a um amplificador operacional que atuará quando for aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, fazendo com que a resistência do eletrodo de referência aumente e a do eletrodo auxiliar, diminua. Dessa forma, a corrente passará entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência. Com esse recurso, o eletrodo de referência realizará seu papel (manter o seu potencial constante durante as medidas) sem interferência (PACHECO et al., 2013).

Figura 4: Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eletrodos: eletrodo de trabalho (A); eletrodo de referência (B); eletrodo auxiliar (C).



Fonte: (adaptado de: <http://br.images.search.yahoo.com/images/view>)

De modo geral, a célula de três eletrodos apresenta as seguintes vantagens: é mais adequada para soluções diluídas, pode ser usada para soluções de alta resistência e pode ser usada com eletrólitos de suporte mais diluídos. Os eletrodos de trabalho, inicialmente representados pelo mercúrio na polarografia, evoluíram substancialmente, passando por eletrodos metálicos puros e ligas, materiais compósitos e pastas. Atualmente, diferentes materiais nanoestruturados são

empregados visando melhorias em sensibilidade, seletividade, estabilidade, entre outros. Conforme a aplicação pretendida, há ainda a possibilidade de modificações químicas transitórias ou permanentes por eletrodeposição, adsorção por interações iônicas, e/ou covalentes, entre outros; em função disso, biossensores vem conquistando papel de destaque nas análises bioquímicas (PACHECO et al., 2013).

2.6 – Imobilização do material biológico

As biomoléculas têm uma fraca estabilidade em soluções, por conseguinte, é necessário estabilizá-las por imobilização, para permitir o uso contínuo dos biossensores. Assim, a etapa de imobilização do material biológico na superfície sensora constitui uma das fases cruciais no desenvolvimento do biossensor para maximizar seu desempenho. Isto serve para assegurar que uma ligação estável ocorra entre a superfície do sensor e o elemento biossensorial sem interromper a atividade biológica do componente biológico e do composto a ser detectado (SALAM, 2010). Ou seja, os sítios ativos da molécula devem ser preservados e permanecer estáveis, a fim de não prejudicar a reação com a amostra de interesse na integração com transdutores. Fatores como a precisão das medidas e a repetibilidade são fortemente influenciados pela estabilidade da biomolécula imobilizada (SASSOLAS et al., 2012). A escolha da técnica de imobilização mais adequada depende da natureza da biomolécula, do transdutor e do método de detecção que será empregado. O melhor método de imobilização também será uma função da propriedade de interesse que desejamos focar durante o desenvolvimento de biossensores (QI et al., 2013).

O método de ligação covalente proporciona maior estabilidade aos biossensores sendo o mais utilizado para a modificação da superfície de eletrodos. A ligação é realizada quimicamente por meio de grupos funcionais do material biológico que não sejam essenciais a sua atividade catalítica, sendo necessário certo conhecimento de sua estrutura, com os grupamentos ativos do suporte, tais como -OH, -NH₂, -COOH, -SH. O ataque covalente geralmente envolve três etapas: (i) a ativação da superfície do sensor, (ii) o acoplamento do elemento de reconhecimento e (iii) remoção das moléculas fracamente ligadas, formando superfícies muito mais estáveis. As condições experimentais ótimas para cada etapa

devem ser determinadas. É importante que os sítios ativos nas biomoléculas não sejam afetados pelo processo de imobilização, para que não se perca a sua atividade (LOJOU e BIANCO, 2006).

Contudo, este procedimento de imobilização do material biológico na superfície sensora, apesar de ser o método mais amplamente empregado, é um artifício que normalmente produz uma superfície altamente desorganizada, com as biomoléculas orientadas randomicamente, provocando mudanças conformacionais que afetam a atividade funcional do componente bioativo (FREIRE et al., 2003). Assim, somente uma pequena porcentagem das biomoléculas na superfície sensora permanece ativa e mantém a capacidade de interagir seletivamente com as espécies de interesse analítico (CHAKI e VIJAYAMOHANAN, 2002). Como alternativa, o uso de SAM (monocamada auto-organizada, do inglês Self-Assembled Monolayer) tem se tornado um procedimento de modificação de superfícies eletródicas bastante empregado para a imobilização do material biológico (DONG e LI, 1997), principalmente devido a sua simplicidade, versatilidade e possibilidade de produzir estruturas altamente ordenadas.

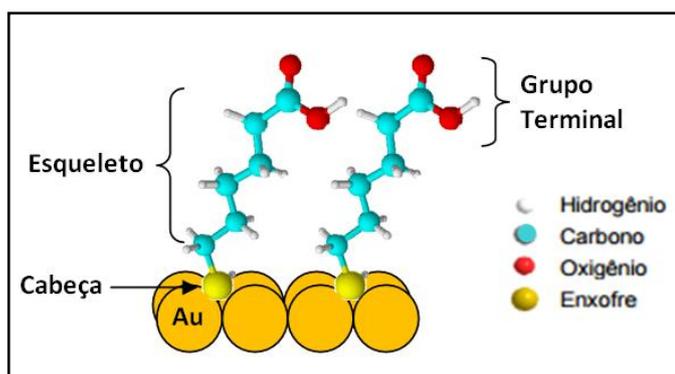
2.6.1 - Monocamadas auto-organizadas (SAMs)

O termo auto-organização é usado para descrever a formação espontânea de uma estrutura a partir dos seus constituintes. Este processo ocorre quando os constituintes (átomos, moléculas, biomoléculas, etc) se juntam de forma espontânea para gerar uma estrutura complexa, ordenada e estável. O exemplo comum são as monocamadas auto-organizadas (SAMs) formadas de moléculas (ou átomos) dispostas numa superfície sólida. Este tipo de modificação emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução constituída de moléculas anfóteras; enquanto que, a adsorção deste tipo de molécula é um resultado da afinidade de um grupo funcional do adsorvente, que apresenta certa especificidade para interagir com a superfície do substrato, a força motriz para a organização origina-se a partir de interações hidrofóbicas (por exemplo, do tipo van der Waals) das cadeias longas ligadas ao grupo funcional. Uma variedade de materiais (por exemplo, superfícies de Pt, Au, Ag, Cu, dentre

outros) e de moléculas anfóteras (como derivados alquil, alcoóis, aminas, tióis etc.) têm sido empregadas na confecção de sistemas organizados (FREIRE et al., 2003).

Uma estrutura altamente ordenada é obtida ao ser realizado o emparelhamento perfeito entre os alcanotióis (geralmente com uma inclinação de 20 a 30 graus em relação à normal da superfície) e o retículo do ouro (Figura 5), tornando este sistema objeto de um grande número de estudos por meios espectroscópicos, microscópicos e eletroquímicos. (MANDLER e TURRYAN, 1996; FREIRE et al., 2003; FISHER, 2011). SAMs de tióis sobre ouro atraem muito a atenção principalmente pela facilidade na sua preparação e na sua estabilidade (relativamente alta) devido à ligação forte S-Au formando uma monocamada com estrutura densamente empacotada. As moléculas que constituem a monocamada são divididas em três partes: cabeça ou âncora (grupo ligante), esqueleto ou cauda (cadeia principal) e grupo terminal ou grupo funcional (interage com o ambiente) (FISHER, 2011).

Figura 5: Esquema de emparelhamento entre os alcanotióis (ex: ácido 6-mercaptopentanóico) e o retículo do ouro numa camada auto-organizada.



Fonte: (adaptado de FISHER, 2011)

A cabeça (grupo do S) inicia o processo de organização sendo adsorvido à superfície do eletrodo através de uma ligação covalente forte entre a molécula e o substrato sólido, conferindo robustez a SAM (SCHREIBER, 2000). Os compostos contendo enxofre apresentam uma forte afinidade com a superfície dos metais de transição, sendo que o enxofre se liga fortemente ao ouro (incluindo nanopartículas), prata, cobre, platina, ferro, entre outros (ULMAN, A., 1996).

O esqueleto é constituído por uma cadeia alquila, de diferentes comprimentos que estabilizam a SAM através das interações Van der Waals que finalizam o empacotamento de alta regularidade da monocamada. E o grupo terminal, com diferentes grupos funcionais que apresentam propriedades específicas como atividade redox, hidrofobicidade, e ainda facilidade de ligação a biomoléculas, entre outros, destacando-se os grupos funcionais -COOH e -NH₂. O grupo terminal dita as propriedades da superfície. Escolhendo de forma adequada o grupo terminal é possível se obter uma monocamada hidrofílica ou hidrofóbica, com repulsão ou atração a metais e até escolher um grupo exposto capaz de reagir com moléculas em uma solução. Estes grupos podem então ser manipulados de acordo com as mais variadas aplicações (FISHER, 2011; FREIRE, et al.,2003).

Vários trabalhos têm sido dedicados ao entendimento da estrutura e do ordenamento das monocamadas, que são caracterizadas pelo alto grau de organização e têm sido empregadas em estudos de transferência de elétrons, adsorção de proteínas, e, principalmente, em vários campos da eletroanalítica. A preparação da monocamada possui um papel fundamental no desempenho eletroanalítico do eletrodo modificado. A estrutura da monocamada depende fortemente do substrato e de sua morfologia, da natureza do acoplamento e das forças intermoleculares entre as moléculas do material que é adsorvido. Muitos procedimentos descrevendo a formação de monocamadas têm sido reportados. Na maior parte dos casos, é aceito que o acoplamento do material adsorvido é uma etapa relativamente rápida e espontânea, que é seguida por um processo de organização muito mais lento (FREIRE et al., 2003).

A primeira interação entre o ouro e o átomo de enxofre ocorre de forma rápida. Numa segunda etapa, mais lenta, verifica-se a organização da camada sobre o substrato através de interações intermoleculares Van der Waals entre as cadeias carbônicas e as moléculas de tiol (LOVE, 2005).

Tais etapas são comumente realizadas em solventes orgânicos e a temperatura ambiente, por períodos de tempo que podem variar de poucos minutos até muitos dias (FREIRE et al., 2003).

O comprimento da cadeia carbônica dos alcanotióis pode influenciar na formação da SAM. Assim, dependendo do comprimento das cadeias, as monocamadas podem variar de altamente densas, para cadeias longas, superiores

ou iguais a 10 carbonos, a pouco densas e parcialmente desordenadas, com cadeias curtas (DUAN e MEYERHOFF, 1995; FREIRE et al., 2003).

O emprego de monocamadas auto-organizadas pode oferecer muitas vantagens para a eletroanalítica. A capacidade de pré-projetar uma monocamada viabiliza o desenvolvimento de superfícies com propriedades e funções específicas, promovendo interações quase específicas entre a superfície do eletrodo e os analitos alvos. A possibilidade de se obter uma estrutura molecular ordenada orientada de forma específica faz com que seja possível otimizar processos, tais como, complexação e/ou transferência de elétrons, que são fundamentais no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. A alta organização exibida pelas monocamadas garante um comportamento homogêneo em toda a superfície do eletrodo, contribuindo assim para a obtenção de sensores com maior sensibilidade e reprodutibilidade. Além disso, a dimensão da monocamada, que se situa em escala molecular, evita uma difusão lenta das espécies eletroativas para a superfície, especialmente quando comparada com a cinética apresentada pelos eletrodos modificados com filmes poliméricos finos ou por compósitos. As monocamadas auto-organizadas possuem ainda a capacidade de reduzir drasticamente as correntes residuais não faradáicas, e também a acumulação de espécies indesejadas sobre a superfície do eletrodo (passivação) (FREIRE et al., 2003).

A modificação com SAM tem o intuito de tornar a superfície de ouro mais hidrófila. Um exemplo de um dos compostos que pode ser utilizado para este fim é o ácido 6-mercaptohexanóico (FISHER, 2011). A facilidade de automontagem de sondas de DNA tioladas, comercialmente disponíveis, em superfícies de ouro torna esta estratégia uma das mais empregadas na construção de biossensores. A imobilização por meio da formação de monocamada automontada (SAM) requer a introdução de um segundo alcanotiol (camada binária), tipicamente 6-mercaptohexan-1-ol (MCH), como espaçador de preenchimento para evitar a adsorção não específica de agentes adsorventes e a adsorção plana de DNA o que dificulta o evento de hibridização (BARROSO et al., 2015). O tiol MCH é responsável por estabelecer uma ligação muito forte e estável com o ouro, enquanto o grupo carboxila estará disponível para interagir com os grupos hidrófilos dos fosfolipídios. As bicamadas formadas num ouro previamente modificado são estáveis e possibilitam a caracterização de compostos eletroativos (por exemplo, por

voltametria cíclica) que possam estar inseridos na própria bicamada. Deste modo, os biossensores são desenvolvidos sem que o ambiente biomimético seja alterado, permitindo a interação de biomoléculas sem causar a diminuição da sua bioatividade.

2.6.1.1 – Ativação da superfície da SAM

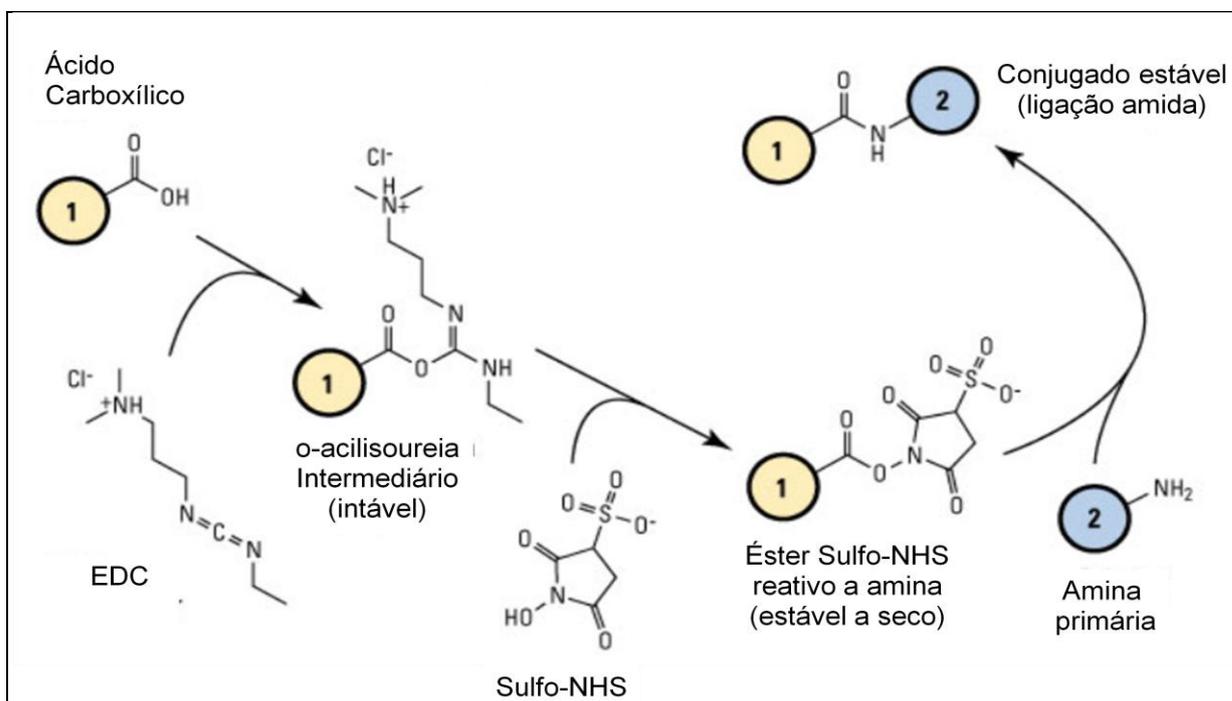
De acordo com Jonhsson et al. (1991), para que ocorra a ligação efetiva da biomolécula é necessário ativar a superfície da SAM, a fim de transformar os grupamentos carboxílicos terminais pouco reativos em grupos reativos e susceptíveis ao ataque nucleofílico pelos grupos amino livres presentes na molécula alvo (JONHSSON et al., 1991). Alguns estudos mostram que a ativação dos grupos funcionais terminais das SAM pode ocorrer pela adição dos agentes de acoplamento N-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS), estas moléculas são as mais usadas como agentes de acoplamento no processo de imobilização do sistema sensor e são utilizadas para aumentar o rendimento da reação e a estabilidade da ligação amida formada (JONHSSON et al., 1991; OLDE et al., 1996; ZEEMAN et al., 1999; SAITO et al., 2004; ARYA et al., 2009; CHEN, Y. et al., 2011; SAMANTA e SARKAR, 2011).

O EDC atua aperfeiçoando a durabilidade das ligações na superfície do biossensor. Para aumentar a eficiência deste reagente ou criar intermediários estáveis, é frequentemente incluído nos protocolos de acoplamento de EDC, o NHS, que oferece alta solubilidade em água, baixa toxicidade e ótima reatividade através dos ésteres ativos (JONHSSON et al., 1991; OLDE et al., 1996; ZEEMAN et al., 1999; SAITO et al., 2004; ARYA et al., 2009; CHEN, Y. et al., 2011; SAMANTA e SARKAR, 2011).

A ligação covalente por meio destes reagentes se dá em duas etapas principais: A ativação inicial da superfície usando reagentes multifuncionais, destacando-se as carbodiiminas, em seguida é realizado o acoplamento da biomolécula ao suporte ativado e remoção do excesso de biomoléculas não ligadas (SASSOLAS, A., 2012). No mecanismo, o EDC reage com grupos ácidos carboxílicos para formar um intermediário O-acilisourea ativo que é facilmente deslocado por ataque nucleofílico a partir de grupos amino primários na mistura

reacional. Contudo, o intermediário O-acilisoureira é instável em soluções aquosas, portanto, a N-hidroxissuccinimida (NHS) ou o seu análogo solúvel em água (Sulfo-NHS) é frequentemente incluído nos protocolos de acoplamento de EDC para melhorar a eficiência ou criar intermediários (reativo a amina) estáveis. O EDC acopla o NHS aos grupos carboxila, formando um éster de NHS que é consideravelmente mais estável do que o intermediário O-acilisoureira, permitindo assim a conjugação eficiente com aminas primárias em pH fisiológico (CARBODIIMIDE CROSSLINKER CHEMISTRY, 2019). A "ativação" da superfície envolve a geração de uma camada superficial terminada por éster de NHS, neste caso, à partir de uma SAM carboxilada (MCH/MCHAc). O "acoplamento de amida" subsequente de uma biomolécula contendo amina, portanto, origina uma superfície com sonda ligada covalentemente. O processo descrito, bem como as fórmulas estruturais do EDC e NHS, se encontra esquematicamente ilustrado na Figura 6 (PESQUERO, 2013). A adição de NHS (ou Sulfo-NHS) às reações de EDC aumenta a eficiência e permite que a molécula (1) seja ativada para armazenamento e uso posterior.

Figura 6: Mecanismo de ativação dos grupamentos carboxílicos por meio da reação com EDC/NHS, onde (1) simboliza a superfície funcionalizada e (2) simboliza a biomolécula.



Fonte: (adaptado de PESQUERO, 2013).

Geralmente utiliza-se o ácido como espaçador que fornece grupos-COOH para ligação com as NPs de Fe₃O₄@Au aminado e sonda modificada com – NH₂ ativados por meio de carbodiimida e N-hidroxisuccinimida (BOLLEY et al., 2014).

Para minimizar as ligações não específicas que ocorrem na superfície do sensor, normalmente é utilizada uma solução de albumina sérica bovina (BSA) 5 mg/mL (PBS) adicionada com a função de ocupar os espaços remanescentes. A BSA vem sendo usado nas pesquisas como um dos mais tradicionais agentes bloqueadores de possíveis regiões livres, pois apresenta algumas características singulares, tais como: boa distribuição aleatória sobre a superfície do sensor. É um método químico simples e de baixo custo (CHEN, L., et al. 2009).

2.7 - Biomoléculas associadas com nanopartículas de ouro

A nanotecnologia tem sido uma das tendências de pesquisas mais importantes nas ciências dos materiais. Comparativamente com materiais de tamanhos maiores, os nanomateriais ou NM (NP com tamanho na gama de 1-100 nm) mostram notáveis diferenças nas propriedades físicas e químicas, tais como características únicas como as ópticas, elétricas, catalíticas, térmicas e magnéticas, devido ao seu pequeno tamanho. Nos últimos anos, esforços consideráveis têm sido feitos para desenvolver NP magnéticas (NPM), devido às suas inúmeras vantagens, tais como o seu tamanho, propriedades físico-químicas e baixo custo de produção. NPM apresentam seu melhor desempenho em tamanhos de 10-20 nm devido ao supermagnetismo, o que as tornam especialmente apropriadas quando se pretende uma resposta rápida devido ao campo magnético aplicado. NPM também tem grande área de superfície e de alta transferência de massa (ROCHA-SANTOS, 2014).

Uma vez que as propriedades de NPM dependem fortemente das suas dimensões, a sua síntese e a sua preparação tem que ser realizada com o intuito de se obterem partículas com tamanho adequado dependendo das propriedades físico-químicas. Na literatura, vários tipos de NPMs, possuindo propriedades físico-químicas adequadas e propriedades de superfície adaptadas, foram sintetizadas sob condições precisas para uma infinidade de aplicações, tais como preparação de amostras, o tratamento de águas residuais, purificação de água, terapia de doenças,

diagnóstico de doenças (ressonância magnética), marcação celular e imagiologia, engenharia de tecidos, sensores, biossensores e outros sistemas de detecção. Além disso, NPMs têm sido utilizados para aumentar a sensibilidade e a estabilidade dos sensores e biossensores para a detecção de vários analitos em análises clínicas, controle de alimentos e aplicações ambientais (ROCHA-SANTOS, 2014).

Dentre os nanomateriais, o ouro tem um papel especial na construção de biossensores (VIDOTTI et al., 2011). Muitos procedimentos sintéticos podem ser encontrados na literatura para controlar o tamanho, a monodispersão, a morfologia e a química superficial das nanopartículas de ouro (AuNP). A fácil modificação da superfície do ouro, por moléculas tioladas, tornam as NP apropriadas para diferentes montagens biológicas (VIDOTTI et al., 2011).

As nanoestruturas de ouro apresentam muitas vantagens na Química Analítica quando utilizadas como transdutores ou como um componente da camada de reconhecimento num dispositivo de detecção em escala macro. No primeiro caso, as propriedades intrínsecas de AuNP, quando usadas como transdutores, são obtidas várias melhorias, tais como transporte de massa, maior disponibilidade de locais reacionais, efeito óptico de agregação/dispersão e o aumento do sinal óptico, devido a propriedades ressonantes de plasmon de superfície localizadas nestas nanopartículas adicionadas, pode ser explorado. No último caso, a melhoria da resposta do biossensor pode ser conseguida pelo aumento da relação área/volume que aumenta o número de biocomponente ligado na superfície de detecção (VIDOTTI et al., 2011).

Como mencionado anteriormente, um ponto interessante relativo às AuNP está relacionado com a banda de plasmon de superfície (SPB), que consiste numa banda de absorção larga na região visível ao redor de 520 nm. Esta banda é devido a oscilações coletivas dos elétrons na banda de condução na superfície das nanopartículas, o que proporciona uma informação considerável da estrutura da banda em metais. Esta propriedade tem sido objeto de muitos estudos na espectroscopia óptica (VIDOTTI et al., 2011).

As NP têm áreas superficiais elevadas e propriedades físico-químicas únicas que podem ser facilmente adaptadas, tornando-as os candidatos ideais para o desenvolvimento de dispositivos biossensíveis. AuNPs obtidas de fontes comerciais ou convenientemente produzidos em laboratórios têm atraído muita atenção em

estudos biológicos devido à sua baixa toxicidade, síntese relativamente simples, controle do tamanho das nanopartículas, facilidade de modificação química da sua superfície, biocompatibilidade e propriedades ópticas únicas. A escala nanométrica confere aos materiais propriedades diferentes daquelas vistas no estado macro e microscópico. Um dos efeitos é a cor do material que varia fortemente quando os materiais atingem a dimensão nanométrica. O ouro torna-se vermelho escuro ou vinho. Esta mudança de cor também é útil para avaliar a estabilidade das nanopartículas. Através da agregação, ou seja, perda da estabilidade, a cor irá mudar. Este fato pode também ser útil quando se adiciona à suspensão de nanopartículas compostos que possam interagir com elas, fazendo-as agregar. A mudança de cor será um indicativo desse processo de interação entre nanopartículas e compostos (VIDOTTI et al., 2011; KIM et al., 2008; LOU et al., 2011).

O processo de imobilização de biomoléculas (ex: DNA) sobre AuNPs utilizadas como nanoplataformas em bioensaios pode influenciar ou até modificar as respostas do biossensor (VIDOTTI et al., 2011). Cada metodologia pode apresentar vantagens e desvantagens, sendo que o melhor arranjo deve ser estudado e otimizado, buscando resultar em um sensor que possa apresentar um sinal expressivo do processo analítico, com reprodutibilidade (precisão interlaboratórios) e repetibilidade (precisão intracorrída) adequadas (MARQUES, 2008).

Testes biológicos que medem a presença ou a atividade de analitos selecionados tornam-se mais rápidos, mais sensíveis e flexíveis quando partículas em nanoescala são colocadas juntas, com inúmeras vantagens sobre procedimentos mais tradicionais (VIDOTTI et al., 2011).

2.8 - Nanopartículas magnéticas core@shell de Fe₃O₄ recobertas com Au

Com o desenvolvimento de novos materiais tem-se descoberto propriedades eletrônicas, elétricas, ópticas e catalíticas únicas para aplicações nanotecnológicas. Entre estes nanomateriais com características singulares, estão as NP core@shell, que consistem em partículas concêntricas, nas quais, partículas de um material são revestidas com uma camada de outro material. Usando diferentes tipos de técnicas de síntese é possível combinar propriedades físico-químicas dos dois nanomateriais

(podem ser utilizados óxidos metálicos, metais, polímeros e semicondutores), promovendo maior eficiência em aplicações para diferentes fins tecnológicos como melhoramento em propriedades luminescentes, engenharia de estrutura de banda, estabilidade química para colóides, liberação de fármacos, sensores, biossensores e etc. (SUÁREZ BALLESTEROS, 2012).

A combinação de dois ou mais materiais distintos com propriedades diferenciadas entre si, por exemplo, numa estrutura core@shell do tipo $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$, o núcleo de Fe_3O_4 provém funcionalidade magnética, podem ser estáveis em meio biológico corrosivo e podem ser facilmente modificadas (SUÁREZ BALLESTEROS, 2012) e a camada externa dessas nanopartículas recobertas com ouro (AuNPs) possui propriedades eletrocatalíticas, óticas e funcionalidades químicas únicas, além de ser um componente de atividade plasmônica, oferece proteção ao núcleo por ser quimicamente inerte, comparado ao óxido de ferro. Em adição, a presença de Au na camada mais externa da nanoestrutura leva a uma superfície favorável para a ligação de diversas biomoléculas (WANG et al. 2005; XU et al. 2007).

As propriedades eletrocatalíticas das NP $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$, permitem usá-las em sensores de espécies eletroativas utilizando técnicas potenciométricas. Uma das moléculas de interesse é o DNA, portanto, o sensor deve ser altamente sensível e seletivo em relação aos seus interferentes e com uma rápida resposta. Os sensores podem ser fabricados por diferentes técnicas: eletrodos baseados em materiais sol-gel, filmes de Langmuir-Blodgett, automontagem, dentre outros. A técnica de automontagem proporciona a construção de sensores econômicos e de alta sensibilidade, sendo baseada em interações eletrostáticas e mostra vantagens como fácil operação, ampla escolha de materiais, precisão no controle de composição e espessura de camadas (SUÁREZ BALLESTEROS, 2012).

A obtenção de nanopartículas de óxido de ferro pode ser realizada através de processos físicos ou químicos. As principais características desejadas em uma amostra de nanopartículas, independente do método aplicado para síntese são: controle de tamanho, distribuição uniforme de tamanho, reprodutibilidade, alta cristalinidade e estrutura cristalina desejada, controle de morfologia, boa dispersão sobre substratos e em solução (EFFENBERGER, 2012).

Devido à elevada qualidade dos materiais obtidos, a decomposição térmica é considerada, na literatura, como um dos melhores métodos para obtenção de

nanopartículas (EFFENBERGER, 2012). O conceito de decomposição térmica está ligado ao uso de aquecimento para a decomposição de um precursor metálico e posterior conversão em outro material. Entretanto, o termo também é usado para reações em estado sólido e para sínteses de nanomateriais em geral, quando há uso de aquecimento. A decomposição térmica se baseia na redução de sais metálicos e/ou na decomposição de precursor metálico com uso de um solvente de alto ponto de ebulição, na presença de aditivos. O método de decomposição térmica produz partículas uniformes, com alto grau de cristalinidade, controle de tamanho e forma, e quando depositadas em uma superfície se alinham formando filmes. As nanopartículas podem ser recobertas com outros materiais como, por exemplo, à superfície protetora, biocompatível e com propriedades óticas do ouro nanométrico, por exemplo (EFFENBERGER, 2012).

2.9 - Escolha e pré-tratamento do eletrodo base

Existe uma grande variedade de eletrodos que podem ser usados para fabricar dispositivos de sensores como ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, fibras de carbono e pasta de carbono, carbono vítreo reticulado, material plástico condutor e vidros condutores (PEREIRA et al., 2002). A preferência pelo substrato deve levar em conta as características apropriadas adequadas ao método de imobilização a ser utilizado, objetivando minimizar problemas básicos, como a renovação de superfície, maximizar as potencialidades de imobilização de biomoléculas e as suas distribuições espaciais sobre as superfícies modificadas e a aplicação em análise de campo (HE e TOH, 2006). As superfícies de ouro, atuando como substrato, apresentam vantagens, pois favorecem a formação de SAM tornando esta superfície bem definida, organizada e flexível, proporcionando um sistema simples adequado para a imobilização de DNA tiolado na superfície de AuNP sobre o eletrodo de trabalho o que torna a proposta da construção de biossensores com nanopartículas de ouro uma técnica promissora (ZHOU, 2006; HE e TOH, 2006; LA-SCALEA et al., 1999; LUCARELLI et al., 2004; DE-LOS-SANTOSÁLVAREZ et al., 2004; SENARATNE et al., 2005; AKRAM et al., 2004; FREIRE et al., 2003).

Quando a superfície de ouro apresenta um nível de imperfeição ou rugosidade elevada há interferência na orientação das monocamadas, fazendo com que sítios da superfície metálica fiquem diretamente expostos ao meio, o que, em termos de resposta eletroquímica, pode ocasionar um erro na interpretação do efeito de bloqueio provocado pela formação das SAMs sobre a superfície de ouro. A heterogeneidade do eletrodo está associada tanto a utilização de eletrodos de ouro policristalinos, os quais possuem planos cristalográficos distintos disponíveis, quanto à presença de moléculas adsorvidas ou óxidos do material do eletrodo, pois em ambos os casos a adsorção do agente modificador pode ocorrer com energias distintas, resultando em um filme menos organizado. A fim de minimizar as imperfeições na morfologia dos filmes formados e, conseqüentemente, aumentar a organização das moléculas modificadas, é necessário efetuar um procedimento de pré-tratamento da superfície do eletrodo (CARVALHAL et al., 2005). O estudo da reprodutibilidade destes eletrodos pode ser realizado através da obtenção de diversos parâmetros, dentre os quais a área real (área ativa) da superfície eletródica ganhou destaque entre os pesquisadores. É possível que o cálculo da área ativa seja realizado através dos dados fornecidos no pré-tratamento eletroquímico de eletrodo do ouro, o qual promove a formação de óxidos superficiais, e a posterior redução dos mesmos (HOOGVLIET et al., 2000).

Dentre as técnicas eletroquímicas mais utilizadas para caracterizar superfícies eletródicas está a voltametria cíclica (VC), pois traz informações sobre a interação do eletrodo com a solução em que este está em contato (BENITESA et al., 2014). Na construção de eletrodos modificados por camadas auto-organizadas, o pré-tratamento do eletrodo de ouro tem a finalidade de promover uma homogeneização prévia da superfície eletrostática para posterior ancoramento de moléculas de interesse. O tratamento eletroquímico consiste na ciclagem do eletrodo de trabalho em solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, tem o objetivo de eliminação de óxidos superficiais formados durante o tratamento químico, por redução do metal. Através dos voltamogramas obtidos durante o pré-tratamento é possível obter a carga de pico de redução do ouro, e calcular a área ativa do eletrodo. Esta carga corresponde à dessorção da monocamada de oxigênio presente na oxidação de óxidos superficiais. Este valor é dividido pelo valor da carga (386 uC cm^{-2}) necessária para promover a dessorção de uma monocamada de oxigênio presente em um eletrodo de ouro com

1 cm² de área ativa (BARD e FAULKNER, 2001). Este procedimento é indispensável, já que a área ativa do eletrodo varia muito entre medidas consecutivas, apesar de se efetuar exatamente o mesmo tratamento superficial nos eletrodos (CARVALHAL et al., 2005).

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Desenvolver um genoensaio eletroquímico para detecção do gene endógeno de alta mobilidade HMGA específico do milho que se encontra imobilizado na superfície da nanoplataforma constituída por nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ core/shell e será utilizado para identificar e estimar a quantidade relativa dos eventos GM em amostras de milho.

3.2 – Objetivos específicos

- ✓ Montar o eletrodo de trabalho confeccionado a partir da deposição (por *sputtering*) de ouro numa folha de polyester;
- ✓ Realizar testes eletroquímicos para limpar e ativar os eletrodos de trabalho;
- ✓ Produzir nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ por decomposição térmica;
- ✓ Selecionar um material biológico específico capaz de detectar gene endógeno do milho HMGA;
- ✓ Modificar a superfície das nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ usando Monocamadas Auto Montadas (SAM) de compostos tiolados;
- ✓ Imobilizar cadeias simples de DNA nas nanoplataformas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ de forma a desenvolver genoensaios eletroquímicos;
- ✓ Realizar a reação de hibridização da sequência de DNA complementar (ensaio de formato de sanduíche) usando-se marcadores enzimáticos;
- ✓ Detectar o sinal eletroquímico por cronoamperometria;
- ✓ Avaliar a exatidão e precisão do método;
- ✓ Aplicar o método a amostras comerciais;
- ✓ Realizar a verificação de conformidades entre o produto e sua especificação para garantir que o controle destes produtos seja efetuado de forma rápida a fim de detectar eventuais utilizações fraudulentas.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1- Reagentes e Soluções

Etanolamina (+99%), N-hidroxissuccinimida (NHS, 98%), 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC, ≥98%), ácido 6-mercaptopentanóico, 90% (MCHAc 90%, d=1.0715), 6-mercaptopentan-1-ol (MCH), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (solução aquosa de TMB contendo H₂O₂), solução salina 2xSSPE, pH 7,4 (solução de fosfato de sódio com NaCl, EDTA e 1,0% ProClin® 150, preparada por diluição 1/10 de 20 x SSPE), ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfônico (tampão HEPES ≥99.5%) todos da marca Sigma-Aldrich, caseína 1% (p/v) em tampão PBS da marca Termo Scientific. Agente tensoativo Tween® 20 (qualidade para síntese, 96-100%) da marca Merk-Schuchardt. 6-mercaptopentan-1-ol (MCH, ≥97%) da marca Fluka. Fragmento anti-fluoresceína-peroxidase (Anti-FIT-POD) da marca pela Roche Germany®, Albumina de soro bovino (BSA) da marca Acros Organics. Cloreto de sódio (99.5%) da marca Panreac®. Tampões de lavagem: (i) SSPE-T: 2X SSPE, 0,01% de Tween 20), (ii) HEPES-T (0.1 M HEPES, 0,01% Tween® 20), (iii) HEPES (0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 7,4) e PBS-C (1x PBS solution contendo 1% caseína). Para o passo de reação de hibridização homogênea utilizou-se a solução 2X SSPE (com 2,5% de BSA ou sem BSA). As sequências específicas do gene endógeno HMGO: DNA Captura (Sonda de Captura), DNA Target (Sonda alvo ou analito), DNA marcado signalling (Sonda de sinalização) foram obtidas como sais dessalinizados liofilizados todos da marca Sigma-Aldrich® e estão listadas na Tabela 1. Todas as soluções estoque de oligonucleotídeos foram preparadas em água ultrapura purificada em um sistema Milli-Q e armazenadas a -20 ° C. Prepararam-se soluções de trabalho de DNA por diluição de uma quantidade de solução reserva de DNA em 2 x SSPE. Materiais de referência certificados (CRM) do evento de milho geneticamente modificado MON810 10% (p / p) obtidos a partir do Instituto de Materiais e Medições de Referência da marca Sigma-Aldrich. Nanopartículas de magnetita revestidas com ouro (Fe₃O₄@Au na proporção 1:7) preparadas segundo procedimento descrito em Freitas et al. (2016), utilizando acetilacetato de ferro (III) ([Fe(acac)₃], + 99%, MM: 353.17, C₁₅H₂₁FeO₆) e oleilamina (85%) da marca Acros Organics®. Hexadecan-1-ol (95%), ácido oleico (90%), N-metilpirrolidona (NMP,

+99%) e tolueno anidro (99.8%) todos da marca Sigma-Aldrich. Ácido cloroáurico tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, MM: 393,83, 99,9%, Aumin 49,5%) da marca Alfa Aesar® e etanol absoluto (qualidade para análise) da marca Fisher Scientific®. Para a amplificação por PCR utilizou-se uma polimerase Immolase™ (Ecogen, Espanha), 1 x tampão, $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cada dNTP, $6,5 \text{ m mol.L}^{-1}$ de MgCl_2 , $0,3 \text{ m mol.L}^{-1}$ de cada iniciador (Tabela 1). Em todas as experiências utilizou-se água ultrapura purificada com um sistema Milli-Q com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

Tabela 1: Sequência de oligonucleotídeos: sonda alvo, sonda de captura, sonda sinalizadora e iniciadores.

Função	Oligonucleotídeos 5' → 3'
Sonda alvo (79 nt)	5'T TGG ACT AGA AAT CTC GTG CTG ATT AAT TGT TTT ACG CGT GCG TTT GTG TGG ATT GTA GGA CAA GGC TCC CTA TGT AGC'3
Sonda de captura (30 nt)	(NH_2) 5'GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC TAC AAT CCA'3
Sonda sinalizadora (49 nt)	5' CAC AAA CGC ACG CGT AAA ACA ATT AAT CAG CAC GAG ATT TCT AGT CCA A'3 (FITC)
Iniciador Direto (F) (23 nt)	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'
Iniciador Reverso (R) (22 nt)	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'

FITC: é um fluoróforo comumente utilizado como marcador de fitas de DNA

4.2 - Instrumentação

Todas as pesagens foram realizadas, utilizando uma balança analítica digital Mettler Toledo®, New Classic MS 205 DU. O substrato de ouro, foi confeccionado, à partir da deposição de um filme fino de ouro, realizada em uma câmara de vácuo Edwards Auto 306, com revestimento para evaporação térmica de um fio de ouro (99,99% de pureza), em alto vácuo (10^{-6} torr). As nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ foram sintetizadas utilizando-se uma placa aquecedora Thermo Cientific da marca Cimarec, um sistema de resfriamento e termômetro. O tamanho e a morfologia das

nanopartículas de Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ foram determinados por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) usando um microscópio JEOL-JEM-1400 (Tokyo, Japan), equipado com uma câmera de aquisição de imagens Gatan SC 1000 ORIUS CCD (Warrendale, PA, USA). As amostras foram preparadas por diluição da dispersão dos ferrofluidos Fe_3O_4 e $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$, em tolueno, seguida da imersão de uma grelha de cobre de 400 mesh revestida com carbono da dispersão diluída obtida e posterior secagem ao ar (Freitas, M.C.C., 2016). Os espectros de absorção das soluções de nanopartículas em tolueno foram obtidos num espectrofotômetro UV-VIS Termo Scientific, modelo Evolution 300 BB, de duplo feixe, acoplado a um computador que opera o programa espectrofotométrico Visionpro e cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. A abertura de fenda foi 2,0 nm, velocidade de varredura de 300 nm min^{-1} e medidas de absorbâncias obtidas a cada 0,5 nm, numa faixa de comprimento de onda de 190 – 350 nm e linha de base system. As amplificações por PCR foram realizadas num ciclador térmico (GeneAmp® PCR System 2700 thermocycler - Applied Biosystems, Espanha). Para a realização do genoensaio usou-se uma plataforma de suporte para eppendorfs, modelo DynaMag TM-2, com capacidade para 16 tubos, adquirido pela Life Technologies. A obtenção dos voltamogramas de ativação dos eletrodos de trabalho e o resultado dos genoensaios foram realizados utilizando um Potenciostato Eco Chemie, modelo AutolabPGSTAT12, acoplado a um computador que opera o programa GPES Manager (General Purpose Electrochemical System Version 4.9). As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Potenciostato Eco Chemie, modelo AutolabPGSTAT12, utilizando uma configuração convencional de três eletrodos. Os eletrodos foram: o de trabalho, feito de ouro, obtido por deposição física a vapor; o eletrodo de referência de $\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl}(\text{sat})$, com solução saturada de KCl, externa e o contra eletrodo de platina. No preparo das soluções de HMGA captura, HMGA alvo, e HMGA sinalizadora e em todo o genoensaio foram utilizadas micropipetas de 10 μL , 20 μL , 200 μL e de 1000 μL (VWR – Ergonomic High-Performance). As amplificações por PCR foram realizadas em um ciclador térmico (GeneAmp PCR System 2700 Thermocycler (Applied Biosystems, Espanha).

4.3 - Metodologia

4.3.1 – Síntese de nanopartículas core@shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$)

As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ foram preparadas no Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto com a colaboração da Doutora Clara Pereira.

A Síntese de nanopartículas core@shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$) foi dividida em duas etapas, a síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), em seguida o revestimento destas com ouro, como descrito a seguir.

4.3.1.1 - Procedimento da síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas por decomposição térmica, segundo procedimento descrito na literatura (FREITAS et al., 2016).

Preparou-se uma solução de hexadecan-1-ol $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ em 35 mL de NMP. Depositou-se o peixinho dentro do balão com três bocas e colocou-se esta solução, sob agitação vigorosa, a uma temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$, e em atmosfera inerte (usou-se argônio), de modo a promover a homogeneização da solução. Em seguida a solução foi submetida ao processo de agitação por 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ até solubilizar o hexadecan-1-ol.

Usando-se seringas de 5 mL, adicionou-se, através de um sépto de borracha, e muito rápido, 3,7 mL de ácido oleico (10,5 mmol, Sigma Aldrich, 1L) à solução anterior, seguidos de 4,1 mL de oleilamina (10,5 mmol, 80-90%, Acros Organics, 100 mL).

Após a adição dos reagentes referidos anteriormente, aqueceu-se a solução resultante até uma temperatura de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (de forma gradual, primeiro de 20 em $20 \text{ }^\circ\text{C}$ até $150 \text{ }^\circ\text{C}$, depois de 10 em $10 \text{ }^\circ\text{C}$ até o termômetro marcar $200 \text{ }^\circ\text{C}$), sempre com agitação vigorosa e sob atmosfera inerte como apresentado na Figura 7:

Figura 7: Adição do ácido oleico e oleilamina à solução de hexadecan-1-ol $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ em 35 mL de NMP. (A) solução incolor.



Fonte: O autor.

Quando a mistura reacional atingiu a temperatura, então adicionou-se, com auxílio de uma seringa de 10 mL, uma solução de $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ em 10 mL de NMP e deixou-se o sistema em reação durante 1 h sob agitação vigorosa a essa temperatura de $200 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 8).

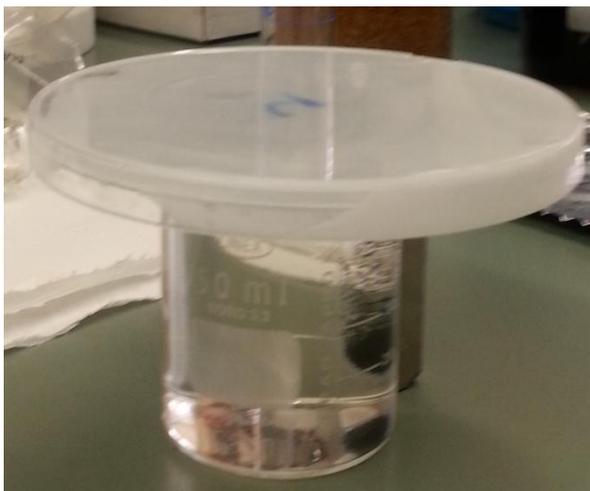
Figura 8: Reação com a solução $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ a $200 \text{ }^\circ\text{C}$. (B) solução acastanhada.



Fonte: O autor.

Após uma hora, esta solução adquiriu um cor acastanhada. Ao fim desse tempo, deixou-se a mistura reacional para resfriar até à temperatura ambiente, permanecendo sob agitação vigorosa a essa temperatura durante 16,5 h. Após esse tempo adicionou-se à mistura reacional 50 mL de etanol absoluto Fisher Chemical® (previamente purificado com argônio) para precipitar as nanopartículas formadas durante mais 30 min, sob agitação vigorosa e transferiu-se essa mistura para um béquer de 250 mL, em seguida procedeu-se à sua separação magnética. Como as NPs estavam estáveis no meio reacional o etanol que foi usado nas lavagens teve a função de desestabilizá-las e precipitá-las para remoção do excesso de surfactantes que por sua vez são solúveis em etanol. Transferiu-se as NPs para um béquer de 50 mL (Figura 9) e seguiu-se mais 3 lavagens intercaladas com separação magnética, com o objetivo de remover reagentes em excesso ou adsorvidos fisicamente na superfície das nanopartículas. Em todas as lavagens foram usados 50 mL de etanol (purificado com argônio).

Figura 9: Posição do imã na lateral do béquer de 50 mL, segunda lavagem.



Fonte: O autor.

Após a lavagem das nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , procedeu-se à sua dispersão final em 5 mL de tolueno anidro, medido com auxílio de uma seringa de 5 mL.

A amostra de magnetita sintetizada por decomposição térmica será designada por Fe_3O_4 . Duas frações de Fe_3O_4 foram sintetizadas, uma para posterior caracterização e outra para ser revestida com ouro.

4.3.1.2 – Revestimento das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com Au (1:7 ou 1:4)

O método utilizado no revestimento das nanopartículas de Fe_3O_4 foi realizado como descrito na literatura em (FREITAS et al., 2016). Duas frações de Fe_3O_4 foram revestidas com ouro para posterior caracterização e outra para aplicação como suporte na construção do genossensor para detecção do gene endógeno do milho HMGA.

Foram testadas duas frações da proporção $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ (1:4 e 1:7). Cada 1 mol de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ corresponde a 3 mols de Fe_3O_4 . Dessa forma, usando, por exemplo, a proporção 1:7 significa 1 mol de Fe_3O_4 para cada 7 mols de Au.

Mediu-se (usando seringa sem borracha de 2 mL) 1,25 mL de ferrofluido (Fe_3O_4 em tolueno) para um balão de fundo redondo com três bocas, ajustou-se o septo de borracha do lado direito, adicionaram-se 35 mL (ou 20 mL para NPs 1:4) de

tolueno anidro (99,8%, Sigma Aldrich) e colocou-se o sistema em agitação vigorosa sob atmosfera inerte (usou-se argônio) e em aquecimento gradual até atingir os 100°C (Figura 10). O aquecimento aconteceu com o sistema de resfriamento ligado ao condensador constantemente a 18 °C.

Figura 10: Sistema fechado em atmosfera inerte contendo o ferrofluido (Fe_3O_4) em tolueno. (C) sistema fechado com tampa de vidro rosqueada.



Fonte: O autor.

Em seguida, pesou-se em béquer de 50 mL, 0,34232 g (ou 0,1956 g para NPs 1:4) de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ aos quais foram adicionados 7,07 mL (ou 4,04 mL para NPs 1:4) de oleilamina (104 mmol, 80-90%) e 35 mL (ou 20 mL de para NPs 1:4) de tolueno anidro, medindo com uma proveta de 50 mL.

Quando a temperatura do ferrofluido diluído estabilizou em 100 °C, adicionou-se, usando uma seringa de vidro com capacidade para 50 mL, a solução contendo o $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, a oleilamina e o tolueno anidro gota-a-gota (5mL/min), durante 35

minutos (ou 20 min para NPs 1:4). Deixou-se o sistema em reação durante 1h a essa temperatura com agitação vigorosa (Figura 11). Após esse tempo, retirou-se o banho e a mistura reacional foi colocada em arrefecimento durante cerca de 15 min, com um soprador de ar frio.

Figura 11: Adição da solução contendo o $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, a oleilamina e o tolueno anidro.



Fonte: O autor.

Para precipitar as nanopartículas revestidas com ouro, adicionaram-se 85 mL (ou 50 mL para NPs 1:4) de etanol ao meio reacional e deixou-se o sistema em agitação vigorosa durante 10 min antes de se proceder à separação magnética do nanomaterial sob ação de um ímã.

Por último, efetuaram-se quatro ciclos sucessivos de lavagem das nanopartículas, com 40 mL de etanol, sob agitação manual, por 10 min, alternados com separação magnética (durante 15 min). Por último, o nanomaterial resultante foi disperso em 10 mL de tolueno anidro onde verificou-se que as partículas de Fe_3O_4 revestidas com ouro apresentaram uma cor vermelho amora, prova visual da presença de ouro.

A nomenclatura usada para designar as nanopartículas de Fe_3O_4 revestidas com ouro foi de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$.

Também foi realizada a síntese de nanopartículas de ouro não magnéticas, com o objetivo de permitir a comparação entre as propriedades físico-químicas das nanopartículas de Fe_3O_4 e das nanopartículas revestidas com ouro $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$. O procedimento utilizado foi idêntico ao descrito anteriormente para o revestimento das nanopartículas de Fe_3O_4 , com pormenor de não se ter adicionado à mistura reacional o ferrofluido. As nanopartículas de ouro serão designadas por Au.

4.3.2 – Preparo do substrato de Au e montagem do eletrodo

O substrato de ouro foi confeccionado, no Laboratório de Síntese do departamento de Física da UFPI com colaboração do Dr. Helder Nunes da Cunha, à partir da deposição de um filme fino de ouro numa folha de poliéster (transparência de retroprojeção) pelo processo de sputtering em uma câmara de vácuo Edwards 306 a 10^{-6} torr e corrente de evaporação em torno de 6,0 A, segundo procedimento descrito em Melo (2016). Uma massa de aproximadamente 0,1 g de Au (99,99% de pureza) empregada, resultou na cobertura da folha de poliéster por um filme homogêneo de espessura aproximada de 100 nM que foi cortado em pequenos pedaços de cerca de 5 x 7 mm. Utilizando uma base de acrílico como molde de reprodução, uma fita de cobre foi usada para contato elétrico com o Au e a área eletroquímica foi definida por uma fita adesiva de polietileno. Os eletrodos caseiros têm um custo estimado de R\$ 1,00 por unidade.

O esquema de montagem do eletrodo base produzido manualmente está representado na Figura 12:

Figura 12: Procedimento manual de montagem do eletrodo base.



Fonte: O autor.

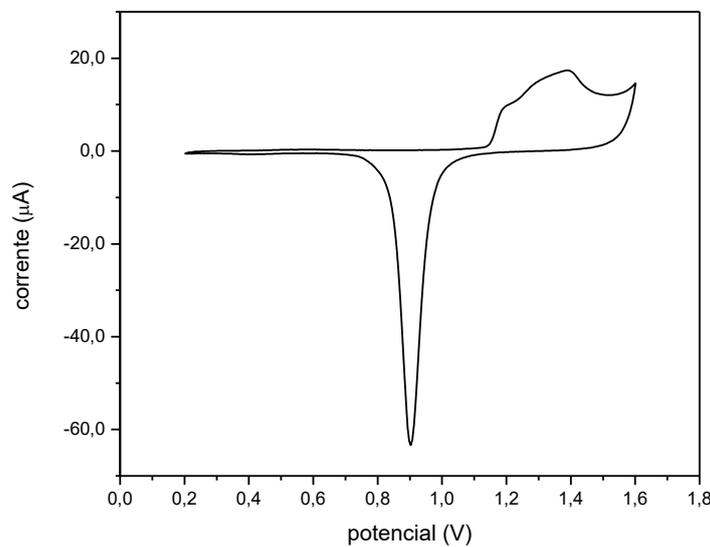
Utilizando como molde de reprodução uma base de acrílico, uma fita adesiva plástica de 3 x 1,5 mm com um furo de diâmetro 2 mm foi colocada com a parte adesiva voltada para cima, em seguida foi fixado em torno desse furo um pedaço de folha de ouro 5 x 7 mm com a extremidade de ouro depositado voltada para baixo definindo assim a superfície do eletrodo base (0,0314 cm² de área geométrica). O contato elétrico foi feito com uma fita de cobre adesiva de 4 cm x 5 mm que foi fixada nesse pequeno pedaço de folha de ouro. Em seguida, uma fita adesiva sem furo é colocada em cima para vedar a parte metálica e por último outra fita adesiva com diâmetro de 8 mm foi disposta em cima da fita com o furo de diâmetro 2mm anteriormente fixada. As laterais foram pressionadas para proteger o eletrodo de infiltrações quando colocado em contato com a solução de limpeza.

4.3.3 - Condicionamento dos eletrodos

A limpeza e condicionamento da superfície de ouro foi realizada eletroquimicamente com ciclagens sucessivas de potencial em pH ácido (taxa de varredura 0,1 V/s; em H₂SO₄ 0,5 mol.L⁻¹) no intervalo de potencial entre 0,2 e 1,6 V versus Ag/AgCl, até que fosse obtido um voltamograma redox estável típico de ouro policristalino (Figura 13). Em seguida, o eletrodo foi lavado com água ultra pura,

seco com N_2 e imediatamente modificado com a fase sensora (BARROSO et al., 2015).

Figura 13: Voltamograma Cíclico do eletrodo de ouro policristalino em H_2SO_4 0,5 mol.L⁻¹ no intervalo de potencial de 0,2 até 1,6 V vs. Ag/AgCl e velocidade de varredura 100 mV.s⁻¹.



Fonte: O autor.

A área de superfície eletroquímica de cada eletrodo foi calculada a partir da carga associada ao pico de redução de óxidos de Au obtido após o processo de limpeza, assumindo que a redução da monocamada de óxido de Au requer 386 mC cm² (BARD e FAULKNER, 2001).

4.3.4 - Funcionalização das nanopartículas Fe₃O₄@Au com SAM

As nanopartículas magnéticas Fe₃O₄@Au foram funcionalizadas com uma monocamada automontada (SAM) binária composta pela mistura de (SAM: MCH e MCHAc), sendo MCH (6-mercaptohexan-1-ol) e MCHAc (ácido 6-mercaptohexanóico). Esta SAM contém grupos tiol numa extremidade que se ligarão ao ouro do revestimento e ácidos carboxílicos na extremidade oposta que estabelecerão ligações com os grupos amina do DNA. O nanomaterial foi lavado com etanol para precipitação das NPMs, de modo a remover qualquer resíduo de tolueno presente segundo procedimento descrito em Freitas et al. (2016). No final

as NPMs foram dispersas em etanol para posterior funcionalização da superfície do nanomaterial Fe₃O₄@Au com SAM (Fe₃O₄@Au-SAM), adicionando-lhe uma solução etanólica de SAM: MCH e MCHAc (a 0,1 mol.L⁻¹ na proporção 6:1). Deixou-se o meio reacional sob agitação, à temperatura ambiente e devidamente protegido da luz, durante aproximadamente 24h. Em seguida procedeu-se a lavagem do nanomaterial Fe₃O₄@Au-SAM com etanol e posterior dispersão em solução tampão de (HEPES 0,1 mol.L⁻¹, NaCl 0,5 mol.L⁻¹ e pH 7,4). O sensor de DNA pode interagir melhor com valores de pH neutros na solução de DNA (THUY et al., 2013).

4.3.5 - Extração de DNA de milho e amplificação por PCR

O DNA foi extraído de amostras de farinha transgênica certificada do evento MON810 10% (p/p), utilizando-se o Kit Nucleospin® (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha) para DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante. Obtidos pelo Instituto de Materiais e Medições de Referência (IRMM) na Bélgica, através da Sigma-Aldrich®.

A quantidade e a pureza de DNA extraídas foram determinadas por espectrofotometria UV. A PCR convencional foi realizada para o controle da qualidade do DNA utilizando um par de iniciadores vegetal-universal concebido sobre o gene *rbcL* do cloroplasto. A amplificação do gene endógeno foi realizada em 25 µL de volume total contendo 5 µL de extrato de DNA, 1,25 U de DNA polimerase Immolase™ (Ecogen, Espanha), 1 x tampão, 200 µmol.L⁻¹ de cada dNTP, 6,5 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 0,3 mmol.L⁻¹ de cada iniciador cuja sequência de oligonucleotídeos foi apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores.

Função	Oligonucleotídeos 5' → 3'
Iniciador Direto (F) (23 nt)	5'-TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA-3'
Iniciador Reverso (R) (22 nt)	5'-GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T-3'

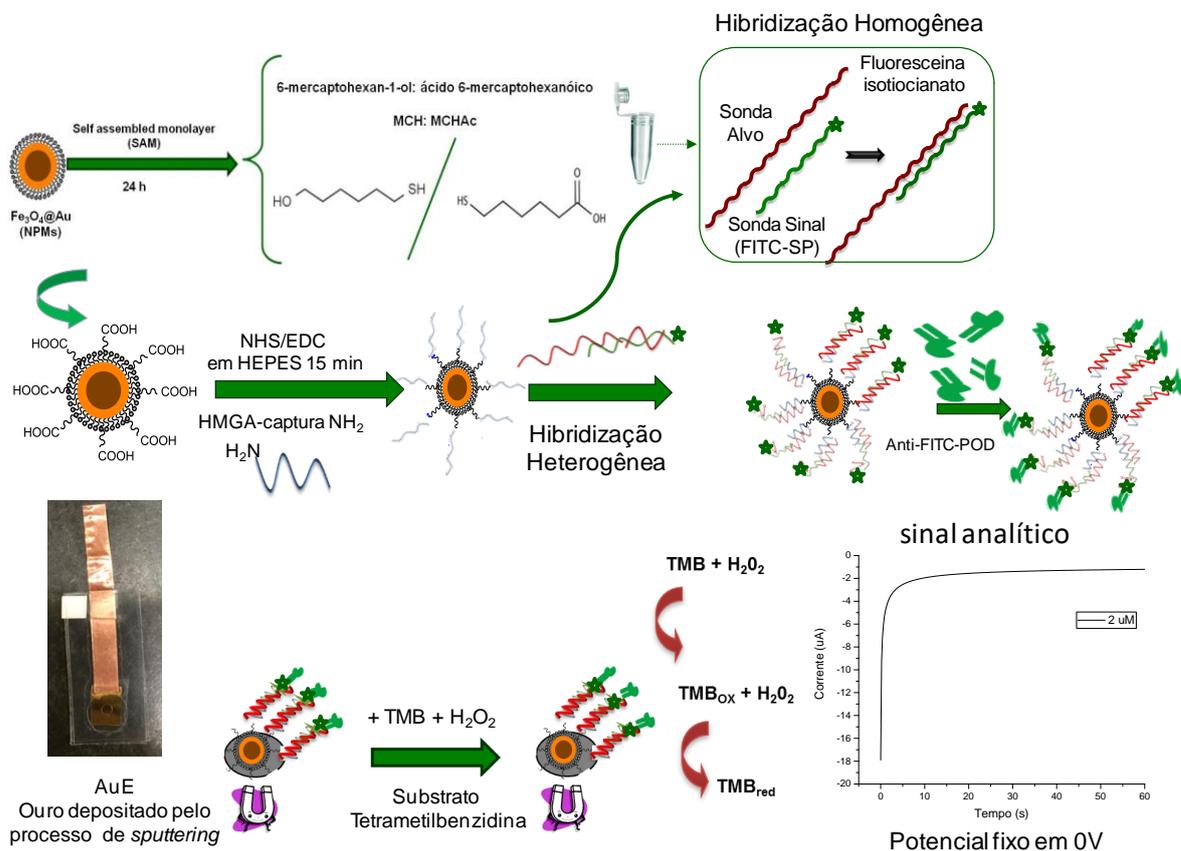
O protocolo de amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, 45 ciclos a 95 °C por 15 s, 60 °C por 60 s e 72 °C por 30 s, com extensão final a 72 °C por 5 min. Em ambos os tipos de amplificações, houve sucesso da amplificação. A reação foi verificada por eletroforese (tampão de rotação 1 × TBE) em gel de agarose a 2% (p/v) e coloração com brometo de etídio (0,5 µg / mL) a 80 V.

4.3.6 - Procedimento do genoensaio em formato *sanduíche*

A construção do genoensaio e as medições de cronoamperometria foram realizadas no Grupo de Reações e Análises Químicas (GRAQ), Instituto superior de Engenharia do Porto com colaboração da Doutora Maria Fátima Barroso.

Tanto os oligonucleotídeos sintéticos do gene endógeno (HMGA) do milho como os produtos de PCR amplificados foram analisados por um formato de hibridização em *sanduíche*, cujas etapas aparecem representadas na Figura 14 e incluem as etapas de ativação dos grupos carboxílicos utilizando solução de EDC/NHS; imobilização da sonda de captura nas nanopartículas Fe₃O₄@Au-SAM; hibridização homogênea na qual ocorre a formação do dúplex entre sonda alvo e sonda indicadora; a hibridização heterogênea onde ocorre a formação do dúplex ternário que é configurado pelo acoplamento do dúplex formado na hibridização homogênea com a sonda de captura na superfície do eletrodo de ouro (AuE) pré tratado e condicionado; e para concluir a marcação enzimática onde tem-se o acoplamento da enzima anti-fluoresceína – POD à fase sensora do eletrodo que é medido eletroquimicamente para determinação da concentração do analito, pois a quantidade de POD no eletrodo é diretamente proporcional à quantidade de alvo efetivamente hibridizada na superfície.

Figura 14: Esquema das etapas do procedimento do genoensaio para detecção do DNA alvo do HMGA do milho.



Fonte: O autor.

Entre cada uma das etapas da Figura 14, realizaram-se lavagens do nanomaterial com os tampões: (i) (SSPE-T: 2X SSPE, 0,01% de Tween 20), (ii) HEPES-T (0,1 mol.L⁻¹ HEPES, 0,01% Tween 20), (iii) HEPES (0,1 mol.L⁻¹, NaCl 0,5 mol.L⁻¹, pH 7,4) e PBS-C (1x PBS solution contendo 1% caseína), de forma a eliminar qualquer fragmento biológico que não estivesse ligado à SAM existente na superfície das NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$. Todo o processo aconteceu em tubos *ependorfs* à temperatura ambiente e protegidos da luz, sob agitação delicada da mistura para permitir um bom contato entre a solução e as nanopartículas magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -SAM. Após cada passo, o sobrenadante foi facilmente removido por aprisionamento das NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -SAM com um ímã. Todos os passos de genoensaio foram realizados à temperatura ambiente, exceto na hibridização homogênea.

A construção do genoensaio iniciou-se com a desprotonação dos grupos carboxílicos presentes na extremidade da SAM através da adição das nanopartículas Fe₃O₄@Au-SAM numa solução de EDC 12,8%(m/m) e NHS 87,2% (m/m) em 500 µL de HEPES e posterior agitação durante 15 min. Após adição da solução EDC/NHS, este procedimento foi realizado com e sem a lavagem com HEPES-T, com o intuito de avaliar o efeito da lavagem nas reações de condensação entre os grupos amina presentes na extremidade do DNA e os grupos carboxílicos presentes na SAM.

Em seguida, adicionou-se às nanopartículas Fe₃O₄@Au-SAM, 500 µL de DNA NH₂-captura 1 µmol.L⁻¹ preparado em HEPES, a concentração de 0,1 mmol.L⁻¹ foi selecionada como a concentração ótima pois estudos anteriores descritos em (BARROSO, 2015) mostraram que a hibridização pode ser dificultada com concentrações mais elevadas devido à elevada densidade de sondas na superfície portanto o espaçamento adequado das sondas de ss-DNA proporciona maior acessibilidade e promove a captura de alvo, melhorando muito o desempenho do genossensor (BIN, 2010), de modo a promover reações de condensação entre os grupos amina presentes na extremidade do DNA e os grupos carboxílicos presentes na SAM. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de uma solução de etanolamina 1 mol.L⁻¹ em HEPES, que permitiu a estabilização das nanopartículas Fe₃O₄@Au-SAM modificadas em seguida lavou-se com 500 µL HEPES-T e 500 µL SSPE-T.

Paralelamente a este procedimento, realizou-se em eppendorfs a hibridização homogênea na qual ocorre a formação do dúplex entre sonda de DNA alvo (Target ou analito) e o DNA marcado (sonda de sinalização) na presença ou ausência de BSA (um bloqueante); a sonda de sinalização encontra-se marcada numa das extremidades com fluoresceína. Nesta etapa, em cada eppendorf, usaram-se diferentes concentrações de DNA alvo sintético (0,0 a 10,0 nmol.L⁻¹) e produtos de PCR amplificados e diluídos em tampão SSPE 2x contendo 0,3 µmol.L⁻¹ de sonda de sinalização FITC (FITC-SP) para a construção da curva de calibração.

Para minimizar a estrutura secundária não intencional do DNA alvo, a hibridização homogênea foi realizada a 98 °C durante 5 min, em seguida o reanelamento da cadeia foi retardado por resfriamento da amostra num banho de água gelada por mais 5 min e o restante da hibridização em temperatura ambiente por mais 20 min, totalizando 30 min de hibridização homogênea (BARROSO et al,

2015). Em seguida, iniciou-se a hibridização heterogênea, adicionando a cada *ependorf* 50 μL da dispersão contendo as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au\text{-SAM}$ já modificadas com o DNA NH_2 -captura.

A conclusão do genoensaio acontece com a imobilização covalente do Anti-FIT-POD (conjugado) à fluoresceína existente na extremidade do DNA de sinalização. Para tal, a cada *ependorf* adicionaram-se 500 μL do conjugado diluído em caseína numa proporção de 1:300 (V/V) e o sistema foi deixado em reação por 30 minutos, em seguida lavados com 500 μL de caseína e 500 μL de SSPE-T e, por último, deixou-se as NPM em tampão SSPE2X, sob agitação por 2 min.

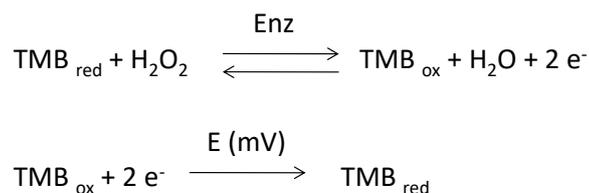
4.3.6.1 - Monitoramento da reação de hibridização por cronoamperometria

Para realizar as medidas cronoamperométricas, é adicionado, em cada eletrodo, sequencialmente, 15 μL de dsDNA/NPMs, removeu-se o líquido e adicionou-se 50 μL de uma solução reagente do composto 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina ($\text{TMB}+\text{H}_2\text{O}_2$) cobrindo toda a área delimitada por 4 mm de diâmetro, onde este substrato é oxidado pelo fragmento Fab anti-FIT-peroxidase e reduzido pelo eletrodo de trabalho.

Este ciclo redox resulta em uma troca de elétrons entre o substrato do eletrodo para o anti-FIT-peroxidase, produzindo fluxo de corrente no eletrodo e permitindo medições cronoamperométricas da atividade enzimática da sonda de captura imobilizada nas nanopartículas (dsDNA/NPMs) dispostas no eletrodo de trabalho com auxílio de um ímã (HALFORD et al., 2013).

O sinal analítico é a intensidade de corrente elétrica gerada pela redução do produto da reação enzimática entre a enzima peroxidase conjugada com um fragmento do anticorpo antifluoresceína utilizando-se como substrato enzimático o 3,3',5,5' tetrametilbezidina (TMB), que na presença de H_2O_2 e da enzima como catalisador se oxida, levando à dupla desprotonação do TMB e à produção de água, liberando dois elétrons (Reação 1):

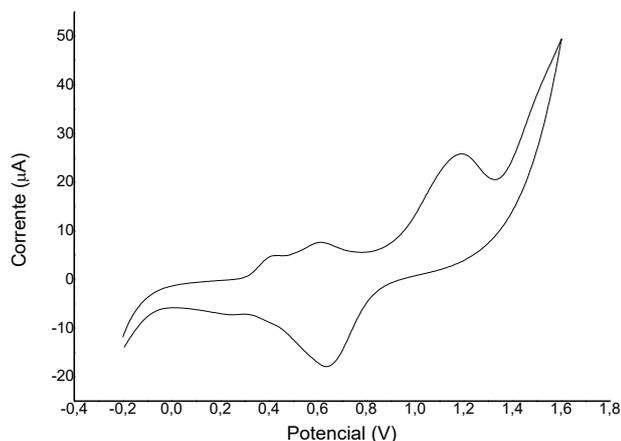
Reação 1: Reação na superfície do genossensor.



Fonte: (MELO, 2016).

Após 30 s de reação, as medições cronoamperométricas foram realizadas aplicando-se o potencial fixado em 0 V, durante 60 segundos, pois segundo o voltamograma cíclico característico de TMB na presença de H₂O₂ sobre a fase sensora (Figura 15), todo o substrato TMB oxidado enzimaticamente se reduzirá completamente neste potencial, e o valor do sinal analítico é a média do sinal dos últimos 10 segundos, posto que o sinal nesse ponto está estabilizado.

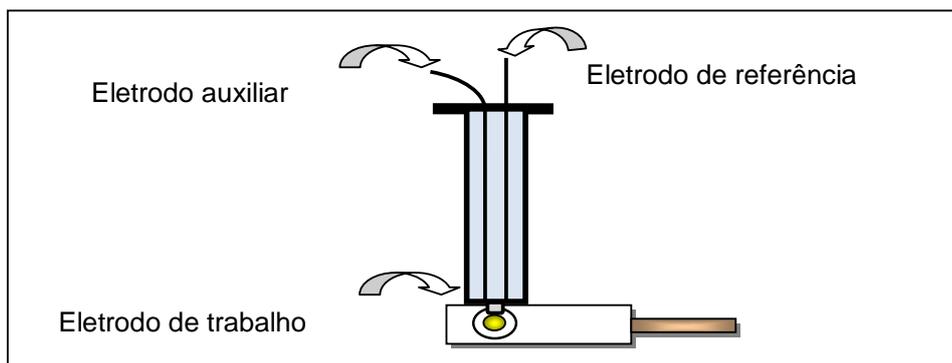
Figura 15: Voltamograma do TMB sobre a fase sensora.



Fonte: O autor.

A reação do TMB (previamente oxidado pela peroxidase) foi monitorada utilizando um eletrodo misto “*made in home*” (Figura 16) composto de dois eletrodos interligados (o eletrodo de referência de Ag|AgCl|KCl(sat), com solução saturada de KCl, externa e o contra eletrodo de platina), posicionado a 90° e exatamente em cima da área ativa do eletrodo, tocando a solução de (TMB+H₂O₂) para que a reação fosse avaliada na horizontal, assim como ocorre quando se usa um eletrodo impresso descartável convencional.

Figura 16: Esquema de disposição dos 3 eletrodos usados para a obtenção das medidas cronoamperométricas.



Fonte: o autor.

Os cronoamperogramas obtidos por esta técnica são gráficos que representam a intensidade de corrente obtida na reação de redução do TMB em função do tempo. A intensidade de corrente correspondente à redução do TMB será tanto maior em valor absoluto, quanto maior a quantidade de TMB reduzida. Conseqüentemente, a quantidade de TMB reduzida é proporcional à concentração de DNA alvo, isto é, quanto maior a concentração de analito (DNA alvo), maior a quantidade de enzima peroxidase que se encontra imobilizada no DNA, logo maior a quantidade de TBM oxidado, o que produz em módulo, maiores valores de intensidade de corrente de redução do TMB que foi oxidado pela enzima peroxidase.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Seleção de sondas de DNA para o genoensaio em formato *sanduíche*

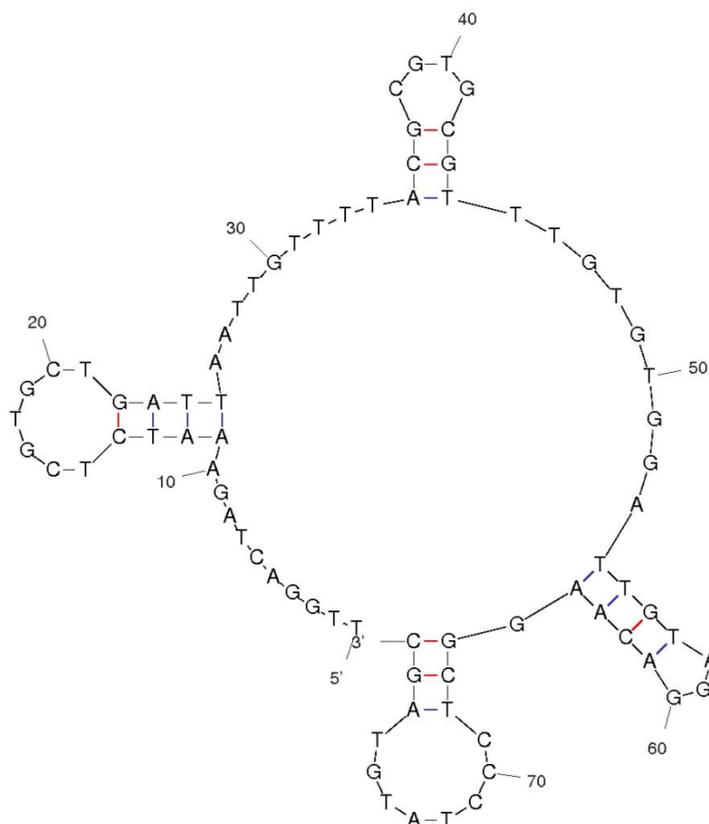
O processo de montagem de um genoensaio começa com a escolha de ácidos nucleicos que serão utilizados como dupla fita. Esta sequência deve ser específica do organismo que se quer detectar. É buscada uma sequência de DNA que não tenha em outro ser vivo e que, portanto, não possa interferir na análise (HLONGWANE et al., 2019; MELO, 2016).

A análise quantitativa de qualquer milho geneticamente modificado (GM) requer a estimativa da quantidade do evento transgênico em relação a um gene endógeno. Ou seja é uma quantificação relativa que serve como controle positivo para a presença de DNA de milho GM. Nesse trabalho, selecionou-se uma sequência com 79 pb ($\Delta G = - 5,95 \text{ kcal mol}^{-1}$) dentro de uma sequência do gene endógeno do milho HMGA por este ser totalmente específico, altamente sensível e, portanto, considerado adequado para utilização como gene de referência em análise de DNA de culturas de milho desconhecidas com objetivos de detecção, identificação e quantificação (HERNÁNDEZ et al., 2004).

Para comprovar a especificidade, introduz-se esta sequência no programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) e se compara com sua base de dados que contém sequências de genomas de todos os seres vivos. Para que o design do genossensor tenha êxito, a sequência alvo de DNA deve formar um híbrido estável com as sequências de captura e sinalizadora. De acordo com BARROSO et al., (2015), uma elevada energia de Gibbs pode resultar numa hibridização de superfície impedida, ou seja, não específica. Portanto, a tendência da sequência selecionada para formar estruturas secundárias internas deve ser destruída durante o processo de hibridização, selecionando-se estruturas com menor energia de Gibbs. As sondas de captura e sinalização também foram projetadas para minimizar estruturas secundárias enquanto formam uma estrutura duplex perfeita após a hibridização na superfície do eletrodo evitando regiões marginais que são prejudiciais para o desempenho analítico. A sequência de captura se imobiliza sobre a superfície do transdutor; e a sonda de sinalização funciona como sequência indicadora.

Empregando o programa MFold, obteve-se as estruturas mais estáveis em condições determinadas de temperatura e força iônica: 25 °C e a 0,298 mol.L⁻¹ de NaCl (Figura 17).

Figura 17: Estrutura mais estável da sonda alvo com 79 pb a 25 °C e [Na⁺] = 0,298 mol.L⁻¹ obtida à partir do servidor MFold



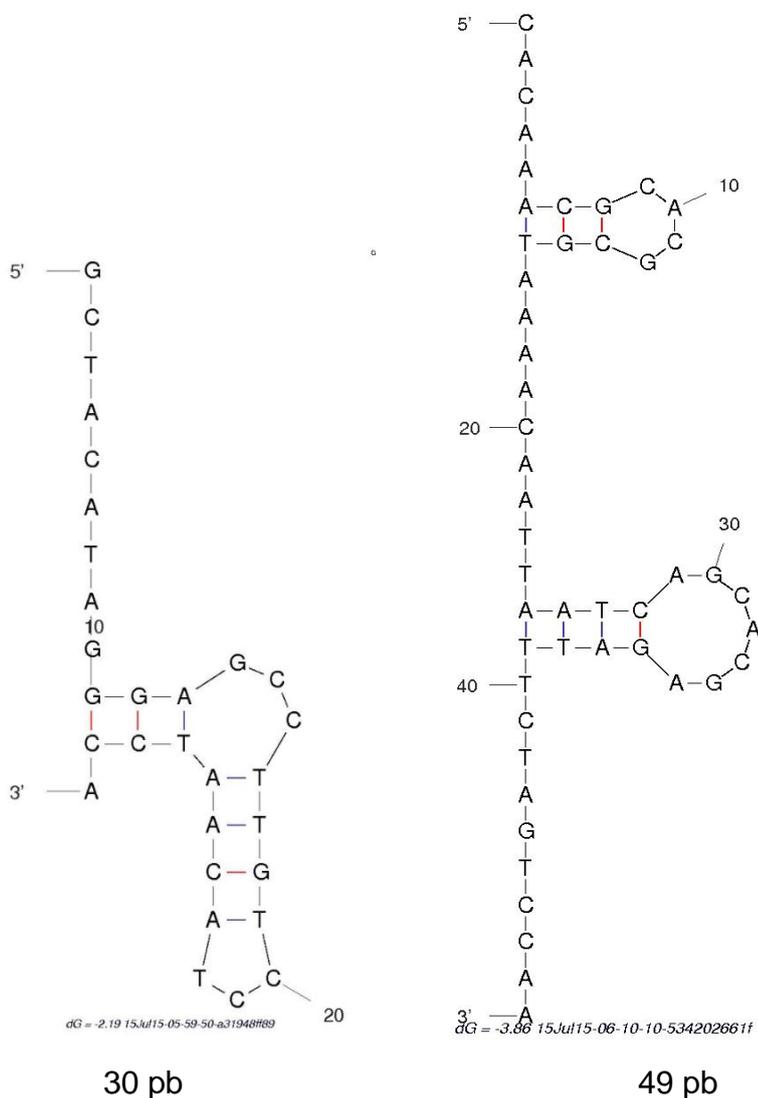
dG = -5.95 15.Jul15-06-14-32-b49b896f1

Fonte: (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

Com o programa MFold observou-se também distintas combinações de sonda de captura e sequência indicadora. Deve-se levar em conta as estruturas secundárias de todas as sequências desfavoráveis em relação à reação de hibridização com a sequência de fita dupla de DNA. Portanto, buscam-se as sequências com menor estrutura secundária que permita hibridizar com uma barreira energética o menor possível. As estruturas mais estáveis em condições determinadas de temperatura e força iônica: 25 °C e a 0,298 mol.L⁻¹ de NaCl foram: uma sonda de captura com 30 nt ($\Delta G = -2,19 \text{ mol}^{-1}$) e sonda de sinalização de 49

nt ($\Delta G = - 3,86 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Figura 18). Isso garante uma hibridização superficial facilitada. As sequências estão apresentadas na Tabela 1.

Figura 18: Estruturas complementares: Sonda de captura e indicadora a 25 °C e 0,298 mol.L⁻¹ de [Na⁺] utilizando o servidor Mfold Web.



Fonte: (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>).

5.2 - Caracterização das NPM (Fe₃O₄@Au)

Neste estudo, nanopartículas magnéticas (NPM) revestidas com ouro Fe₃O₄@Au foram usadas como nanoplataforma para imobilização de sondas simples de DNA do gene endógeno do milho. Posteriormente, as Fe₃O₄@Au

modificadas com DNA foram utilizadas para construir um genoensaio (baseado na detecção da reação de hibridização entre duas cadeias complementares de DNA) para identificar o gene endógeno do milho (HMGA). As nanopartículas de ouro (AuNP) são amplamente utilizadas na imobilização da sonda de DNA devido às suas características únicas, tais como capacidade de adsorção forte, alta biocompatibilidade e grande área superficial (XU et al., 2009).

As Nanopartículas magnéticas (NPM) Fe_3O_4 foram sintetizadas por decomposição térmica do complexo metálico Acetilacetato de Ferro (III) [$\text{Fe}(\text{acac})$], em solventes orgânicos (com alto ponto de ebulição) na presença dos surfactantes ácido oléico e oleilamina. Este método foi escolhido porque produz materiais com qualidades importantes para a realização do genoensaio aqui proposto, tais como: produção de partículas uniformes, com alto grau de cristalinidade, controle de tamanho e forma, e boa dispersão sobre substratos e em solução (EFFENBERGER, 2012).

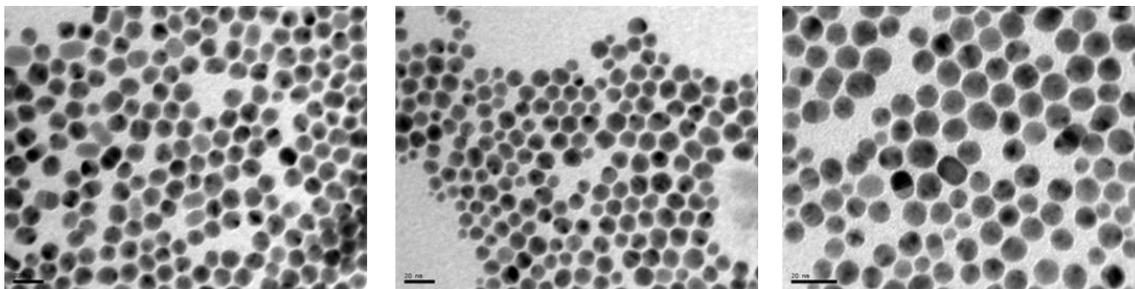
Após a síntese das NPM foi efetuado o revestimento com Au por decomposição lenta de um sal de ouro (III) na superfície dos núcleos Fe_3O_4 e subsequente redução de Au (III) a Au (0) induzida por oleilamina, sob condições de temperatura controlada segundo protocolo realizado em Freitas et al. (2016). Neste processo a oleilamina funcionou como agente redutor e estabilizador das NPs magnéticas $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ resultantes. Duas proporções molares de Fe_3O_4 e ouro foram testadas no processo de revestimento $\text{Fe}_3\text{O}_4: \text{HAuCl}_3$ (1:4 e 1:7) de modo a estudar qual destas proporções é mais eficaz na imobilização do DNA. Pois, quanto maior a área de superfície, maior será a quantidade de DNA imobilizado, e, além disso, o DNA em contato com as NPMs pode manter a sua atividade biológica (XU et al., 2009).

As NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ utilizadas neste estudo foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) para obtenção de informações sobre a morfologia e distribuição de tamanho e por espectroscopia de UV-vis para verificar a presença de ouro na superfície das NPs, bem como para a determinação do comprimento de onda de absorção das NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$.

Na Figura 19 são mostradas as imagens obtidas por TEM das NPs $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$. Segundo estas imagens as NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ apresentam-se esféricas, uniformes e bem definidas, no tamanho de cerca de 10 nm de diâmetro,

ausência de agregados, além disso, não são detectados núcleos de óxido de ferro livres, indicando revestimento completo dos núcleos Fe_3O_4 .

Figura 19: Imagens de TEM das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (1:7) no tamanho de cerca de 10 nm de diâmetro.

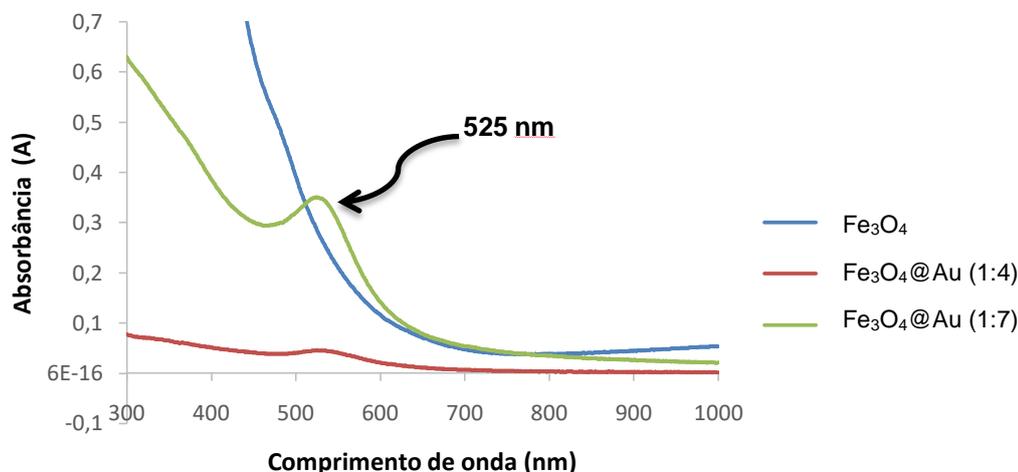


Fonte: A autora.

Como complemento aos resultados de TEM, a espectroscopia de UV-vis foi utilizada como técnica quantitativa para verificar a presença de ouro na superfície das NPM de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ nas proporções 1:4 e 1:7 comparativamente às nanopartículas de Fe_3O_4 , dispersos em tolueno.

De acordo com a Figura 20, verifica-se o aparecimento de uma banda de ressonância plasmônica de superfície (SPR) criada pela oscilação de elétrons estimulados pela luz em 525 nm. Este resultado comprova a presença de ouro, pois segundo a literatura o comprimento da banda plasmônica de superfície varia de 517 a 575 nm de acordo com a forma e o tamanho das AuNPs de ouro (SAPSFORD et al., 2013). Além disso, como esperado, o espectro da dispersão de Fe_3O_4 não apresentou qualquer banda SPR.

Figura 20: Espectros de UV-Vis das nanopartículas de Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (1:4) e $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ (1:7), dispersas em tolueno, com concentrações arbitrárias.



Fonte: A autora.

Segundo estudos publicados na literatura (BOISSELIER e ASTRUC, 2009; LATA et al., 2015; HOMBERGER e SIMON, 2010), a existência de agregados na dispersão coloidal resultaria na existência da coloração azul, contudo isto não acontece na amostra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ obtida pois esta apresentou coloração vermelha intensa comprovando os resultados obtidos com a TEM.

Resultados não publicados permitem atestar que as NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ na proporção 1:4 também poderiam ser utilizadas neste trabalho numa situação de economia de material, contudo, pela facilidade de recobrimento em função da maior proporção de ouro nas NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ 1:7, estas foram escolhidas para serem usadas no procedimento de análise. Resultados utilizando NPM 1:4 podem ser verificados em (FREITAS et al., 2016) para aplicação utilizando um fragmento específico da construção transgênica do milho MON810.

5.3 - Determinação da área eletroativa do substrato de Au no eletrodo de trabalho

A escolha do eletrodo de trabalho (ou substrato), cuja superfície sofre modificações, é também uma etapa importante para o desenvolvimento de biossensores (HE e TOH, 2006). Neste trabalho utilizaram-se eletrodos de ouro

(AuE) fabricados a partir da deposição de um filme fino de ouro numa folha de poliéster.

Durante a construção do eletrodo é necessária a determinação da área eletroquímica da superfície do substrato de ouro, também chamada de área eletroativa, que à princípio terá um valor superior à sua área geométrica ($0,0314 \text{ cm}^2$, calculada de acordo com o diâmetro definido como 2 mm de área superficial; $A = \pi r^2$) pois leva em consideração a área de redução da monocamada de ouro depositada na superfície da folha de poliéster e é calculada através da obtenção da carga associada com o pico de redução do óxido de ouro adsorvido em H_2SO_4 $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ após o processo de limpeza dos eletrodos, assumindo que a redução da monocamada de óxido de ouro requer 386 uC cm^{-2} (BARD e FAULKNER, 2001). Assim, pôde-se escolher os eletrodos com área eletroativa mais próxima, reduzindo assim os erros de dispersão para comparação entre resultados de mesma concentração. A área efetiva média foi de $0,171 \text{ cm}^2 \pm 0,017$ ($n=31$). Os eletrodos de trabalho preparados com este procedimento manual possuem boas características analíticas e sua fabricação é de baixo custo (R\$ 1,00 por unidade), pois um grande número de eletrodos ($\cong 1.000$) pôde ser preparado simultaneamente a partir de uma única membrana.

Um eletrodo semelhante encontrado na literatura, utiliza uma camada superficial de tinta de carbono pré-tratada com KCl, as nanopartículas depositadas na superfície do eletrodo estão diluídas em KCl, e o suporte a ser utilizado poderia ser de PVC ou cerâmica de alumina, contudo, não foi possível comparação, pois não apresenta resultados de sensibilidade e reprodutibilidade (EMBRAPA, 2015).

5.4 - Otimização das condições experimentais do genoensaio

5.4.1 - Uso da SAM: MCH e MCHAc e influência do BSA como agente de bloqueio

Um dos passos mais críticos ao preparar um biossensor baseado no DNA é a etapa de imobilização de uma sonda simples de DNA (ssDNA) na superfície de um dispositivo de detecção, como exemplo um eletrodo. A quantidade de sonda de DNA imobilizada irá influenciar diretamente a precisão, sensibilidade, seletividade e vida

de um biossensor de DNA. Neste trabalho, sondas simples de DNA de captura foram ancoradas na superfície de NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (na proporção 1:7) que por sua vez estão integradas magneticamente na superfície do eletrodo de trabalho para serem utilizadas como nanoplataforma para o desenvolvimento do genoensaio eletroquímico. Contudo, antes da imobilização da sonda de DNA do gene endógeno HGMA do milho e da detecção da hibridização do DNA alvo, a superfície das nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ foi modificada com uma monocamada automontada (SAM) carboxilada binária composta pela mistura de (SAM: MCH e MCHAc), dispersas em etanol ambas a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ na proporção 6:1. A SAM é adicionada às NPMs, com a função de proporcionar maior estabilidade ao biossensor, à medida que evita a necessidade de remover o material biológico do meio de reação para posterior aplicação, reduzindo assim o custo por análise, aumentando a rapidez do processo.

A molécula de albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína amplamente utilizada como agente de bloqueio de superfícies em estudos de biossensores de DNA com estrutura em formato *sanduíche* devido à sua elevada eficiência, rentabilidade e biocompatibilidade (BRORSON, 1997; PEI et al., 2014), sendo então selecionada para a otimização deste estudo, portanto, realizou-se um genoensaio utilizando o BSA como auxiliar na hibridização homogênea.

Testes prévios foram realizados com o uso da SAM: MCH e MCHAc (6:1), na presença ou ausência de BSA, antes da construção da curva de calibração, como pode ser observado na Tabela 3:

Tabela 3: Otimização do Genoensaio com e sem BSA, realizado utilizando SAM: MCH e MCHAc (6:1)

BSA	Sonda de Captura		I (nA)	Sinal subtraído do branco (nA)
Com BSA	1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Branco	176	304
		Sonda alvo 5 nmol.L^{-1}	480	
Sem BSA	1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$	Branco	599	520
		Sonda alvo 5 nmol.L^{-1}	1119	

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostraram que a SAM pode ser usada no genoensaio, pois apresentou um sinal de intensidade de corrente muito mais alta comparada à intensidade do branco comprovando assim que o protocolo de genoensaio para detecção do HGMA funcionou.

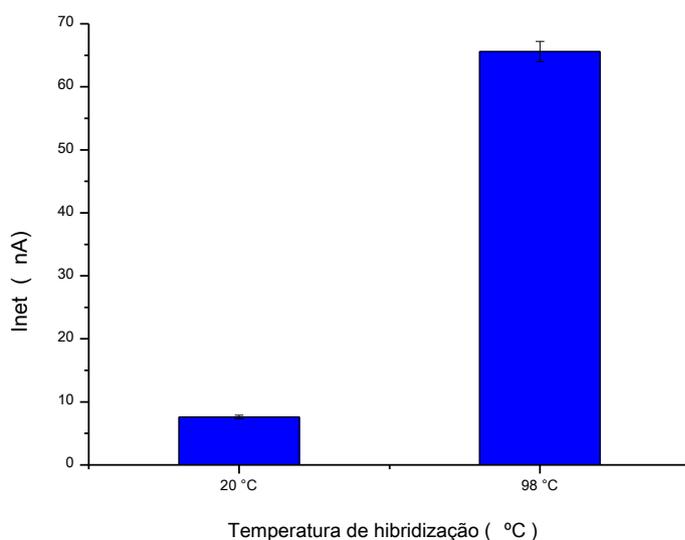
A BSA possui partes hidrofóbicas e hidrofílicas na sua superfície (BROWN, 1975), por isso pode ser usado para prevenir interações não-específicas sobre a superfície do sensor de DNA, após o processo de imobilização em diversas aplicações na produção de sensores de DNA (THUY et al., 2013; LEE et al., 2015). Neste estudo, contudo, como pode ser observado através dos dados apresentados na Tabela 3, verificou-se que a adição de BSA diminuiu o sinal analítico de intensidade do branco, mas também o da sonda alvo, dessa forma, o valor de corrente subtraída do branco (I_{net}) apresentou menor resultado quando comparado ao sinal de corrente (I_{net}) quando se retirou o BSA. Portanto, escolheu-se retirar o BSA do protocolo de análise, pois este procedimento não afetou a reprodutibilidade das medições.

5.4.2 - Eficiência da hibridização do DNA relacionada com a temperatura

A eficiência do genoensaio depende da hibridização do DNA que por sua vez está intimamente relacionada com a temperatura. Altas temperaturas (próximas de 95 °C) levam a desnaturação da molécula de DNA, desfazendo as pontes de hidrogênio existentes entre as bases nitrogenadas e separando as duas fitas-

simples complementares, permitindo o pareamento com o DNA marcado (COSTA e COSTA, 2009). Portanto, para averiguação do efeito da temperatura no processo de desnaturação, foram realizados genosaios à temperatura ambiente (20 °C) e a 98 °C em concentração constante (2 nmol.L⁻¹) de DNA alvo, realizados em duplicata e dias distintos (Figura 21):

Figura 21: Representação gráfica da intensidade de corrente média nos últimos 10 s de varredura subtraída do branco em função da concentração de DNA alvo do HMGA na concentração 2,0 nmol.L⁻¹, obtidos em triplicata.



Fonte: A autora.

Conforme ilustrado na Figura 21, o sinal analítico de intensidade de corrente subtraída do branco (I_{net}) aumentou significativamente quando o ensaio foi realizado a 98 °C, com $I_{net} = 65,6 \text{ nA} (\pm 1,6)$, comparado à temperatura ambiente que apresentou $I_{net} = 7,6 \text{ nA} (\pm 0,3)$, mostrando que quando as soluções da hibridização homogênea são desnaturadas termicamente há uma minimização de estruturas secundárias não intencionais do DNA alvo (BARROSO et al., 2015) que afetam a intensidade de corrente, conseqüentemente uma temperatura de 98 °C foi utilizada como temperatura ótima do ensaio de hibridização durante 5 min, em seguida, o reanelamento da cadeia foi retardado por resfriamento da amostra num banho de água gelada por mais 5 min e o restante da hibridização em temperatura ambiente, totalizando 30 min. Este procedimento foi importante porque quando se

inicia a hibridização heterogênea estamos permitindo que 2 cadeias de DNA complementares se hibridizem à temperatura ambiente, contudo, muitas vezes estas fitas têm estruturas secundárias que não facilitam a realização da hibridização heterogênea e, por isso, aplica-se temperatura na hibridização homogênea, para permitir que se desfça a estrutura secundária e assim facilitar a hibridização homogênea e, conseqüentemente, a hibridização heterogênea é facilitada à temperatura ambiente evitando regiões marginais que são prejudiciais ao desempenho analítico (BARROSO et al., 2015).

5.4.3 - Concentração de nanopartículas por eletrodo

Um outro teste realizado foi a avaliação da concentração de NPMs a serem depositadas no eletrodo, pois a quantidade de microesferas magnéticas, quando se utilizam partículas de tamanho nanométrico, têm um papel crucial no desempenho da medição eletroquímica (GONZALEZ-ALVAREZ et al., 2013; MANZANARES-PALENZUELA et al., 2015). O resultado deste estudo está descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Razão MCH:MCHAc e massa de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$

MCH:MCHAc Proporção	Massa de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$		I (nA)	Sinal subtraído do branco (nA)
6:1	0,03 mg	Branco	181	106
		Sonda alvo 2,5 nmol.L ⁻¹	287	
6:1	0,06 mg	Branco	263	243
		Sonda alvo 2,5 nmol.L ⁻¹	506	
6:1	0,12 mg	Branco	209	374
		Sonda alvo 2,5 nmol.L ⁻¹	583	

Segundo os resultados mostrados na Tabela 4, quando a quantidade de $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ utilizada por eletrodo no ensaio foi aumentada de 0,12 mg, na concentração de 2,5 nmol.L⁻¹ de Sonda alvo, o sinal subtraído do branco aumentou

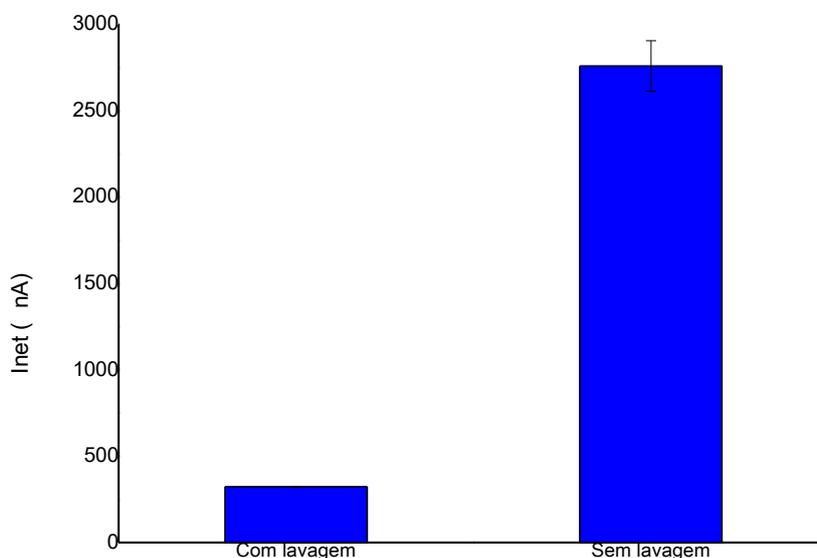
significativamente, contudo, para economizar material, a concentração 0,06 mg de nanopartículas por eletrodo utilizando SAM 6:1 (MCH:MCHAc) foi escolhida para realizar o procedimento de análise.

5.4.4 - Lavagem do nanomaterial

O passo inicial do genoensaio é a desprotonação dos grupos carboxílicos presentes na extremidade da SAM através da adição das NPMs Fe₃O₄@Au-SAM numa solução de EDC 12,8% (m/m) e NHS 87,2% (m/m). A ligação covalente da sonda de captura na superfície das nanopartículas Fe₃O₄@Au através da formação de SAMs dos alcanotóis, ácido 6-Mercaptohexanóico (MCHAc.) e 6-mercaptohexan-1-ol (MCH) é dependente dessa etapa de ativação por uso destes agentes acoplantes (NHS/EDC). O EDC promove a formação de ligações amida na imobilização de biomoléculas com ligações covalentes e além de reagir com carboxilatos, o EDC sozinho forma um complexo estável com grupos aminoácidos expostos. O NHS é adicionado às reações com EDC com a função de aumentar a estabilidade do intermediário ativo e aumentar o número de ligações de moléculas carboxiladas com grupamentos amino expostos das biomoléculas de interesse (JENNINGS e NICKNISH, 1985; STAROS, 1982; GRABAREK e GERGELY, 1990).

Ao longo de todo o procedimento de construção do genoensaio, entre cada uma das etapas mostradas, realizaram-se lavagens do nanomaterial com Tween® 20, de forma a eliminar qualquer fragmento biológico que não estivesse ligado à SAM existente na superfície das NPMs de Fe₃O₄@Au. Contudo, este procedimento de lavagem reduziu de forma intensa o sinal analítico quando realizado na etapa que corresponde às reações de condensação entre os grupos amina presentes na extremidade do DNA e os grupos carboxílicos presentes na SAM, pois os grupos carboxílicos são ativados utilizando solução de EDC/NHS que funcionam como agentes acoplantes, utilizadas para aumentar o rendimento da reação e a estabilidade da ligação amida formada (ALMEIDA, 2016). Os resultados podem ser comparados na Figura 22:

Figura 22: Representação gráfica da intensidade de corrente média nos últimos 10 s de varredura subtraída do branco em função da concentração de DNA alvo do HMGA na concentração 5,0 nmol.L⁻¹ obtidos com e sem a lavagem com Tween® 20.



Fonte: A autora.

Observa-se, portanto, através da Figura 22 que o procedimento de lavagem com Tween® 20, que apresentou $I_{net}=323,66$ nA ($\pm 0,002$), reduziu significativamente a intensidade de corrente com ensaios na mesma concentração em comparação ao mesmo procedimento sem esta etapa de lavagem, que teve $I_{net}=2761,76$ nA ($\pm 0,148$). O EDC atua aperfeiçoando a durabilidade das ligações na superfície do biossensor. Para aumentar a eficiência do reagente EDC é adicionado ao sistema o NHS que forma um éster intermediário bastante reativo que aumenta o rendimento da formação da ligação amida (SEHGAL e VIJAY, 1994). O NHS oferece também o aumento da solubilidade em água nas reações de EDC (SEHGAL e VIJAY, 1994), portanto uma lavagem nessa etapa provavelmente tenha causado perda dos agentes acoplantes EDC/NHS e, por esse motivo, foi retirada esta etapa de lavagem com tampão Tween® 20 no momento das reações entre os grupos amina presentes na extremidade do DNA e os grupos carboxílicos presentes na

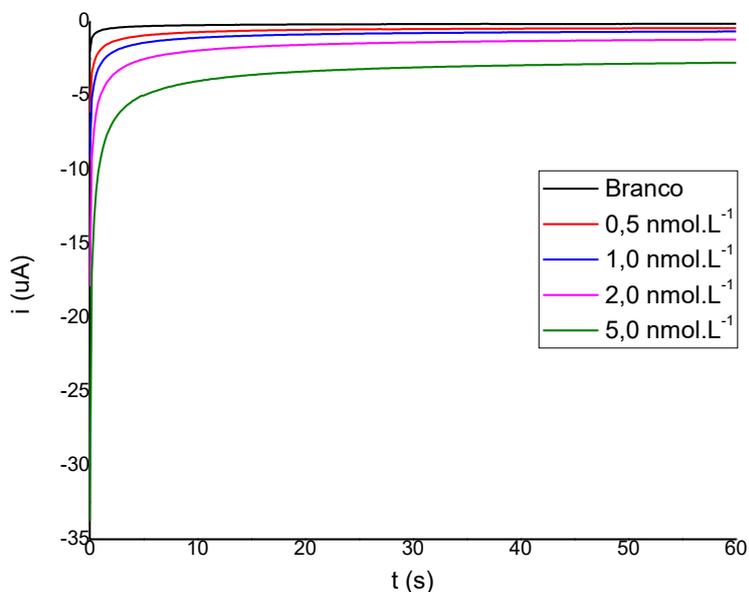
SAM ativados com solução de EDC/NHS, com o intuito de evitar inconsistência dos resultados e aumentar a sensibilidade do método.

5.5 - Montagem do genoensaio

Um estudo prévio foi realizado com sondas de DNA alvo (analito) sintéticas, de forma a avaliar a eficiência do método quanto à sua reprodutibilidade, sensibilidade e posterior aplicação em amostras reais.

A técnica eletroquímica utilizada para a detecção da concentração de DNA alvo nesse estudo foi a cronoamperometria, por meio da monitorização da reação de hibridização de cadeias de DNA complementares em condições analíticas otimizadas, por intermédio da corrente eletroquímica de 50 μ L de TMB oxidado na presença de H_2O_2 , foram colocados sequencialmente em cada um dos eletrodos, cobrindo a área com 8 mm de diâmetro que era suficiente para o contato entre os três eletrodos (eletrodo de trabalho, eletrodo de referência de Ag/AgCl e eletrodo auxiliar de grafite). Foram utilizadas para este fim concentrações crescentes de DNA sintético preparado em tubos *eppendorfs* onde verificou-se que a intensidade de corrente é proporcional à concentração de DNA analito, ou seja, quanto maior a concentração do analito, maior a intensidade de corrente do sinal medido. Dessa forma foi possível testar as NPMs de $Fe_3O_4@Au$ como nanoplataforma para a detecção do gene endógeno do milho, HMGA, verificando-se a sua sensibilidade e reprodutibilidade, determinando-se uma reta de calibração que fosse adequada, utilizando sondas de DNA alvo com diferentes concentrações conhecidas. Como mostrado na Figura 23:

Figura 23: Cronoamperogramas dos ensaios referentes à amostra de DNA alvo com concentrações crescentes: 0,0 nmol.L⁻¹, 0,5 nmol.L⁻¹, 1,0 nmol.L⁻¹, 2,0 nmol.L⁻¹ e 5 nmol.L⁻¹.

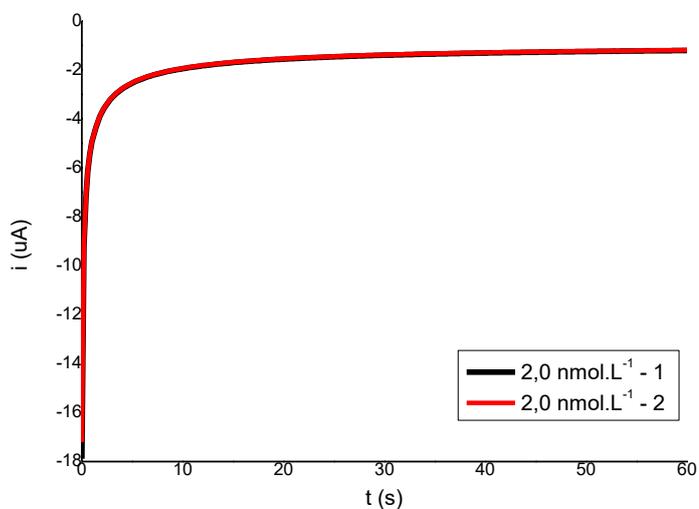


Fonte: A autora.

O alto desempenho e a especificidade deste genossensor residem no fato do processo de hibridização entre as duas fitas de DNA complementares ser altamente específico, possibilitando a discriminação quando um único par de bases não é complementar (TELES e FONSECA, 2008).

Para averiguação da precisão através de testes de reprodutibilidade do método, fez-se o procedimento de monitorização da reação de hibridização por cronoamperometria em duplicata para diferentes amostras. Usando eletrodos diferentes produzidos manualmente. Na Figura 24, é apresentado um exemplo para a concentração de DNA alvo em 2,0 nmol.L⁻¹.

Figura 24: Cronoamperograma para a concentração de $2,0 \text{ nmol.L}^{-1}$ de DNA alvo em duplicata.



Fonte: A autora.

Como é possível verificar à partir da Figura 24, as curvas para a mesma concentração de DNA alvo são sobreponíveis, nos últimos 10 s, o que revela a reprodutibilidade do método, uma vez que foram usados eletrodos diferentes e continuou a reproduzir um bom sinal.

A sensibilidade do método foi avaliada à partir da construção de curvas de calibração da intensidade de corrente em função da concentração de DNA alvo. Para tal realizou-se dois ensaios (duplicados) para cada concentração de DNA, e determinaram-se as respectivas intensidades de corrente da média dos resultados para os últimos 10 s (Tabela 4), pois somente quando ocorre a saturação da curva é que se tem a certeza de que a reação de redução do TMB foi total. Em seguida, determinou-se a intensidade de corrente média dos dois ensaios.

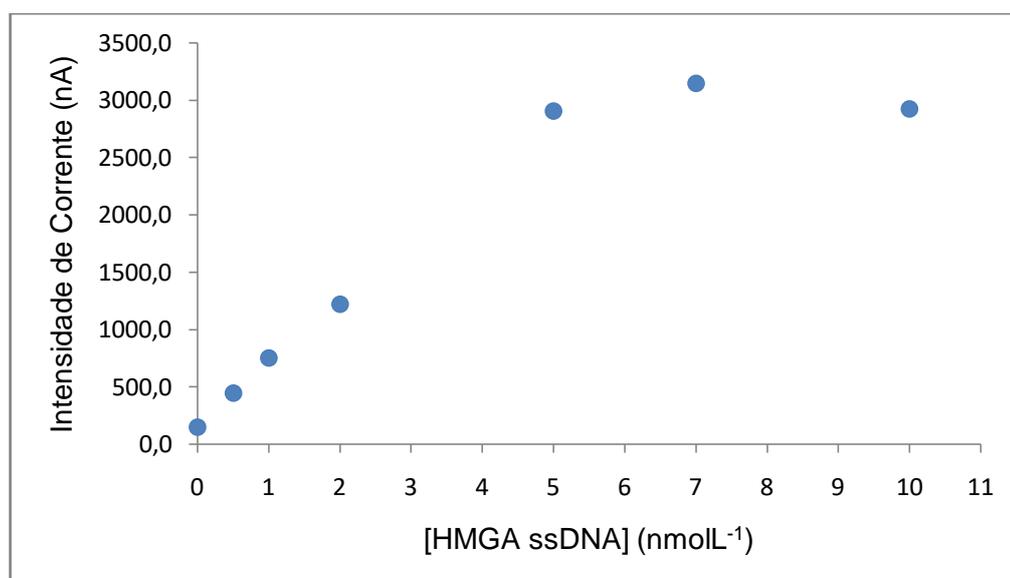
Tabela 5: Valores correspondentes às intensidades de corrente para os ensaios 1 e 2, intensidade média de corrente dos dois ensaios e do respectivo desvio padrão para cada concentração de DNA alvo variando de 0,0 a 10,0 nmol.L⁻¹.

Concentração de DNA alvo (nmol.L ⁻¹)	i1(nA)	i2(nA)	i(nA) média	RSD	i1-i0 (nA)	i2-i0 (nA)	i1:i2 (nA) média
0	144,121	147,365	145,743	2,294			
0,5	436,625	449,080	442,853	8,807	292,504	301,716	297,110
1	671,671	835,498	753,585	115,843	527,549	688,133	607,841
2	1226,667	1210,745	1218,706	11,258	1082,545	1063,380	1072,963
5	2803,588	3011,412	2907,500	146,954	2659,467	2864,047	2761,757
7	2885,549	3405,059	3145,304	367,349			
10	2774,588	3077,373	2925,980	214,101			

RSD: desvio padrão relativo

Como pode ser observado através dos dados da Tabela 5 para a construção da curva de calibração os pontos de concentração 7,0 e 10,0 nmol.L⁻¹ causavam grande erro no cálculo da linearidade (Figura 25):

Figura 25: Representação gráfica da intensidade de corrente média (i) nos últimos 10 s de varredura em função da concentração de DNA alvo do HMGA na faixa de concentração de DNA alvo variando de 0,0 a 10,0 nmol.L⁻¹.

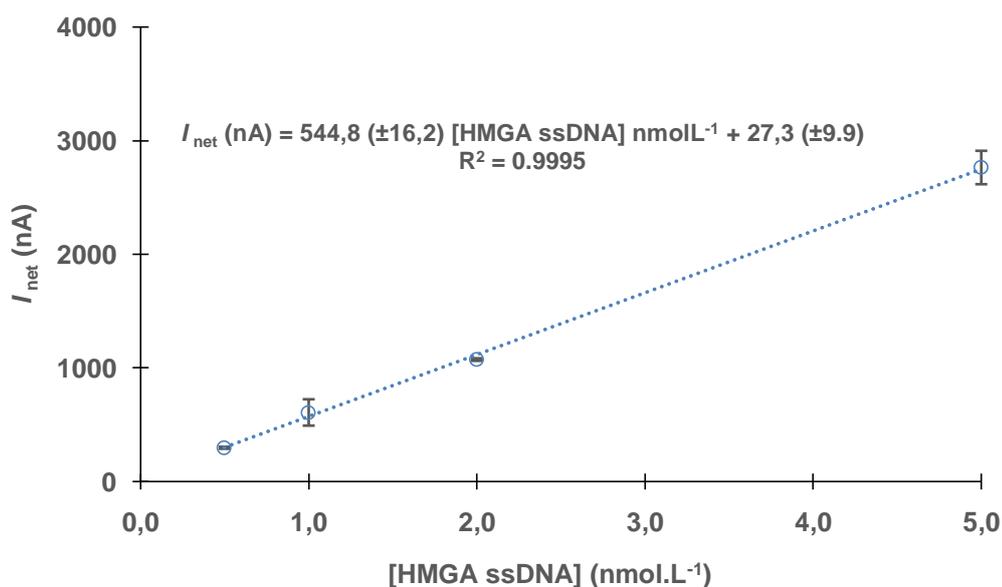


Fonte: A autora.

Portanto os pontos 7,0 e 10,0 nmol.L⁻¹, foram descartados o que gerou o gráfico ilustrado na Figura 26. Nessa faixa foi encontrada uma correlação linear

entre a intensidade de corrente subtraída do branco (I_{net}) e a concentração alvo no intervalo de 0,0 a 5,0 nmol.L^{-1} . A equação de regressão sob condições otimizadas é a resposta a concentrações crescentes de DNA alvo do HMGA do milho e foi avaliada medindo as correntes cronoamperométricas no intervalo descrito anteriormente e está descrita a seguir:

Figura 26: Representação gráfica da intensidade de corrente subtraída do branco (I_{net}) nos últimos 10 s de varredura em função da concentração de DNA alvo do HMGA na faixa de concentração variando de 0,0 a 5,0 nmol.L^{-1} .



Fonte: A autora.

Observa-se através da Figura 26 que a curva de calibração apresentou coeficiente de correlação linear 0,9995, o qual segue uma tendência linear. A sensibilidade do método é um dos requisitos mais importantes para verificar a viabilidade desta técnica analítica, portanto com os valores analíticos obtidos averiguou-se a possibilidade de tornar viável o método desenvolvido neste trabalho para a detecção da reação de hibridização, por cronoamperometria. Como é possível verificar através da Figura 26, o genoensaio desenvolvido permite detectar a reação de hibridização e obter resultados reprodutíveis, pois, obteve-se uma inclinação alta (544,8) para a gama de concentrações 0,0 a 5,0 nmol.L^{-1} .

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) calculados como três vezes e dez vezes o desvio padrão do ensaio do branco dividido pela inclinação

do gráfico de calibração foram $0,094 \text{ nmol.L}^{-1}$ e $0,313 \text{ nmol.L}^{-1}$, respectivamente. A precisão deste genoensaio foi avaliada utilizando 2 nmol.L^{-1} de DNA alvo de HMGA do milho. Assim, a repetibilidade foi determinada por medições de inter eletrodos e a reprodutibilidade foi avaliada realizando duas medições no intervalo de 5 dias. A repetibilidade e a reprodutibilidade expressas como desvio padrão relativo foram de 0,9% e 1,2 %, respectivamente, resultados melhores que os encontrados em (FREITAS et al., 2016) para aplicação onde foram utilizados: um fragmento específico da construção transgênica do milho MON810 e Nps $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ na proporção 1:4, com procedimento realizado à temperatura ambiente. E também melhores que os encontrados em (BARROSO, 2015) que utilizam nanoeletrodos preparados por deposição de ouro, não eletrolítica, dentro dos poros de uma membrana microporosa de policarbonato. Os resultados apresentados no nosso trabalho mesmo com utilização de eletrodos produzidos manualmente apresentou excelente reprodutibilidade.

Uma pesquisa semelhante encontrada na literatura (INSTITUTO NACIONAL DE TECNICA AEROESPACIAL, 2006), aplicada no campo biosanitário animal e humano, utiliza como núcleo magnético nanopartículas de ferrite de cobalto (CoFe_2O_4), revestidas com sílica e só então uma ou mais camadas metálicas externas que podem ser de tipos diferentes e depositadas de uma maneira alternada e imobilizadas na superfície externa. Contudo este procedimento, é mais laborioso, pois necessita do uso de uma resina sintetizada previamente, filtração para remoção da mesma e diálise, e leva mais de 4 dias para serem preparadas.

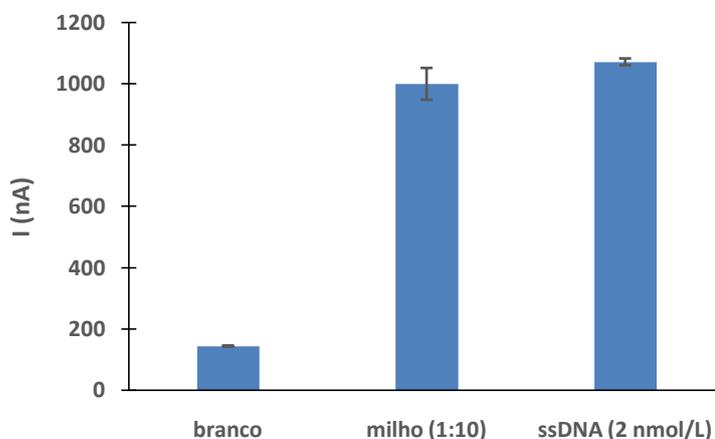
5.6 - Aplicação do genoensaio para detecção de produtos específicos de PCR do HMGA do milho

De modo a demonstrar a aplicabilidade do genoensaio, um milho certificado e de referência (CRM do inglês) foi utilizado como amostra real. Para isso, o DNA genômico do milho foi extraído, amplificado por PCR e testado no genoensaio.

Uma alíquota 20 μL de gene endógeno HMGA extraído e amplificado, de amostras de farinha de milho transgênica certificada do evento MON810 10% (p / p), com uma diluição mínima (1:10) foi adicionada à solução contendo o DNA marcado e volume final de 500 μL . De forma semelhante aos oligonucleotídeos sintéticos, foi

realizado um procedimento de desnaturação do DNA amplificado por aquecimento a 98 °C durante 5 min e arrefecimento em banho de gelo a partir de 5 min, com mais 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocados 50 uL de produtos de PCR específicos desnaturados na hibridização homogênea no eletrodo modificado e a reação de hibridização heterogênea ocorreu à temperatura ambiente durante 60 min. Após a reação de hibridização, os sinais analíticos foram registrados e conforme se pode visualizar na Figura 27, o sinal eletroquímico obtido foi distinto do ensaio em branco.

Figura 27: Sinal de corrente de uma amostra real diluída a 1:10 de DNA do milho amplificado a partir do material certificado do evento MON810 10% (p/p), com primers específicos para o evento transgênico comparado ao sinal obtido com uma sonda sintética (ssDNA) na concentração 2 nmol.L⁻¹.



Fonte: A autora.

Estes resultados indicam que o genoensaio responde e tem capacidade de detectar o gene endógeno HMGA do milho a partir de amostras reais e sem interferências dos reagentes utilizados na amplificação do DNA, ou seja, não é necessário realizar um processo de purificação e poderá ser utilizado na análise relativa do evento transgênico MON810 ou para quaisquer outros eventos de milho transgênico.

CONCLUSÕES

Um genoensaio eletroquímico foi desenvolvido utilizando-se NPMs $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ núcleo@revestimento depositadas em eletrodos de Au descartáveis produzidos manualmente para detecção eletroquímica da sonda alvo complementar do gene endógeno de alta mobilidade HMGA específico do milho num formato *sanduíche*.

As sínteses de NPM $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (nas proporções 1:4 e 1:7) foram realizadas com sucesso, e apresentaram morfologia esférica, uniforme e bem definida com cerca de 10 nm de diâmetro e ausência de agregados o que associado à sua biocompatibilidade permitiu que a imobilização do DNA fosse bem orientada, otimizando a capacidade de reconhecimento na hibridização funcionando como amplificadores de sinal e contribuindo para a sensibilidade e reprodutibilidade do genoensaio desenvolvido.

Uma folha de ouro obtida por corrente contínua (DC *Sputtering*) sobre um filme de poliéster foi utilizada para o preparo dos eletrodos de trabalho preparados manualmente. Estes eletrodos apresentaram área ativa com valor médio de $0,171 \text{ cm}^2 \pm 0,017$ ($n=31$), reduzindo assim os erros de dispersão obtendo desempenho analítico superior ao dos eletrodos serigrafados comercialmente disponíveis descritos na literatura.

Os eletrodos produzidos manualmente se mostraram reprodutíveis para aplicação no método proposto, uma vez que foram usados eletrodos diferentes e continuou a reproduzir um bom sinal.

O genoensaio pode detectar o gene HMGA em condições analíticas ótimas, dentre elas estão: a utilização de uma camada auto montada (SAM) composta por MCH e MCHAc (a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ na proporção 6:1); concentração de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ (na proporção 1:7) de $0,06 \text{ mg/ensaio}$; não utilização de BSA como bloqueante; hibridização homogênea realizada a $98 \text{ }^\circ\text{C}$; retirada de uma etapa de lavagem com tampão Tween® 20 no momento das reações entre os grupos amina presentes na extremidade do DNA e os grupos carboxílicos presentes na SAM ativados com solução de EDC/NHS que provavelmente tenha causado perda dos agentes acoplantes utilizados para aumentar o rendimento da reação e a estabilidade da ligação amida formada.

O emprego do genoensaio proposto possui várias características óbvias que mostrou ser uma boa alternativa para o aumento do desempenho de análise de DNA de OGM. O coeficiente de correlação para a curva de calibração foi de 0,9995, mostrando-se linear no intervalo de 0,0 a 5,0 nmol.L⁻¹, com LOD de 0,094 nmol.L⁻¹ e LOQ de 0,313 nmol.L⁻¹. A precisão variou de 0,9 a 1,2 %. O método levou ao aumento de sensibilidade e não necessitou de prévia separação.

Foi realizada a verificação da consistência do método, testando-o em amostras comerciais amplificadas por PCR indicando que o genoensaio responde e tem capacidade de detectar o gene endógeno HMGA do milho a partir de amostras reais sem a necessidade de realizar um processo de purificação. E para nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho com todas as propriedades descritas que mostrou bom desempenho analítico, com repetibilidade e reprodutibilidade notavelmente altas.

A facilidade de manuseio desse genoensaio torna essa uma ferramenta promissora, simples, portátil, de baixo custo, menos laboriosa e mais sensível para aplicação no desenvolvimento de novas ferramentas ou plataformas nanotecnológicas para a detecção e quantificação relativa de milho Geneticamente Modificado (GM) em alimentos e rações que poderão ser realizados em grandes instalações laboratoriais para verificar a conformidade aos regulamentos de GMO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGRESTI A, BIANCHI ME. HMGB proteins and gene expression. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.13, n.2, p. 170-8, 2003.

AHAMMAD, A. J. Saleh; LEE, Jae-Joon; RAHMAN, Md. Aminur. Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes. **Sensors**, v.9, p.2289-2319, 2009.

AHMED. F. E. Detection of genetically modified organisms in foods. **Trends Biotechnol.** v. 20, n. 5, p. 215-223, 2002.

AKRAM, M.; STUART, M. C.; WONG, D. K. Y. Direct application strategy to immobilize a thioctic acid self-assembled monolayer on gold electrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 504, n. 2, p. 243-251, 2004.

ALBRECHT, L. P.; MISSIO, R. F. **Manejo de cultivos transgênicos**. Palotina, PR, 2013. p. 11-12.

ALMEIDA, I. B. B. Tese de Doutorado: "(Bio)funcionalização de superfícies nanoestruturadas para eletrocatalise e desenvolvimento de biossensores eletroquímicos e óticos". Lisboa, 2016. p. 11. Disponível em: https://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/23970/1/ulsd072880_td_Ines_Almeida.pdf. Acesso em: 10/03/2017.

ALVES, G. S. A biotecnologia dos transgênicos: Precaução é a palavra de ordem. Holos. Disponível em: <http://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/viewFile/33/34>. 2004. p. 9.

ARUGULA, M.A., Y. ZHANG, A.L. SIMONIAN, Biosensors as 21st century technology for detecting genetically modified organisms in food and feed, **Anal. Chem.**, v. 86, p.119-129, 2014.

ARYA, S. K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosens. Bioelectron.**, v. 24, n. 9, p. 2810-2817, 2009.

BARD, A.J., FAULKNER, L.R., **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2nd ed., John Willey and Sons Inc, New York, 2001.

BARROSO, M. F.; FREITAS, M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; DELERUE-MATOS, C. 3D-nanostructured Au electrodes for the event-specific detection of MON810 transgenic maize. **Talanta**, v.134, p. 158-164, 2015.

BEAUCAGE S. L, Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 10, p. 1213-1244, 2001.

BENITESA, T. A., RIBEIROA, W. C., GÓESB, M. S., FERREIRA, A. A. P., BUENOA, P.R. Efeitos da rugosidade superficial nas propriedades de passivação de Monocamadas Orgânicas Automontadas. **Quim. Nova**, v. 37, n. 9, 1533-1537, 2014.

BIN, X. M., SARGENT, E. H. & KELLEY, S. O. Nanostructuring of sensors determines the efficiency of biomolecular capture. **Anal. Chem.** v. 82, 5928–5931, 2010.

BOCKRIS, J. O.; REDDY, A. K. N. **Vomume 1: Modern Electrochemistry. Ionics.** 2nd Ed., Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.

BOISSELIER E., ASTRUC D.; Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chem. Soc. Rev.** v. 38, n.6, p.1759-82, 2009.

BOLLEY, J.; LALATONNE, Y.; HADDAD, O.; LETOURNEUR, D.; SOUSSAN, M.; PÉRARD-VIRET, J.; MOTTE, LAURENCE. Optimized multimodal nanoplatfoms for targeting $\alpha\beta 3$ integrins. **Nanoscale**, v.5, p. 11478–11489, 2013.

BONFINI, L.; HEINZE, P.; KAY, S.; VAN DEN EEDE, G. **Review of GMO detection and quantification techniques.** Report from the European Commission Joint Research Center, Ispra, 2001. 67p. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/review%20of%20gmo%20detection%20and%20quantification%20techniques.pdf>. Acesso em: 13.03.2017

BORGMANN, S; SCHULTE, A; NEUGEBAUER, S. et al. Amperometric Biosensors. **Advances in Electrochemical Science and Engineering.** Weinheim: Richard C. Alkire, Dieter M. Kolb, and Jacek Lipkowski WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN: 978-3-527- 32885-7. v.11, 2011.

BRORSON, S.H. Bovine serum albumin (BSA) as a reagent against non-specific immunogold labeling on LR-White and epoxy resin. **Micron.** v.28, n.3, p. 189-195, 1997.

BROWN, J. R. Structure of bovine serum albumin. *Fed. Proc.*, **Fed. Am. Soc. Exp. Biol.** v.34, p. 591, 1975.

BUSTIN, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. **Mol. Cell. Biol.** v. 19, p. 5237–5246, 1999.

CÁNOVA, D. K. D.. Dissertação (mestrado): **Caracterização da proteína Cry1Ab do milho geneticamente modificado MON810 e detecção das possíveis interações com proteínas endógenas de milho.** Florianópolis, SC, 2014.

CARBODIIMIDE CROSSLINKER CHEMISTRY. Thermo Fisher Scientific – SA. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html>. Acesso em: 10/02/2019.

CARNEIRO, A. A.; GUIMARAES, C. T.; VALICENTE, F. H.; WAQUIL, J. M.; VASCONCELOS, M. J. V.; CARNEIRO, N. P.; MENDES, S. M. **Milho Bt: teoria e prática da produção de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo**, 2009. 25 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica, 135).

CARPINI, G., LUCARELLI, F., MARRAZZA, G., MASCINI, M., Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids. *Biosens. Bioelectron.* v.20, p.167–175, 2004.

CARVALHAL, R. F., FREIRE, R. S., KUBOTA, L. T. Polycrystalline gold electrodes: A comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. *Electroanal.*, v. 17, n. 14, p. 1251-1259, 2005.

CELLINI, F.; CHESSON, A.; COLQUHOUN, I.; CONSTABLE, A.; DAVIES, H.V.; ENEGEL, K. H. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem. Toxicol.* v 42. p. 1089–1125, 2004.

CHAKI, N.K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* v.17, n. 1-2, p. 1-12, 2002.

CHEN, L.; WANG, Q.; WANGUO HOU, W. The utilization of BSA-modified chip on the investigation of ligand/protein interaction with surface plasmon resonance. *Afr. J. Biotechnol.*, v. 8, n. 24. p. 7148-7155, 2009.

CHEN.Y.; ZHANG,M.; LIU, W.; LI,G. Korea-Aust. Properties of alkali-solubilized collagen solution crosslinked by N-hydroxysuccinimide activated adipic acid. *Rheol. J.* v.23, n. 1, p. 41–48, 2011.

CONCEIÇÃO, F. R, MOREIRA, Â. N., BINSFELD, P. C. Detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados em alimentos e ingredientes alimentares. *Ciênc. Rural*, Santa Maria, v.36, n.1, ISSN 0103-8478. p.315-324, 2006.

COSTA, M. A. F. da; COSTA, M. de F. B. da. **Biossegurança de OGM: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Publit, 2009, p. 1-18.

COTA, M. V. R. **Os organismos geneticamente modificados e a rotulagem dos alimentos: uma análise a partir dos direitos dos consumidores**. v. 6, n. 2, p. 1-25, 2015.

DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ. P.; LOBO-CASTAÑÓN, J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUÑÓN-BLANCO, P. Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. *Electroanal.*, v. 16, n. 15, p.1193-1203, 2004.

DONG, S.; LI, J.. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. *Bioelectrochem. Bioenerg.* v. 42, p.7-13.1997.

DONG, W.; YANG, L.; SHEN, K.; KIM, B.; KLETER, G.A.; MARVIN, H.J.P.; GUO, R.; LIANG, W. AND ZHANG, D. GMDD: A database of GMO detection methods. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 260, p. 1-8, 2008.

DUAN, C. M.; MEYERHOFF, M. E. Immobilization of Proteins on Gold Coated Porous Membranes Via an Activated Self-Assembled Monolayer of Thioctic Acid. **Mikrochim. Acta**. v. 117, n. 3, 195-206, 1995.

EFFENBERGER, F. B. Tese (doutorado): **Nanomateriais magnéticos para aplicações em terapia e imagem**. São Paulo. 167 p. 2012.

ERDEM, A.; PIVIDORI, M. I.; LERMO, L.; BONANNI, A.; DEL VALLE, M.; ALEGRET, S. Genomagnetic assay based on label-free electrochemical detection using magneto-composite electrodes. **Sensor Actuat. B: Chem**, v.114, n. 2, p. 591-598, 2006.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – FUNECE. Roselayne Ferro Furtado, Carlucio Roberto Alves, Maria Gaderny Ribeiro Pimenta - Martins, Rosa Fireman Dutra, Maria De Fátima Borges. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ELETRODO IMPRESSO MODIFICADO COM NANOPARTÍCULAS DE OURO. BR 102013033108-2 A2. 20 dez. 2013. 08 dez. 2015.

EMBRAPA. De Almeida, J.D. et al. **Composições e métodos contendo promotor específico de folhas para modificar a expressão de genes de interesse em plantas**. PCT/BR2014/000082, WO2014146181 A2, 25 set. 2014, 18 mar. 2014.

EUROPEAN COMMISSION. REGULATION (EC) No1829, Official Journal of the European Union, L268 (2003). Disponível em: < <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32003R1829>>. Aceso em: 10.05.2016.

FISHER, J. A. **Estudo da formação de monocamadas autoorganizadas de tióis sobre Au (111)**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. SC. 74 p. 2011.

FREIRE, R.S., PESSOA, C. A. e KUBOTA, L.T. Emprego de Monocamadas Auto-Organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 3, p.381-389, 2003.

FREITAS, M.C.C; SÁ COUTO, M.M; BARROSO, M.F.; PEREIRA, C.; DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ, N.; MIRANDA-ORDIERES, A.J.; LOBO-CASTAÑÓN, M.J.; DELERUE-MATOS, C. Highly Monodisperse Fe₃O₄@Au Superparamagnetic Nanoparticles as Reproducible Platform for Genosensing Genetically Modified Organisms. **ACS Sensors**. v.1, n. 8, p. 1044-1053, 2016.

FURTADO, R. F. et al. **Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos**. Documentos 117. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.1677-1915, 2008.

- GAO, H. W., SUN, M.; LIN, C.; WANG, S.B., Electrochemical DNA Biosensor Based on Graphene and TiO₂ Nanorods Composite Film for the Detection of Transgenic Soybean Gene Sequence of MON89788: **Electroanal.**, v. 24.p. 2283–2290, 2012.
- GASPARAC. R., TAFT, B.J., LAPIERRE-DEVLIN, M.A., LAZARECK, A.D., XU, J.M., KELLEY, S.O. Ultrasensitive electrocatalytic DNA detection at two- and three-dimensional nanoelectrodes. **J. Am. Chem. Soc.** v.126, p. 12270–12271, 2004.
- GODA, T., SINGI, A.B., MAEDA, Y., MATSUMOTO, A., TORIMURA, M., AOKI, H., MIYAHARA, Y., Label-free potentiometry for detecting DNA hybridization using peptide nucleic acid and DNA probes. **Sensors**, v. 13, n. 2, p. 2267–2278, 2013.
- GONZALEZ-ALVAREZ, M. J.; PEREZ-RUIZ, E.; MIRANDA-CASTRO, R.; DELOS-SANTOS-ALVAREZ, N.; MIRANDA-ORDIERES, A J.; LOBO-CASTANON, M. J. Effect of tags and labels on the performance of enzyme-amplified electrochemical genomagnetic assays. **Electroanal.**, v. 25, n.14, p. 7153, 2013.
- GOODWIN G.H.; SANDERS, C.; JOHNS, E.W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. **Eur. J. Biochem.** v. 38. p. 14–19, 1973.
- GOULD, F.; AMASINO, R.M.; BROSSARD, D; BUELL C.R.; DIXON R.A.; FALCK-ZEPEDA J.B. et al. Genetically Engineered Crops: Experiences and Prospects. **Natl. Acad. Press.**, Washington, DC,388 pp, 2016.
- GRABAREK, Z. AND GERGELY, J., Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. **Anal. Biochem.** v.185, n.1, p.131, 1990.
- HE, L.; TOH, C. S. Recent advances in analytical chemistry: a material approach. **Anal. Chim. Acta**, v. 556, n. 1, p. 1-15, 2006.
- HALFORD, C., GAU, V., CHURCHILL, B.M., HAAKE, D.A. Bacterial Detection & Identification Using Electrochemical Sensors. **J. Vis. Exp.** v.74, e4282, p. 1-8. 2013.
- HAMMOND, J. L., FORMISANO, N., ESTRELA, P., CARRARA, S., TKAC, J. Electrochemical biosensors and nanobiosensors. **Essays Biochem.** v.60, n.1, p. 69–80, 2016.
- HARSANYI G. **Polymer Films in Sensor Applications.** Technomic Publishing Co. Lancaster. 1994.
- HERNÁNDEZ M., DUPLAN M-N, BERTHIER G., VAITILINGOM M., HAUSER W., FREYER R., PLA M. AND BERTHEAU Y. Development and comparison of four RTi-PCR systems for specific detection and quantification of Zea mays L. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, n. 15. p. 4632-4637, 2004.
- HERNÁNDEZ, M.; ESTEVE, T.; PRAT, S.; PLA, M. Development of real-time PCR systems based on SYBRw Green I, Amplifluore and TaqManw technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. **J. Cereal Sci.**, n. 39. p. 99– 107, 2004.

HLONGWANE, G. N.; DODOO-ARHIN, D.; WAMWANGI, D.; DARAMOLA, M. O.; MOOTHI, K.; IYUKE, S. E. DNA hybridisation sensors for product authentication and tracing: State of the art and challenges. **S. Afr. J. Chem. Eng.**, ISSN: 1026-9185, v. 27, p. 16-34, 2019.

HMGA: High mobility group protein HMGA (IPR000116). Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR000116>. Acesso em: 15.11.2016.

HOMBERGER M., SIMON U. On the application potential of gold nanoparticles in nanoelectronics and biomedicine. **Phil. Trans. R. Soc.** . v. 368, p. 1405-1453, 2010.

HOOGLIET, J.C. et. al, "Electrochemical pretreatment of polycrystalline gold electrodes to produce a reproducible surface roughness for self assembly: A study in phosphate buffer pH 7.4", **Anal. Chem.**, v.72, n. 9, p. 2016-2021, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DE TECNICA AEROESPACIAL, MADRID (ES); CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, MADRID (ES). Victor M. FERNANDEZ LOPEZ; JOSE A. MARTN-GAGO; MARCOS PITA MATINEZ, CRISTINA VAZ DOMINGUEZ, CARLOS BRIONES LLORENTE Y EVA MATEO MARTI. Nanoparticle Biosensor, method of preparing same and uses thereof. **US 20130040292 A1**. 14 fev. 2013. 12 set. 2006.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015**. Ithaca, NY: International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA). Disponível em: <<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/51/executivesummary/default.asp>>. Acesso em: 10.11.2016.

JAMES, C. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016**. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY. Disponível em: <<https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/executivesummary/pdf/B52-ExecSum-Portuguese.pdf>>. Acesso em: 13.05.2018.

JENNINGS, M. L; NICKNISH, J. S., Localization of a site of intermolecular cross-linking in human red blood-cell band-3 protein. **J. Biol. Chem.** v.260, n.9, p.5472, 1985.

JONHSSON, B.; LOFAS, S.; LINQUIST, G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. **Anal. Biochem.**, v. 198, n.2, p. 268-277, 1991.

KAVITA V. DNA Biosensors-A Review. **J. Bioengineer & Biomedical Sci.** v.7, n. 222, p. 1-5, 2017.

KIM, T., LEE, C-H; JOO, S-W; LEE, K.. Kinetics of gold nanoparticle aggregation: Experiments and modeling. **J. Colloid. Interf. Sci.**. v. 318, n. 2, p. 238-243, 2008.

KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. **Laboratory techniques in electroanalytical chemistry**. Marcel Dekker Inc., 2nd edition, 1008 p., 1996.

KOZAN, J. V. B. **Glucose Microsensor Integrated into a Catheter**. Master Thesis – Graduate Program in Chemistry. 2007. p.99.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434p.

LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Quím. Nova**, v. 22, n. 3, p.417- 424, 1999.

LATA, K., JAISWAL, A., NAIK, L., SHARMA, R. Gold Nanoparticles: Preparation, Characterization and Its Stability in Buffer. **Nano Trends: A Journal of Nanotechnology and Its Applications**. v. 17. 2015. p. 1-10.

LEE, J, PARKA, IL-S, KIM, H., WOO, J-S, CHOI, B-S, MIN, D-H. BSA as additive: A simple strategy for practical applications of PNA in bioanalysis. **Biosens. Bioelectron.** v. 69, p. 167–173, 2015.

LIMA, R. M. M. de. **Desenvolvimento de protótipos biosensores eletroquímicos para avaliação de níveis glicêmicos e sequências nucleotídicas**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Parnanbuco. 2011.

LIN, C-H; PAN, T-M. Review: Perspectives on genetically modified crops and food detection, **J. Food Drug Anal.** v. 24, p. 1-8, 2016.

LOJOU, É.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **J. Electroceram.** v.16, n.1, p.79-91, 2006.

LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S.; CARTER, M. E. Transgenic pollen harms monarch larvae. **Nature**, Londres, n.399, p.214, 1999.

LOVE, J. C., ESTROFF, L. A., KRIEBEL, J. K., NUZZO, R. G., WHITESIDES, G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chem. Rev.** 2005; 105(4): 1103-1169.

LOWE, C. R. Biosensors. **Trends Biotechnol.**, v.2, n.3, p. 59–65. 1984.

LUCARELLI, F., MARRAZZA, G., MASCINI, M., Enzyme-based impedimetric detection of PCR products using oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes. **Biosens. Bioelectron.** v. 20, n.10, 2001–2009, 2005.

LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; TURNER, A. P. F.; MASCINI, M. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducer for DNA hybridization sensors. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, n. 6, p. 515-530, Jan. 2004.

LUCHT, J. M., THOMAS, H. Public Acceptance of Plant Biotechnology and GM Crops. **Viruses**. v. 7, n.8, p. 4254–4281, 2015.

LUONG, J.H.T.; MALE, K.B.; GLENNON, J.D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnol. Adv.**, v. 26, p. 492-500, 2008.

LOU, T., CHEN Z., WANG, Y., CHEN, L. Blue-to-Red Colorimetric Sensing Strategy for Hg²⁺ and Ag⁺ via Redox-Regulated Surface Chemistry of Gold Nanoparticles. **ACS Appl. Mater. Inter.** v. 3. n. 5. p. 1568-1573. 2011.

MAHMOUDI-BADIKIA, T., ALIPOURB, E., HAMISHEHKARC, H., GOLABIB, S. M. A performance evaluation of Fe₃O₄/Au and γ-Fe₂O₃/Au core/shell magnetic nanoparticles in an electrochemical DNA bioassay. **J. Electroanal. Chem.** v. 788, p. 210–216, 2017.

MANDLER, D.; TURYAN, I.; Applications of self-assembled monolayers in electroanalytical chemistry. **Electroanal.**, v. 8, n. 3, p.207-213, 1996.

MANZANARES-PALENZUELA, C. L.; DE-LOS-SANTOS-ALVAREZ, N.; LOBOCASTAION, M.; LOPEZ-RUIZ, B. Multiplex electrochemical DNA platform for femtomolar-level quantification of genetically modified soybean. **Biosens. Bioelectron.** v.68, p. 259-265. 2015.

MARCELINO, F. C.; Guimarães, M. F. M.; BARROS, E. G. DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS GENETICAMENTE MODIFICADOS: O PANORAMA BRASILEIRO. **Revista Ceres**. v. 54, n. 313. p. 240-250. 2007.

MARMIROLI, N.; MAESTRI, E.; GULLÌ, M.; MALCEVSCHI, A.; PEANO, C.; BORDONI R, DE BELLIS G. Methods for detection of GMOs in food and feed. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 392, n. 3, p. 369-384, 2008.

MARQUES, P. R. B. de O., & YAMANAKA, H.. Biosensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quím. Nova**, v. 31. n. 7, 1791-1799, 2008.

MARRAZZA, G.; TOMBELLI, S.; MASCINI, M.; MANZONI, A.; Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR. **Clin. Chim. Acta**, v.307, p. 241-248, 2001.

MELO, S. M. Tese de doutorado: **Sensor eletroquímico para detecção de Organismos Geneticamente Modificados: detecção do promotor P35S**. Teresina-PI, 2016.

MERIC B., KERMAN K., MARRAZZA G., PALCHETTI I., MASCINI M., OZSOZ M. Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS-terminator, a genetic element present in GMOs. **Food Control**, v.15, p. 621–626. 2004.

MONOŠÍK,R.; STREDANSKY,M.& STURDÍK,E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chim. Slov.**, v.5, n.1, p. 109–120. 2012.

MURPHY, L; Current Opinion in Chemical Biology. **Biosens. Bioelectron.** v.10, p.177– 184, 2006.

MUSSINI, P. R. Analytical Electrochemistry, 3rd ed., J. Wang. Wiley–VCH, New York (2006). **Electrochim. Acta**, v. 53, n. 8, p. 3446-3448, 2008.

OLDE DAMINK L.H.H.; DIJKSTRA P.J.; VAN LUYN. M,J.A.; VAN WACHEM P.B.; FEIJEN J., Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide. **Biomaterials**. v. 17. n.8, p. 765–773,1996.

OZSOZ, M. S. **Electrochemical DNA Biosensors**. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. v. 23, p. 400. Singapore, 2012.

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.Rev. **Virtual Quim.**,v. 5. n.4, p. 516-537, 2013.

PEI, H.; ZUO X. L.; ZHU, D.; HUANG, Q.; FAN, C. H., Functional DNA Nanostructures for Theranostic Applications. **Acc. Chem. Res.** v. 47, p. 550, 2014.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. de S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quím. Nova**. v. 25, n 6, p. 1012-1021, 2002.

PERES, V. H.; SILVA, G. S.; GOMES, F. M.; de CASTRO, H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of Candida rugosa lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochem. Eng. J.** v.34,n.1, p.13-19, 2007.

PESQUERO, N. C. Tese (doutorado): **Desenvolvimento de dispositivos para diagnóstico e genotipagem de Hepatite C**. Araraquara-SP, 2013. 140 p.

PLÁCIDO A., PEREIRA C., GUEDES A., BARROSO M. F., MIRANDA-CASTRO R., DE-LOS-SANTOS-ÁLVAREZ N., DELERUE-MATOS C., Electrochemical genoassays on gold-coated magnetic nanoparticles to quantify genetically modified organisms (GMOs) in food and feed as GMO percentage, **Biosens. Bioelectron.**, v. 110, 2018, p. 147-154, ISSN 0956-5663.

QI, P., Y. WAN, D. ZHANG, Impedimetric biosensor based on cell-mediated bioimprinted films for bacterial detection. **Biosens. Bioelectron.**, v.39, n.1, p. 282-288, 2013.

RAVERA, M., RAVERA, M., BAGNI, G., MASCINI, M., & OSELLA, D. DNA-metallodrugs interactions signaled by electrochemical biosensors: an overview. **Bioinor. Chem. Appl.**, v.2007, 2007.

RIBOVSKI, L. **Biossensores eletroquímicos para fins ambientais e medicinais**. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, p. 110. 2015.

ROCHA-SANTOS, T.A.P. Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles. **Trac-trends Anal. Chem.**, v. 62, p. 28-36, 2014.

SADIK, O. A.; ALUOCH, A. O.; ZHOU, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. **Biosens. Bioelectron.**, v. 24, n. 9. p. 2749-2765, 2009.

SAITO. H.; TAGUCHI. T.; KOBAYASHI. H.; KATAOKA. K.; TANAKA, J.; MURABAYASHI, S; MITAMURA Y., Physicochemical properties of gelatin gels prepared using citric acid derivative. **Mater. Sci. Eng. C.** v. 24, n. 6-8, p. 781–785, 2004.

SALAM, F. **Development of immunosensors for Salmonella typhimurium.** Cranfield University, PhD thesis. 297 p. 2010.

SAMANTA, D.; SARKAR, A. Immobilization of bio-macromolecules on selfassembled monolayers: methods and sensor applications. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, p. 2567-2592, 2011.

SAPSFORD, K.E; ALGAR, W.R; BERTI, L.; GEMMILL, K.B.; CASEY, B.J.; OH, E.; STEWART, M.H.; MEDINTZ, I.L., Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. **Chem. Rev.** v. 113, n.3, p.1904-2074, 2013.

SASSOLAS, AUDREY, BLUM, LOÏC J., LECA-BOUVIER, BÉATRICE D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol. Adv.** v. 30, n.3, p. 489–511, 2012.

SASSOLAS,A.; LECA-BOUVIER,B.D.; BLUM,L.J. DNA biosensors and microarrays. **Chem. Rev.**,v.108,n.1,p.109-139, 2008.

SCHREIBER, F. Structure and Growth of Self-Assembling Monolayers. **Prog. Surf. Sci.**, v. 65, p. 151-256, 2000.

SEHGAL D., VIJAY I. K., A Method for the High Efficiency of Water-Soluble Carbodiimide-Mediated Amidation. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 87-91, 1994.

SENARATNE, W.; ANDRUZZI, L.; OBER, C. K. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2427-2448, 2005.

SILVA. J.J.B. **Desenvolvimento de biosensores eletroquímico e piezoelétrico de DNA para diagnósticos clínicos.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2004.

SILVA, L. M. V. Dissertação (Mestrado). **Os transgênicos no Brasil: uma análise sobre a efetiva normativa da biossegurança nacional.** Aracaju: UNIT, 2016. p. 62-63,83.

SOLEYMANI, L.; FANG, Z. C.; SUN, X. P.; YANG, H.; TAFT, B. J.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Nanostructuring of Patterned Microelectrodes to Enhance the Sensitivity of Electrochemical Nucleic Acids Detection. **Angew. Chem.**, v. 48, p. 8457–8460, Int. Ed. 2009.

SOUZA, P. V. de V. A. **Desenvolvimento de biossensores para detecção de infecções virais baseados em eletrodos quimicamente modificados**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife. 2014. 124 f.

STAROS, J.V. N-Hydroxysulfosuccinimide active esters: Bis (N-hydroxysuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane impermeant, protein cross-linkers. **Biochemistry**. v.21, p. 3950-3955, 1982.

SUÁREZ BALLESTEROS, C. A., Dissertação (mestrado): **Síntese e caracterização de nanopartículas Fe₃O₄@Au e desenvolvimento de sensores para aplicações em nanomedicina**. São Carlos, 104 p. 2012.

TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, p. 606-623, 2008.

THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens. Bioelectron.**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.

THUY, N. T.; TAM, P. D.; TUAN, M. A.; CHIEN, N. D.; THU, V. V. Impact parameters investigation of DNA immobilisation process on DNA sensor response. **Int. J. Nanotechnology**, Vol. 10, n. 3/4, 2013.

TRINDADE, E. K. G. Dissertação (Mestrado): **Desenvolvimento de nanoimunossensor para identificação de anticorpos contra o vírus da hepatite B**. Recife, 2015. 72 p.

ULMAN, A., Formation and structure of self assembled monolayers, **Chem. Rev.**, v. 96, n. 4, pp.1533-1554, 1996.

ULTCHAK, A. A. de M. S. Organismos Geneticamente Modificados: A legalização no Brasil e o desenvolvimento sustentável. **R. Inter. Interdisc. INTERthesis**, v.15, n.2, p.125-142. 2018

VIDOTTI, M.; CARVALHA, R. F.; MENDES, R. K.; FERREIRA, D. C. M.; KUBOTA, L. T. Biosensors based on gold nanostructures. **J. Braz. Chem. Soc.** v.22, n.1, p.3-20, 2011.

WOLCOTT, M.J., Advances in nucleic acid-based detection methods. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 5, n. 4, p. 370–386, 1992.

WANG, J. **Anal. Electrochem.** 3rd edition, Wiley-VCH. 272 p. 2006.

WANG, J., PNA biosensors for nucleic acid detection. **Curr. Issues Mol. Biol.** v. 1, n.1-2, p. 117–122, 1999.

WANG, J. From ADN Biosensors to Gene Chips. **Nucleic Acids Res.**, v.28, n.16,p. 3011-3016, 2000.

WANG, J.; SHENG, Q.L.; TIAN, N.; CHEN, L.Y.; XU, Z.Q.; ZHENG, J.B.; Electrochemical detection of the neomycin phosphotransferase gene (NPT-II) in transgenic plants with a novel DNA biosensor. **J. Appl. Electrochem.** v.39, n. 6, p. 935–945, 2009.

WANG, L. Y., LUO, J., FAN, Q., SUZUKI, M., SUZUKI, I. S., ENGELHARD, M. H., LIN, Y. H., KIM, N., WANG, J. Q., ZHONG, C. J. Monodispered core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, n. 46, p. 21593-21601, 2005.

XU, K, HUANG, J., YE, Z, YING, Y., LI, Y. Review: Recent Development of Nano-Materials Used in DNA Biosensors. **Sensors**, v. 9, n. 7, p. 5534-5557, 2009.

WANG, Q.; ZHANG, B.; LIN, X.; WENG, W. Hybridization biosensor based on the covalent immobilization of probe DNA on chitosanmutiwalled carbon nanotubes nanocomposite by using glutaraldehyde as an arm linker. **Sens. Actuat. B-Chem.** v.156, p. 599–605, 2011.

WANG, Y.; Al. E. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. **Sensors**, v.8, n.1, p. 2043- 2081,2008.

YOON, J. Y. **Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors**. Springer, 331 p. 2012.

XU, Z. C., HOU, Y. L., SUN, S. H. Magnetic core/shell Fe₃O₄/Au/Ag nanoparticles with tunable plasmonic properties. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n.28, p. 8698-8699, 2007.

XU, K., HUANG, J., YE, Z., YING, Y., LI, Y. Review: Recent development of nano-materials used in DNA biosensors. **Sensors**. v. 9. n. 7, 5534-5557, 2009.

ZACCO, E.; GALVE, R.; MARCO, M. P.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M. I. Electrochemical biosensing of pesticide residues based on affinity biocomposite platforms. **Biosens. Bioelectron.**, v. 22, n. 8, p. 1707-1715, Mar. 2007.

ZEEMAN,R.; DIJKSTRA, P.J.; VAN WACHEM,P.B.; M.J.A., VAN LUYN, M. HENDRIK, P.T. CAHALAN, J. FEIJEN, Successive epoxy and carbodiimide cross-linking of dermal sheep collagen. **Biomaterials**.v. 20, n. 10, p. 921–931,1999.

ZHOU, NANDI; WANG, JING; CHEN, TING; YU, ZHIGUO; LI, GENXI. Enlargement of Gold Nanoparticles on the Surface of a Self-Assembled Monolayer Modified Electrode: A Mode in Biosensor Design. **Anal. Chem.**, v.78, n.14, p 5227–5230, 2006.

ZOSKI, C. G. **Handbook of Eletrochemistry**. Elsevier, The Netherlands, 934 p. 2007.

ANEXO
(DECLARAÇÃO DE DEPÓSITO DE PATENTE)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA - PROPESQ
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, DECLARA para as finalidades de direito, a requerimento de JULIANA BEATRIZ SOUSA– Doutoranda , que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE, com data de entrada neste órgão em 20/09/2018, cujo título denomina-se "**ELETRODO FLEXÍVEL DE Au PARA MAGNETOENSAIOS**", do qual a solicitante participa como inventor (a), e que está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (IN 031/13 e LPI 9.279/96 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquirida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 06/11/2018.

Prof. Dr. Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

**APÊNDICE A
(RESUMO DA PATENTE)**

RESUMO**“ELETRODO FLEXÍVEL DE Au PARA MAGNETOENSAIOS”**

A presente invenção refere-se à confecção de um eletrodo flexível de ouro (EFAu) montado manualmente, utilizando um substrato recoberto com ouro à partir da deposição de um filme fino de ouro numa folha de poliéster pelo processo de sputtering, para aplicação na produção de biosensores eletroquímicos e utilização em magnetoensaios com nanopartículas, destinados principalmente para análise de moléculas e biomoléculas, orgânicas e inorgânicas, tais como: enzimas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), anticorpos ou antígenos, micro-organismos, células animais e vegetais, cortes de tecidos, fármacos, neurotransmissores, poluentes químicos.

**APÊNDICE B
(REIVINDICAÇÕES DA PATENTE)**

REIVINDICAÇÕES

1. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) caracterizado por ser montado com um pequeno pedaço de folha de acetato, previamente recoberta com ouro pela técnica de Sputtering, utilizando-se fitas de plástico adesivas e um contato de fita de cobre ligado ao ouro, que pode ser aplicado a diversas análises eletroquímicas, podendo ser aplicado no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos em situações em que sejam ou não necessários o meio magnético, possuindo baixo custo, fácil montagem e aplicação, alta estabilidade eletroquímica, reprodutibilidade e capacidade de ser reutilizável de forma fácil e segura.
2. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por apresentar 99,0 a 99,9% de pureza e entre 60 e 200 nm, preferencialmente de 80 a 110 nanômetros.
3. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 e 2 caracterizado por apresentar variação na área de trabalho nos intervalos de 1 a 10 milímetros de diâmetro.
4. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 a 3 caracterizado por apresentar faixa de potencial de trabalho amplo, compreendido entre -1,5 a 1,5 volts, em eletrólitos suporte como ácidos, neutros e básicos.
5. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 a 4 caracterizado por apresentar facilidade de limpeza eletroquímica em soluções ácidas, preferencialmente usando ácido sulfúrico em concentrações de 0,05 a 1,0 mol/L.
6. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 a 5 caracterizado por ser utilizado para ancoragem de moléculas e biomoléculas, orgânicas e inorgânicas, tais como: enzimas, ácidos nucleicos (DNA e RNA), anticorpos ou antígenos, micro-organismos, células animais e vegetais, cortes de tecidos, fármacos, neurotransmissores, poluentes químicos e dentre outros.

7. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 a 6 caracterizado por ser de fácil adequação à célula eletroquímica das mais diversas formas: quadradas, redondas, cônicas e etc.
8. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 a 7 caracterizado por ser de fácil adequação à ensaios com o eletrodo de trabalho mergulhado em solução posicionado na horizontal ou na vertical utilizando ou não nanopartículas (NP), preferencialmente de Fe_3O_4 ou NP de Fe_3O_4 revestidas com ouro ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$) do tipo core@shell como nanoplataformas presas ao eletrodo de trabalho por meio de imã ou folha imantada.
9. Eletrodo flexível de ouro (EFAu) de acordo com a reivindicação 1 a 8 caracterizado por ser de fácil adequação à ensaios com o eletrodo de trabalho posicionado na horizontal utilizando um eletrodo misto usado como $\text{Cl}|\text{KCl}(\text{sat})$, com solução saturada de KCl, externa e o contra eletrodo de platina), posicionado a 90° e exatamente em cima da área ativa do eletrodo.

**APÊNDICE C
(CAPÍTULO DE LIVRO)**

Biosensors as Advanced Device for the Transgenic Plants and Food and Detection

Juliana B. Sousa*, Joilson Ramos-Jesus**, Rosana Anita S. Fonseca[†],
Cristina Delerue-Matos[‡], Maria Fátima Barroso[‡], José Ribeiro Santos, Jr.*

*Center of Natural Sciences, Federal University of Piauí, Teresina, Piauí, Brasil; **Federal University of Piauí, Parnaíba, Piauí, Brasil; [†]Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil; [‡]REQUIMTE/LAQV School of Engineering of Polytechnic of Porto, Porto, Portugal

1 Introduction

The development of biotechnology has improved agriculture through the introduction of genetically modified organisms (GMO), which have characteristics of agronomic interest. The International Service Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) reported that 18 million farmers cultivated GM crops on over 181.5 million ha across 28 countries in 2014. However, these GM crops are not homogeneously disseminated over the world. Latin American, Asian, and African farmers cultivated 53% of the GM crops. The United States, Brazil, and Argentina are the leading producers of GM crops cultivating 73.1, 42.2, and 24.3 million ha, respectively. In Africa, South Africa, Burkina Faso, and Sudan planted 2.7, 0.5, and 0.1 million ha of GM crops, respectively. India and China recorded the highest area of GM crops in Asia with 11.6 and 3.9 million ha, respectively. In the European Union (EU), Spain, Portugal, Romania, Slovakia, and the Czech Republic planted 143,016 ha of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) maize; Spain was by far the largest producer, planting 92% of the total *Bt* maize hectareage (James, 2014).

Approximately 130 GMOs have been authorized for commercial use as food and/or feed. Of the total global crop area, 82% is used for soybeans, 68% for cotton, 30% for maize, and 25% for oilseed rape. These crops or by-products from these crops are also common ingredients of food and composite feeds for food-producing animals (Bawa and Anilakumar, 2013).

According to the World Health Organization “GMOs are organisms, with the exception of human beings, in which the genetic material has been altered in a way that does not occur naturally” (Tagliabue, 2016). The cultivation of GMOs presents several advantages, such as enhanced yield and quality of harvests. The insertion of an exogenous DNA fragment into the

**APÊNDICE D
(ARTIGO SUBMETIDO)**

Manuscript Number:

Title: Electrochemical genosensing of the HMGA maize endogenous gene using Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles as magnetoplatfom

Article Type: Research Paper

Section/Category: Nucleic Acids/Molecular Biology

Keywords: magnetic nanoparticles, core@shell, electrochemical genosensors, GMO, maize, HMGA gene

Corresponding Author: Dr. Jose Ribeiro Santos Junior, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

First Author: Jose Ribeiro Santos Junior, Ph.D.

Order of Authors: Jose Ribeiro Santos Junior, Ph.D.; Juliana B Sousa, Mestre; Joilson R Jesus, Doutorado; Lêda C Silva, Doutorado; Clara Pereira, Doutorado; Noemi de los-Santos-Álvares, Doutorado; Rosana A Fonseca, Doutorado; Rebeca M Castro, Doutorado; Cristina D Matos, Doutorado; Maria F Barroso, Doutorado

Abstract: This work addresses a technological advance applied to the development of an electrochemical magnetogenoassay for the maize taxon specific target detection (HMGA gene) using gold-coated magnetic nanoparticles as nanosized platform. Superparamagnetic core-shell Fe₃O₄@Au nanoparticles (10.4 ± 1.7 nm) were used to assemble the genoassay through the covalent immobilization of HMGA DNA probes onto carboxylated self-assembled monolayers at the nanoparticles surface. A sandwich hybridisation format was selected as a way to prevent inefficient hybridisation associated with stable secondary DNA target structures using also a fluorescein isothiocyanate (FITC) as DNA signaling tag. The labelling of the hybridisation reaction with anti-FITC-peroxidase Fab fragment conjugate permitted the chronoamperometric measurement of the peroxidase activity captured at the nanoplatfom placed on gold surface. The electrochemical magnetogenoassay provided a linear range from 0.5-5 nM with correlation coefficient of 0.9995, LOD of 0.09 nM and LOQ of 0.31 nM with a reproducibility <1.2%. Certified samples containing maize were assessed without further purification after PCR amplification. The results highlight the efficiency of the electrochemical magnetogenoassay for the HMGA detection, showing its potential as alternative methodology for the verification of the compliance of the legislation.

Suggested Reviewers: Patricia Molina Ph,D
Reviewers, Chemistry, University of Rio Cuarto (UNRC) - Argentina
pmolina@exa.unrc.edu.ar
Expert in electrochemistry, nanomaterials and biosensors

Maria Fraga Ph,D

Reviewers, Analytical Chemistry, University of Vigo, Spain
maria.fraga.corral@hotmail.es
Expert in nanomaterials

Emmanuel Odella Ph,D
Reviewers, Chemistry, Arizona State University
Emmanuel.Odella@asu.edu
Expert in nanomaterials and electrochemistry

Nancy A Da Silva Ph,D
Reviewers, Chemical and Biomolecular Engineering, University of
California at Irvine, Irvine, California, USA
ndasilva@uci.edu
Expert in: molecular biotechnology.

***Manuscript**

[Click here to view linked References](#)

Electrochemical genosensing of the HMGA maize endogenous gene using Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles as magnetoplatfom

Author names and affiliations

Juliana Beatriz Sousa^{1,3}, Joilson Ramos-Jesus⁴, L. C. Silva⁵, C. Pereira⁵, N. de los-Santos-Álvarez⁷, Rosana A. S. Fonseca⁵, R. Miranda-Castro⁷, C. Delerue-Matos³, M. Fátima Barroso³, José Ribeiro dos Santos Júnior^{1,2,3*}

¹Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 64049-550, Teresina-PI, Brazil;

²Departamento de Química. Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí - UFPI, 64049-550, Teresina-PI, Brazil.

³REQUIMTE/LAQV, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, Porto, Portugal;

⁴Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, UFPI;

⁵Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UPE, Recife, Brazil.

⁶REQUIMTE/LAQV, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, UPUiversidade do Porto, Porto, Portugal;

⁷Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

*** Contact information for corresponding author:**

Tel.: +5586988199407; E-mail: jribeiro@ufpi.edu.br

ABSTRACT

This work addresses a technological advance applied to the development of an electrochemical magnetogenoassay for the maize taxon specific target detection (HMGA gene) using gold-coated magnetic nanoparticles as nanosized platform. Superparamagnetic core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nanoparticles (10.4 ± 1.7 nm) were used to assemble the genoassay through the covalent immobilization of HMGA DNA probes onto carboxylated self-assembled monolayers at the nanoparticles surface. A sandwich hybridization format was selected as a way to prevent inefficient hybridization associated with stable secondary DNA target structures using also a fluorescein isothiocyanate (FITC) as DNA signaling tag. The labelling of the hybridization reaction with anti-FITC-peroxidase Fab fragment conjugate permitted the chronoamperometric measurement of the peroxidase activity captured at the nanoplatform placed on gold surface. The electrochemical magnetogenoassay provided a linear range from 0.5-5 nM with correlation coefficient of 0.9995, LOD of 0.09 nM and LOQ of 0.31 nM with a reproducibility <1.2%. Certified samples containing maize were assessed without further purification after PCR amplification. The results highlight the efficiency of the electrochemical magnetogenoassay for the HMGA detection, showing its potential as alternative methodology for the verification of the compliance of the legislation.

Keywords: magnetic nanoparticles, core@shell, electrochemical genosensors, GMO, maize, HMGA gene