

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
BASEADO EM ÁCIDO MERCAPTOBENZÓICO (AMB) E
NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS**

MAURÍLIA PALMEIRA DA COSTA

RECIFE

2014

MAURÍLIA PALMEIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
BASEADO EM ÁCIDO MERCAPTOBENZÓICO (AMB) E
NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS**

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Maria Danielly Lima de Oliveira

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade

RECIFE

2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Cristina Barroso
CRB 1728

Costa, Maurilia Palmeira da

Desenvolvimento de biossensor impedimétrico para detecção de *Mycobacterium tuberculosis* baseado em ácido mercaptobenzóico (AMB) e nanopartículas magnéticas/
Maurilia Palmeira da Costa – Recife: O Autor, 2014.

72 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Danielly Lima de Oliveira

Coorientador: Cesar Augusto Souza de Andrade

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia e apêndices

1. Tuberculose 2. *Mycobacterium tuberculosis* I. Oliveira, Maria Danielly Lima de (orientadora) II. Andrade, Cesar Augusto Souza de (coorientador) III. Título

616.995

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-210

MAURÍLIA PALMEIRA DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR IMPEDIMÉTRICO
PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*
BASEADO EM ÁCIDO MERCAPTOBENZÓICO (AMB) E
NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS**

Dissertação apresentada para o
cumprimento das exigências para obtenção
do título de Mestre em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade Federal de
Pernambuco.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica/UFPE-(Membro Externo)

Prof. Dr. Kleber Gonçalves Bezerra Alves
Programa de Pós-graduação em Engenharia Mecânica/UFPE-(Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia
Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia/UFPE-(Membro Interno)

Aprovada em 30/07/2014

Aos meus amados pais, Maurílio e Selma,

Minha irmã Maurianny...

... por todo amor, carinho e paciência..

...dedico.

AGRADECIMENTOS

Por estar sempre comigo sendo minha Força, Fortaleza nos momentos difíceis em que não me deixava fraquejar, confirmando a cada dia que eu não estou só. E em Ti tudo é possível quando se tem Fé, Agradeço a Deus hoje e sempre!

Aos meus Queridos e Amados Pais pelo amor incondicional, pela paciência, por ficarem felizes quando tudo estava saindo bem e por me ampararem quando as coisas davam erradas e sempre falavam: calma filha você vai dar certo. Por sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida, pelo apoio, e principalmente por reafirmarem que caráter e educação são as maiores heranças que se pode deixar para um filho. Por vocês o mais sublime indescritível amor!

A minha querida irmã Maurianny por sempre me apoiar e acreditar que sou capaz e nunca me deixar desistir, com suas palavras fortalecedoras e suas orações. Além de suas opiniões como avaliadora dos meus trabalhos e apresentações e ajudou muito.

É nossa essa conquista!!!

A minha prima Amanda que sempre me ajudava com as impressões dos trabalhos que muitas vezes mandados de última hora. Além do apoio e força!

Agradecimento muito especial a minha Orientadora a Prof. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira, por ter me dado a oportunidade de começar e concluir esse trabalho de mestrado. Sua forma de orientar, tornando a todos do grupo cada vez mais independentes na busca pelo conhecimento, sempre presente quando as dúvidas surgiam ou quando as ideias pareciam nos abandonar!

O meu co-Orientador Prof. Dr. Cesar Augusto Souza de Andrade, pelas dicas e discussões sobre o andamento do projeto, além de estar sempre presente para nos auxiliar, mesmo estando com inúmeros trabalhos para fazer, mas quando chamávamos ele deixava tudo e nos dava atenção para compreender nos experimentos!

O Fábio Lopes de Melo pela colaboração com o material cedido para que as pesquisas pudessem ser iniciadas e concluídas!

Agradeço a todos do grupo Laboratório de Biodispositivos Nanoestruturados-BIONANO. Em especial: Débora Máximo, Elton Egito, Karen Yasmin, Estéfani Pontes que cediam seus dias de realizar experimentos para que eu pudesse dar continuidade aos meus, a vocês muito obrigada! O Vinicius Jackes pela companhia constante no laboratório, nas dúvidas com a montagem dos gráficos e quando terminávamos tarde esperava eu pegar o ônibus. Amigo obrigado!

Às amigas; Flávia Garcia, Gisele Soares, Jéssica Miranda, Tamiris Alves por cada palavra de consolo, de apoio e incentivo e também pelo carinho e amizade.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pelo conhecimento e experiências repassados durante as aulas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial Djalma pela ajuda com as questões burocráticas.

A FACEPE pelo apoio financeiro.

E a todos que contribuiu direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Obrigado, Deus abençoe!

*Para tudo há um tempo, para cada coisa a um momento debaixo
do céu:*

Tempo de nascer e tempo de morrer;

Tempo de plantar e tempo de arrancar;

Tempo de chorar e tempo de rir.

*As coisas que Deus fez são boas a seu tempo, sem que ninguém possa
compreender a obra divina de um extremo a outro.*

(Eclesiastes 2. 3)

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR IMPEDIMÉTRICO PARA DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* BASEADO EM ÁCIDO MERCAPTобенzóICO (AMB) E NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.

No presente trabalho foi desenvolvido um sistema de detecção eletroquímica, baseado num biossensor impedimétrico para detecção do *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Na superfície do eletrodo de ouro foram testadas dois tipos de sonda de tuberculose (TB), inicialmente foi imobilizado na superfície do eletrodo a poli (alilamina)-(PAH) com a nanopartícula magnética (NpsFe₃O₄) e o primer de tuberculose (TB) para montagem da sonda de TB. Na montagem da segunda sonda foi utilizado o ácido mercaptobenzoico (AMB) com a nanopartícula magnética (NpsFe₃O₄) modificada com o aminopropiltrimetoxisilano (ATPES) e o primer de TB modificado com o glutaraldeído (Glut). O objetivo da utilização dessas modificações foi no intuito de avaliar qual das plataformas montadas apresenta uma melhor sensibilidade para a detecção do genoma do MTB. A interação das sondas-genoma foi realizada utilizando o par redox [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻. A montagem da sonda foi realizada com deposição de PAH no eletrodo por 20 minutos em seguida a NpsFe₃O₄ também por 20 minutos e posteriormente o primer de TB por 30 minutos. Para o segundo modelo o AMB foi depositado na superfície do eletrodo por 2 minutos em seguida a NpsFe₃O₄ modificada com ATPES por 4 minutos e por fim o Glut-primer de TB por 30 minutos. Nesta plataforma foram avaliadas as variações das concentrações do primer de TB que foram de (6, 12, 20, 30 e 40ng) além da variação do tempo que foi de (1, 5, 10, 20 e 30 minutos), como também a avaliação do controle negativo que utilizou o genoma do *Schistosoma mansoni*. Cada sensor foi avaliado pelas técnicas de voltametria cíclica (VC), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para avaliação do comportamento eletroquímico dos sensores, como também pela microscopia de força atômica (AFM) que foi utilizada para o sensor contendo o AMB. O sensor em presença da PAH apresentou uma baixa sensibilidade tanto em VC como EIE. O biossensor com o AMB apresentou uma melhor sensibilidade como também frente ao MTB e ao controle negativo. Este sensor apresentou uma diferença de potencial notável além de uma maior transferência de carga elétrica do sistema para montagem da sonda de TB além de um sinal distinto frente ao controle negativo. As plataformas em presença de (PAH e AMB) avaliadas a que apresentou uma melhor resposta com excelente sensibilidade foi em presença do AMB. Esta pode ser empregada para identificação do genoma do MTB.

PALAVRAS-CHAVES: Tuberculose, Biossensor, Impedância, Voltametria,

ABSTRACT

BIOSENSOR IMPEDIMETRIC DEVELOPMENT FOR DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS BASED MERCAPTOBENZOIC ACID AND MAGNETIC NANOPARTICLES.

In this work an electrochemical detection system, based on impedimetric detection of Mycobacterium tuberculosis (MTB) biosensor was developed. On the surface of the gold electrode probe of two types of tuberculosis (TB) have been tested, initially was immobilized on the electrode surface of poly (allylamine)-(PAH) with magnetic nanoparticle (NpsFe₃O₄) and the primer of tuberculosis (TB) for mounting the probe TB. In the assembly of the second probe mercaptobenzoic acid (AMB) with a magnetic nanoparticle (NpsFe₃O₄) modified with aminopropyltrimethoxysilane (ATPES) and primer TB modified with glutaraldehyde (Glut) was used. The purpose of these modifications was the use in order to evaluate which mounted platforms presents a better sensitivity for the detection of MTB genome. The interaction of the probes, genome was performed using the redox couple [Fe (CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻. The probe assembly was performed with the electrode PAH deposition for 20 minutes followed by the NpsFe₃O₄ for 20 minutes and also after the primer TB for 30 minutes. For the second model of the AMB was deposited on the electrode surface for 2 minutes and then the modified NpsFe₃O₄ ATPES for 4 minutes and finally the primer Glut-TB for 30 minutes. This platform was evaluated variations of the primer concentrations that were TB (6, 12, 20, 30 and 40ng) plus variation of the time it was (1, 5, 10, 20 and 30 minutes), as well as the assessment of negative control used the genome of *Schistosoma mansoni*. Each sensor was evaluated by cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to evaluate the electrochemical behavior of the sensors, as well as by atomic force microscopy (AFM) that was used for the sensor containing the AMB. The presence of PAH sensor has a low sensitivity in both VC and EIS. The biosensor with AMB showed better sensitivity but also against MTB and the negative control. The sensor showed a remarkable potential difference and a greater transfer of power to the system load TB probe assembly including a distinct signal compared to negative control. The platforms in the presence of (PAH and AMB) evaluated that showed better response with excellent sensitivity was in the presence of AMB. This can be used for identification of MTB genome.

KEYWORDS: Tuberculosis, Biosensor, Impedance, Voltammetry

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas	xix
1. CAPITULO I	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
2. CAPITULO II	4
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.2 Tuberculose: Aspectos epidemiológicos	4
2.3 Agente etiológico	6
2.4 Métodos convencionais para diagnostico da tuberculose	7
2.5 Biossensores	9
2.5.1 Genossensores	12
2.7. Modificação da Superfície Sensora	14
2.7.1 Poli (alilamina) e Ácido mercaptobenzóico(AMB)	14
2.7.2 Nanopartículas Magnética	15
2.7.3 Imobilização do sistema sensor	16
2.8. Métodos Eletroquímicos	18
2.8.1 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica	19
2.8.2 Voltametria cíclica	21
2.8.3 Microscopia de força atômica	24

3. CAPÍTULO III	27
3.1 OBJETIVOS	27
3.2 Objetivo Geral	22
3.3 Objetivo Especifico	27
4. CAPÍTULO IV	28
4.1 METODOLOGIA	28
4.2 Materiais	28
4.3 Síntese de Nanopartículas Magnéticas (NpsFe₃O₄) e obtenção de NpsFe₃O₄ modificadas	28
4.4 Preparação do Sistema PAH-NpsFe₃O₄-Sonda tuberculose	28
4.5 Preparação do Sistema AMB-NpsFe₃O₄-Sonda tuberculose	29
4.6 Caracterização Morfológica	29
4.7 Medidas de VC e EIE	29
5. CAPÍTULO V	30
5.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	30
5.2 CONCLUSÃO	40
6. ARTIGO	41
7. APÊNDICE DAS FIGURAS DO ARTIGO	65
7.1. FIGURA 1	65
7.2 FIGURA 2	66
7.3 FIGURA 3	67
7.4 FIGURA 4	68
7.5 FIGURA 5	69
8. APÊNDICE DAS TABELAS DO ARTIGO	70
8.1 TABELA 1	70
8.2 TABELA 2	71

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

Figura 1. Representação ilustrativa do Bacilo Mycobacterim Tuberculosis-----	6
Figura 2. Representação básica de um biossensor e seus componentes-----	8
Figura 3. Representação molecular da estrutura da poli (alilamina)-----	13
Figura 4. Representação do processo de modificação química da superfície eletroquímica pela ativação da carboiimida-----	16
Figura 5. Representação gráfica do diagrama da impedância de Nyquist-----	19
Figura 6. Representação esquemática de uma célula eletroquímica-----	20
Figura 7. Representação do gráfico padrão para voltametria cíclica em sistema reversível-----	21
Figura 8. Representação esquemática do funcionamento de um microscópio de força atômica-----	23
Figura 9. Representação do gráfico de força interatômica-----	24

ARTIGO: “Self-Assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor”.

Figure 1. Schematic representation of the fabrication process of the biosensor.

Figure 2. 3D and 2D AFM images of the BGE coated with $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ (**a**), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -probe (**b**), MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe-complementary DNA (**c**) and MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe non-complementary DNA (**d**), with the corresponding cross section.

Figure 3. Cyclic voltammograms (**a**) and Nyquist plots (**b**) of the stepwise immobilization of the MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe: bare gold electrode (**■**), MBA-

modified gold electrode (\blacktriangle), MBA-EDC/NHS (\blacklozenge), MBA-Fe₃O₄Nps (\times), MBA-Fe₃O₄Nps-EDC/NHS (\circ) and MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe ($+$). R_{CT} of DNA probe-tuberculosis versus time of incubation (**c**). The impedance spectra were taken in 10 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz.

Figure 4. Cyclic voltammograms (**a**), Nyquist plots (**b**) and Bode plots (**d**) of the sensor system and its respective interaction with genomic DNA target at different concentrations. Supporting electrolyte: 10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) solution; scan rate of 50 mV.s⁻¹. Equivalent circuit (**c**) adopted to fit the impedance data where R_{Ω} is the ohmic resistance of the electrolyte solution, Q the phase constant element, Z_W the Warburg impedance, and R_{CT} the electron-transfer resistance.

Figure 5. $\Delta R_{CT}\%$ of the sensor system after exposure to different concentrations of TB genomic DNA target (**a**) and Θ as a function of concentration of DNA target (**b**).

LISTAS DE TABELAS

ARTIGO: “Self-Assembled monolayers of mercaptobenzoic acid and magnetite nanoparticles as an efficient support for development of tuberculosis genosensor”.

Table 1. Amperometric anodic shift for the sensor before and after the hybridization with TB genomic DNA target.

Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

LISTAS DE ABREVIATURAS

AFM- Microscopia de força atômica
AIDS- Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMB- Ácido mercaptobenzóico
ATPES- Aminopropiltrimetoxisilano
BAAR- Bacilos Álcool-Ácido Resistente
EDC- N-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EIE- Espectroscopia de impedância eletroquímica
GLUT- Glutaraldeído
MTB- Mycobacterium tuberculosis
NHS- N-hydroxisuccinimida
PAH- Poli (alilamina)
PCR- Reação em Cadeia da Polimerase
TB- Tuberculose
VC- Voltametria cíclica

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* que é uma bactéria patogênica sendo está uma das principais causas de morte (Torres-Chavolla et al, 2009),cerca de um terço da população humana é infectada com a tuberculose em todo o mundo (World Health Organization, 2003). A TB é um problema de saúde pública e pode surgir como complicação oriunda da síndrome da imunodeficiência adquirida. A partir daí vem à necessidade de empregar um diagnóstico rápido para que seja iniciado o tratamento da infecção e conseqüentemente ocorre o controle da infecção, pelo fato de que um paciente que tenha adquirido a TB e não esteja em tratamento pode transmitir está doença em média para 12-15 pessoas/ano (Yeo et al., 2009).

Os métodos tradicionais para diagnóstico da tuberculose são divididos em: bacteriológicos, radiológicos, moleculares e imunológicos. Os métodos bacteriológicos são constituídos pelo exame direto e o de cultura. O primeiro é a baciloscopia em que a visualização do bacilo após sua fixação na lamina é feita por Ziehl-Nielsen numa coloração específica (ZN) (Brasil 2008). Esta técnica apresenta sensibilidade limitada, pois necessita de 5.000 a 10.000 bacilos por mL de amostra de escarro para obtenção do resultado positivo possibilitando na obtenção de resultados falso-negativos (Castelo filho et al., 2004; Lima et al., 2008). O método de cultura que é realizado através do isolamento do *M. tuberculosis* permite a confirmação do diagnóstico de TB (Arnold 2007). Esta técnica apresenta limitação, pois requer de 3 a 8 semanas para obter o resultado por esse motivo ocorre retardo no diagnóstico e no tratamento do indivíduo (American Thoracic society, 2000). O método radiológico constitui diagnóstico por imagem da radiografia do tórax apresenta facilidade na sua realização fornecendo informações concisas sobre a investigação da tuberculose no paciente. Mas 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam informações radiológicas o que compromete a empregabilidade desta técnica além da necessidade de um método que não apresente restrições (Comissão de tuberculose da sociedade brasileira de pneumologia e fisiologia, 2009). O método molecular é realizado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) que propõe a amplificação do DNA da fita simples ou dupla ou também do RNA para diagnóstico da TB e com isso fornece um diagnóstico precoce para estabelecimento do tratamento(Almeda et al., 2000; Broccolo et al., 2003; Melo et al., 2005; Green et al.,

2009). A sensibilidade desta técnica está relacionada com o número de cópias da sequência alvo presente no genoma do patógeno (Poroca et al., 2009). Já o método imunológico é realizado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) que é bastante utilizado para detecção de reações entre os anticorpos do soro humano e os marcadores antigênicos do *M. tuberculosis* (Pereira Arias Bouta et al., 2003).

O uso de métodos com ácidos nucleicos são importantes para o diagnóstico e no monitoramento de doenças infecciosas (Karaa et al., 2009). Os recentes avanços em biossensores baseado na hibridização de ácidos nucleicos têm levado ao desenvolvimento da tecnologia em genossensores para as análises da sequência de DNA (Erdem et al., 2000). Especificamente, os biossensores eletroquímicos baseados em hibridização demonstram grande promessa para a identificação de patógenos, detecção de polimorfismos e determinação de sequência genômica (Wong et al., 2005).

Diversas técnicas incluindo a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a voltametria cíclica (VC) têm sido amplamente aplicadas (Oliveira et al., 2011), com propósito de complementar os estudos na bioeletroquímica (Oliveira et al., 2008) para desenvolvimento de biodispositivos (Oliveira et al., 2008). Em adição, a ressonância de plásmons de superfície e microbalança de cristal de quartzo também têm sido utilizadas para o desenvolvimento de genossensores. As técnicas eletroquímicas oferecem sensibilidade e seletividade com baixo custo para a detecção de sequências de DNA associadas a doenças humanas (Zhang et al., 2006) apresentando uma capacidade atrativa em converter o evento de hibridização em um sinal analítico (Xue et al., 2007).

É crescente o interesse da utilização de partículas magnéticas para imobilização de biomoléculas por apresentar biocompatibilidade e superparamagnetismo além de fornecer eficiente contato entre o biocatalisador e seus substratos (Lu et al., 2006; Huang et al., 2008). Porque as nanopartículas metálicas apresentam características como: relação de grande superfície para volume, atividade de reação de superfície elevada, alta eficiência catalítica além de uma forte capacidade de adsorção, como também apresenta uma variedade de aplicações biomédicas e tecnológicas (Kurlyandskaya et al., 2007; Zhang et al., 2008).

Desta forma, partículas magnéticas, como por exemplo, nanopartículas de óxido de ferro (NPsFe_3O_4) têm sido utilizadas como alvo de estudo para a imobilização de biomoléculas devido às suas propriedades que as tornam elementos essenciais para o desenvolvimento de sistemas biossensíveis.

As aplicações para o desenvolvimento de genossensores incluem a possibilidade da detecção de patologias, tal como a TB em indivíduos com infecção aguda ou latente. Além disso, com uma sonda para a TB imobilizada no sistema NPsFe_3O_4 e matriz polimérica de hidrócloro de poli(alilamina) (HPA) e ligada covalentemente esperamos desenvolver um sistema sensível através do aumento da área eletroquímica das superfícies avaliadas.

O HPA é um polímero catiônico com vários grupos aminas ionizáveis em sua estrutura, o que permite a modificação química covalente e interação eletrostática com biomoléculas. Em adição, os compostos formados por nanopartículas metálicas e polímeros são um exemplo de nanomaterial que possuem a capacidade de melhorar o sinal elétrico (Ahn et al., 2005). Desta forma, o HPA presta-se para o estudo da interação da sonda de TB na superfície do sistema NPsFe_3O_4 -HPA para detecção e reconhecimento do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*. Além disso, a possibilidade de imobilização covalente da sonda em camadas automontadas de ácido mercaptobenzóico e NPsFe_3O_4 torna-se uma estratégia promissora para o desenvolvimento de biodispositivos, sendo assim uma possibilidade de comparação de modificação de superfície eletroquímica por adsorção física e modificação covalente. Desta forma, os sistemas NPsFe_3O_4 -HPA-sondaTB e NPsFe_3O_4 -sondaTB poderão ser aplicados para detecção de *M. tuberculosis* em amostras de pacientes contaminados.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tuberculose: Aspectos epidemiológicos

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa transmissível mais antiga do mundo, com a existência de relatos que evidenciam essa patologia em esqueletos humanos datados de 8.000 a 5.000 a.C. na França, Itália, Alemanha, Dinamarca e Jordânia, e em múmias egípcias de 3.500 a 4.000 a.C. que apresentaram deformidades sugestivas de tuberculose vertebral (Coberly, Chaisson, 2011).

Quadros clínicos que se assemelhavam a tuberculose já eram descritos por povos orientais, como os Hindus e Chineses, desde 2.000 a.C. Hipócrates, o pai da medicina, descreveu em 380 a.C. a doença como definhamento devido às lesões caseosas que ela provocava (Conde et al., 2002).

A partir de 1478, época Renascentista, houve o aprofundamento do estudo da histopatologia da TB. Em 1547 Andréas Versalius, publicou a primeira obra de anatomia humana, baseada em dissecações reais, onde foi observado que indivíduos falecidos por tuberculose apresentavam, na maioria das vezes, lesões em suas cavidades pulmonares características de TB. Com a Revolução Industrial no século XVIII, a tuberculose passa a ser considerada uma epidemia, devido ao surgimento de cidades populosas, desorganizadas, como também o trabalho exaustivo do proletariado em fábricas com péssimas condições de trabalho e falta de higiene, disseminando deste modo pela Europa, Américas e na África (Kritiski et al., 2000).

Robert Koch finalmente isola o agente causador da tuberculose, o *Mycobacterium Tuberculosis (MTB)* por volta de 1882 que é comumente conhecido como bacilo de Koch, recebendo mais tarde o Prêmio Nobel de Medicina. A descoberta de Koch forneceu subsídios para que outros pesquisadores desenvolvessem novas terapias mais eficazes para o tratamento de pacientes com tuberculose (Ducati et al., 2006).

Os primeiros indícios da TB no Brasil foram datados por volta da época do descobrimento, trazida por colonizadores jesuítas e escravos africanos. Pelo contato com esses povos os índios adquiriam a TB, por não terem imunidade contra a doença,

morriam rapidamente o que dizimou muitas tribos indígenas em um curto período de tempo (Ribeiro, 1971).

Nos anos 60 foi desenvolvido um esquema tríplice eficaz composto por três antibióticos: estreptomicina, isoniazida e ácido aminossalicílico com duração de 18 a 24 meses imposta no Brasil pelo professor Hélio Fraga, e na década de 80 foram modificados os antibióticos e passou-se a utilizar rifampicina, isoniazida e pirazinamida e o tratamento foi encurtado para 6 meses (Conde et al., 2002).

Devido ao avanço do conhecimento as nações acreditavam que a TB estaria erradicada no fim do século XX ou pelo menos estaria confinada em países pobres. Entretanto, a ocorrência de intensos movimentos migratórios populacionais como também a falta de sistemas públicos de saúde eficazes, crises econômicas, a marginalização crescente das populações rural e urbana e a crescente expansão da epidemia da AIDS, dificultou o controle da tuberculose (Conde et al., 2002).

A tuberculose é uma das doenças mais mortal do mundo, pois em cerca de 1,7 milhões de óbitos registrados anualmente tem sido identificada como uma das principais causas de morte entre pacientes HIV positivos (Who, 2009). Aproximadamente, 95% dos casos de TB ocorrem nos países em desenvolvimento, países esses que detêm 98% dos casos de mortes mundiais pela doença (Khan et al., 2006, OMS, 2009).

Já o Brasil ocupa a 19ª posição entre os 22 países com registro de tuberculose com cerca de registrados 89.626 casos em 2009, sendo 74.470 da forma pulmonar (Brasil/Ministério da Saúde/2009; Ruffino-netto, 2002; Who, 2010). Ao analisar os casos, a região Nordeste apresenta cerca de 12,4% de incidência por 100 mil habitantes (Brasil/Ministério da Saúde/2009). Os fatores responsáveis pelo aumento da incidência desta infecção estão relacionados à multirresistência às drogas, aliada com uma grande desigualdade social, como também consumo de álcool, drogas e pacientes imunodeprimidos (Ducati et al., 2006; Brasil/Ministério da Saúde/2009).

No estado de Pernambuco, foram confirmados 505 casos de tuberculose até o final de março, no ano de 2011. Numa ocorrência de 4.230 casos novos da doença ao ano, o que coloca o estado em 4º lugar a nível nacional em taxa de incidência da doença, com o 2º lugar geral em mortalidade e 1º lugar em número de casos no Nordeste, tendo-se como destaque a capital do Recife, com a maior taxa de incidência (48,2%). Estes dados estão associados a um alto percentual de abandono do tratamento (Tuberculose/Boletim de Vigilância em Saúde/2011). Desta forma, o desenvolvimento

de novas estratégias de diagnóstico de TB por meio de biossensores auxilia no tratamento e erradicação da doença.

2.2 O agente etiológico *Mycobacterium tuberculosis*

Atualmente são encontradas cerca de 120 diferentes espécies de micobactérias (Tortoli, 2006). Sendo que estas espécies estão incluídas no gênero *Mycobacterium*, pertencente à família *Mycobacteriaceae* que compõem a ordem Actinomycetales (Frothingham, 1995).

O gênero *Mycobacterium* apresenta um alto número de espécies, em que muitas são saprófitas do solo, e a minoria das espécies são patogênicas ao homem, causando tuberculose como: (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*) e lepra (*Mycobacterium leprae*), (Tortora et al., 2005). A Figura 1 apresenta o *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura1. *Mycobacterium tuberculosis*.

Fonte: <http://medicineworld.org/images/blogs/11-2007/mycobacterium-tuberculosis>



O *M. tuberculosis* mede de 1 a 4 μm de comprimento por 0,3 a 0,6 μm de largura, apresentar um complexo envelope celular, que é um bacilo imóvel que não forma esporos, não produz toxinas seu reservatório é o ser humano (Kritski et al., 2000).

A Tuberculose é uma doença crônica ou subaguda transmitida por gotículas de saliva contendo os bacilos que são emitidos por um indivíduo que esteja infectado com a doença esse contato ocorre por meio da tosse, espirro ou fala. Quando inaladas por pessoas saudáveis, podem provocar a infecção tuberculosa podendo apresentar períodos de

remissão, retardando o paciente em busca de um serviço médico especializado (Brasil, 2008; American Thoracic Society, 2000).

Com isso pode agravar seu estado clínico e aumentando o tempo de transmissão do bacilo na população. As manifestações clínicas da TB dependem de fatores como (imunodeficiência, desnutrição, álcool, drogas, entre outras) e suas interações, tem influência na apresentação clínica da doença (American Thoracic Society, 2000).

2.4 Métodos convencionais para diagnóstico da tuberculose

Baciloscopia

O diagnóstico da tuberculose é de suma importância para tratamento do paciente, controle da doença como também impedir a disseminação da mesma. O método mais comum utilizado para o diagnóstico é a baciloscopia que é uma pesquisa microscópica de Bacilos Álcool-Ácido Resistente (BAAR) em amostras clínicas de escarro (Vieira et al., 2008). Esta técnica apresenta sensibilidade limitada por necessitar de 5.000 a 10.000 bacilos por ml da amostra de escarro para obter-se um resultado positivo, o que implica na grande possibilidade de resultados falso-negativos. Desta forma, um esfregaço negativo não exclui um caso de TB, o que implica de maneira negativa para sua utilização (Castelo Filho et al., 2004, Lima et al., 2009).

Cultura

Através do método de isolamento do *M. tuberculosis* realizado pela cultura desse bacilo permite o diagnóstico da TB (Arnold, 2007). Para realização do meio de cultura é utilizado o Leowenstein-Jessen que propicia o crescimento de grande parte das micobacterias. O método de cultura é mais sensível que a baciloscopia (API TB Consensus Expert Committee, 2006).

Mas apresenta desvantagens, pois requer cerca de 3 a 8 semanas para obtenção do resultado, ocasionando um retardo na obtenção do resultado do diagnóstico, tendo como consequências o aumento da propagação da TB e início do tratamento. Portanto, 26% dos pacientes brasileiros iniciam o tratamento sem confirmação, com base na associação de critérios clínicos, epidemiológicos, radiológicos e resposta ao tratamento específico (American Thoracic Society, 2000, Noussair et al., 2009, Scherer et al., 2009).

Diagnóstico por imagem

Essa técnica mais conhecida como radiografia do tórax, é indicada como primeiro método utilizado para o diagnóstico da tuberculose quando um paciente é suspeito de ter contraído a infecção, por ser de baixo custo e apresentar facilidade de realização do exame. Mas em casos de pacientes com TB pulmonar muitas vezes não são observadas alterações radiológicas e o destaque está principalmente em pacientes imunodeprimidos, já que necessitam de um exame com resposta rápida para o início do tratamento (Comissão de Tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumonia e Tisiologia, 2009).

Método molecular

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método sensível, específico e vem sendo empregado na detecção de DNA ou RNA de micobactérias presente em amostras clínicas como exemplo: escarro, líquido cefalorraquidiano, lavado brônquico entre outros (MELLO et al., 2005; POROCA, et al., 2009; LIMA et al., 2009). Esta técnica consiste na amplificação de uma região selecionada do DNA de fita simples ou dupla além do RNA. Ao amplificar uma sequência alvo obtém o conhecimento das bases permitindo a síntese de oligonucleotídeos chamados de primers que atua reproduzindo a replicação do DNA *in vitro* (MELLO 2005).

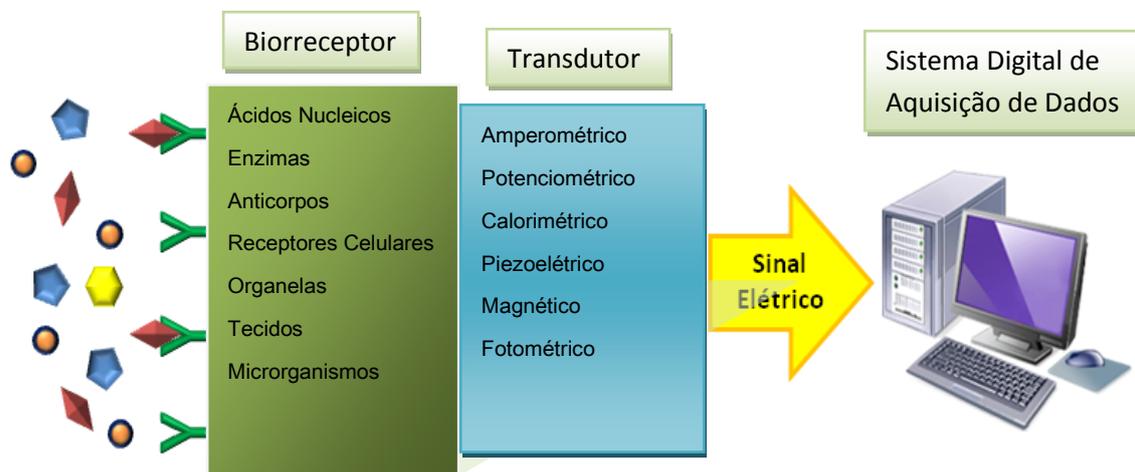
A sensibilidade apresentada pela técnica de PCR está ligada ao número de cópias da sequência alvo presente no genoma do patógeno, tipo da amostra, forma da TB além da escolha de iniciadores e inibidores presentes na amostra clínica (POROCA et al., 2009). Em 2003 um estudo realizado por Sarmiento e colaboradores relacionou a técnica de PCR para o diagnóstico da TB pulmonar com o escarro negativo resultado obtido pela baciloscopia, eles concluíram que esta técnica não pode ser indicada de forma única para o diagnóstico de TB, necessitando ser usada com um padrão de referência que combina cultura, critérios clínicos e epidemiológicos do paciente (SARMIENTO et al., 2003).

Já o método imunológico é realizado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) que é bastante utilizado para detecção de reações entre os anticorpos do soro humano e os marcadores antigênicos do *M. tuberculosis* (Pereira Arias bouta et al., 2003).

2.5. Biossensores

Biossensores são dispositivos analíticos que combinam a especificidade de um elemento biológico ativo com um transdutor o qual produz um sinal proporcional a concentração do analito (Kissinger, 2005). Na Figura 2 encontra-se um esquema geral de um biossensor.

Figura 2 – Esquema geral de um biossensor. O analito (losango vermelho) é reconhecido pelo biorreceptor (Y verde). Interação resultante é transformada num sinal elétrico pelo transdutor e registrado pelo sistema digital de aquisição de dados.



(Fonte: Monteiro. T.C, 2013)

O elemento biológico é responsável pela especificidade e sensibilidade do biossensor (Tothill et al., 2009). A escolha do biorreceptor deve ter em conta o analito a detectar, como também sua concentração, natureza da amostra (ex.: gota de sangue, gás, tecido) e o tipo de medição a efetuar.

Os biossensores podem ser classificados em dois grupos catalítico-metabólicos ou de afinidade (Fracchiolla et al, 2013). Os biossensores catalíticos são constituídos por elementos biológicos enzimas, organelas, tecidos e microrganismos que possuem a capacidade de gerar produtos como resultado de sua bioatividade, quando em presença de uma molécula-alvo (Fracchiolla et al., 2013). O sinal produzido é proporcional à concentração dos produtos formados ou ao calor liberado, durante a atividade metabólica.

No caso dos biossensores de afinidade a detecção é feita através da ligação específica do analito ao elemento biológico, sem produção de metabólitos. Estes sensores baseiam-se na afinidade entre anticorpo-antígeno, hibridação entre cadeias de DNA complementares e receptores celulares (ex.: afinidade entre neuroreceptores e neurotransmissores (Fracchiolla et al., 2013). Para estes biossensores, as interações não específicas devem ser minimizadas de forma a garantir que o sinal produzido seja exclusivamente proporcional à ligação dos analitos às biomoléculas imobilizadas no sensor (Fracchiolla et al., 2013).

A empregabilidade dos biossensores ocorre em diversas áreas do conhecimento, como na medicina, biologia, química, física e farmácia. Também é evidenciado o uso de biossensores para monitoramento ambiental, setor industrial e saúde. (Castro et al., 2003; Bassi et al., 1996). Com relação às vantagens que caracteriza o biossensor ele deve apresentar: fácil manuseio, resposta rápida que seja sensível e preciso e para análise utilize pequena quantidade de amostra do material e na maioria das vezes possa ser reutilizado (Holford et al., 2012; Tothill et al., 2009). Desde seu desenvolvimento os biossensores vêm obtendo grande aplicação nos campos da medicina, controle de processos farmacológicos, segurança alimentar além da monitorização ambiental (Holford et al., 2012; Monošík et al., 2012). No biossensor o transdutor é responsável por transformar o sinal biológico em sinal elétrico que pode ser amplificado, medido, registrado e analisado. E pode ser classificado com o tipo de transdução utilizado que pode ser: eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, condutimétricos), ópticos, piezoelétricos ou calorimétricos (Mello et al., 2007).

Os transdutores eletroquímicos são baseados no movimento de íons e na difusão de espécies eletroativas (EMBRAPA 2013). São mais utilizados que os ópticos e calorimétricos, pois são estáveis e apresentam screening rápido, alta sensibilidade e possuem vantagem de ser econômico e possibilidade de automação o que permite sua aplicabilidade em um grande número de amostras (MELLO et al., 2007; EMBRAPA, 2013; THÉVENONT, 2001). E podem ser classificados com o tipo de parâmetro aplicado pode ser: condutimétrico, amperométrico e potenciométrico (M.GABIG-CIMINISKA, 2004; MEHRVAR, 2000).

Os transdutores amperométricos apresentam funcionamento baseado na medida da corrente por uma reação química produzida pelas espécies eletroativas, sujeitas a oxidação ou redução no eletrodo. Vai medir a transferência de elétrons do analito para o eletrodo ou vice-versa (WANG, 2008; THÉVENONT, 2001).

Os transdutores potenciométricos são baseados na determinação da diferença de potencial entre o eletrodo e o eletrodo de referência, geralmente utilizam eletrodos de gases ou eletrodos de íons seletivos (THÉVENONT, 2001).

Os transdutores condutimétricos se baseiam nas alterações da condutância. Eles associam enzimas catalíticas que durante as reações consomem ou produzem espécies iônicas que alteram a condutividade da solução e com isso é possível estimar a concentração iônica por meio da condutividade (WANG, 2008; MELLO, 2008).

Os transdutores ópticos avaliam as alterações de propriedades como: amplitude, energia, polarização, fase da luz emitida pelo dispositivo, resultante da interação entre o biorreceptor e o analito. O princípio de detecção pode basear-se em colorimetria (alteração de cor da amostra), interferometria (diferença de fase entre ondas que atravessam a amostra), luminescência e fluorescência (Fracchiolla et al., 2013; Tothill, 2009).

Os transdutores piezoelétricos baseiam-se na capacidade de alguns cristais em gerar corrente elétrica por resposta a uma pressão mecânica sendo considerada uma técnica de análise em tempo real. Esta pressão mecânica pode ser provocada pela massa do material adsorvido na superfície do transdutor (Torresi et al., 2000). Além disso, quando acoplada à eletroquímica, os transdutores piezoelétricos têm demonstrado ser uma ferramenta poderosa no estudo de reações eletroquímicas que produzem modificações na interface eletrodo/eletrólito em uma magnitude suficiente para ser detectada.

Em adição, os transdutores calorimétricos, também chamados de termistores, apresentam fundamentos na variação de entalpia do sistema (Thévenot, 2001). A detecção de substâncias é baseada apenas no calor envolvido nas reações do analito com sua substância biológica ativa e são imobilizadas diretamente no sensor que vai detectar o calor envolvido na reação química a partir daí quantificar o substrato consumido ou o produto formado pela reação (Mello, 2008).

Os transdutores eletroquímicos são bastante úteis para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos sendo mais utilizados devido a sua versatilidade sendo uma área de destaque na bioquímica analítica. Seu princípio básico baseia-se no fluxo de elétrons entre uma espécie eletroativa e a superfície de um eletrodo. A corrente resultante é medida por diferentes técnicas eletroquímicas que variam de acordo com a natureza da transdução (Ahmed et al., 2008).

Os biossensores eletroquímicos atuam medindo o sinal eletroquímico produzido pela interação bioquímica do elemento biológico e analito. A reação bioquímica resultante produz ou consome espécies eletroativas (íons ou elétrons), alterando as propriedades eletroquímicas da amostra que são detectadas pelo biossensor. O sensor utilizado pode ser classificado como potenciométrico (detecta alteração do potencial da amostra) amperométrico (mede a corrente gerada entre dois eletrodos por determinado potencial) condutimétrico ou impedimétrico (mede alterações de condutividade ou de impedância elétrica da amostra (Fracchiolla et al., 2013, Monosik et al., 2012).

Os transdutores mais comuns são os amperométricos que atuam medindo a corrente produzida durante a oxidação ou redução de um produto reagente sob um potencial constante, que resulta em sensores com excelente sensibilidade e um tempo de resposta reduzido. Já os transdutores potenciométricos relacionam o potencial elétrico com a concentração do analito pela utilização de eletrodos sensíveis a gás ou com uma menor frequência os eletrodos seletivos a íons (Guimard et al., 2007).

A utilização de biossensores eletroquímicos vem obtendo um crescimento significativo nos últimos anos, devido seu potencial de aplicação para análise e detecção de enzimas, ácidos nucleicos e microorganismos (Arora et al., 2007, Prabhakar et al., 2008). A escolha do eletrodo de base é importante para o desenvolvimento de biossensores, pois existe uma grande variedade de eletrodos de escolha para fabricar dispositivos de sensores como os eletrodos de pasta de carbono (Sanchez et al., 2000), eletrodos de ouro (Ouerghi et al., 2001) e eletrodos de carbono vítreo (Dai et al., 2003).

No estudo de imobilização de diferentes biomoléculas para a detecção do *Mycobacterium tuberculosis*, destacam-se o desenvolvimento dos imunossensores e genossensores (Liu et al., 2003, Gonzalez et al., 2005, Gao et al., 2004, Das et al., 2010). Os imunossensores eletroquímicos combinam a alta especificidade dos métodos imunoquímicos convencionais com sistemas eletroquímicos fornecendo novos conhecimentos para criação de dispositivos sensíveis e simples para detecção do MTB (Pathirana et al., 2000). Já os genossensores baseiam-se na biodetecção por meio de ensaio de hibridização (Arora et al., 2007).

2.5.1 Genossensores para detecção da tuberculose

A fundamentação para genossensor é definida como um dispositivo analítico avançado, que exibe a promessa de diagnóstico apresentando uma alta sensibilidade e

especificidade,além de serem de baixo custo e podendo ser utilizado para a detecção precoce de muitas patologias genéticas(SASSOLAS et al.,2008). Através dos genossensores de DNA podem ser arquitetados para detectar qualquer sequência de DNA e este sensor pode apresentar uma ou mais menores sequências de DNA com 20 a 40 pares de bases que são imobilizadas em uma plataforma apropriada. 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(BEAUCAGE,2001).

Há trabalhos com genossensores,como a criação de um genossensor para detecção do patógeno *Aeromonas hydrophila* com hibridização do DNA utilizando voltametria cíclica (TIOCHONIUK et al.,2010). Pesquisadores também desenvolveram um genossensor utilizando hibridização direta para detectar mutações do gene BRCA 1 (do inglês, Breast Cancer 1) que está relacionado ao câncer de mama é um gene supressor de tumores que controla o ciclo celular e a proliferação celular descontrolada(YIMA et al.,2005). Ali e colaboradores estudaram um genossensor fundamentado em espectroscopia de impedância eletroquímica para leucemia linfocítica crônica e foi utilizado como plataforma eletrodos de ouro modificados com nanoparticulas de ouro com capacidade de diferenciar uma única base diferente na sequência, ou *mismatch* (ENSAFI et al.,2011).

Os biossensores de MTB baseados em NpsAu foram criados recentemente para um diagnóstico simples e rápido em tempo real. Ensaio colorimétricos utilizando a conjugação de NpsAu com sondas de nucleotídeos apresentaram uma detecção rápida e sensibilidade para detecção de MTB com um limite de detecção de 0,75 μ g do total de DNA utilizado no PCR (Batista et al., 2006). similarmente o DNA patogênico de MTB não amplificado foi mensurado com um limite de detecção de 18 ng/ μ L (Liandris et al., 2009

Alguns estudos baseados em imunoenaios com NpsAu para detecção de amostras clínicas, demonstraram um aumento na sensibilidade comparado com os métodos analíticos tradicionais com detecção de até 50ng de DNA genômico (Upadhyay et al., 2006). Em adição, nanomateriais tais como quantum dots e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para *Mycobacterium sp.* também foram utilizados para mensuração em amostras clínicas com elevada sensibilidade e especificidade (Gazouli et al., 2010).

As nanopartículas magnéticas também são utilizadas em métodos analíticos e as mesmas vêm influenciando em destaque a indústria e aplicações na engenharia. Assim, biossensores baseados em nanopartículas de Fe_3O_4 emergem como uma importante ferramenta analítica de diagnóstico que converge para a demanda de elevada sensibilidade, detecção em curto intervalo de tempo e controle da doença a nível molecular.

Além disso, nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro tem sido utilizadas para aumentar a sensibilidade e especificidade em imagem por ressonância magnética (Gupta et al., 2005, Talelli et al., 2009). Este estudo demonstrou que as estruturas magnéticas constituem uma ferramenta valiosa para estudar interações anticorpo-antígeno e interações parasita-hospedeiro.

Desta forma, o avanço em novas estratégias de análise, detecção de hibridização e modificação de superfícies torna-se necessário para o desenvolvimento de novas ferramentas de biodetecção da tuberculose.

3. MODIFICAÇÕES DE SUPERFÍCIES SENSORAS

3.1 Poli (alilamina) e ácido mercaptobenzóico (AMB)

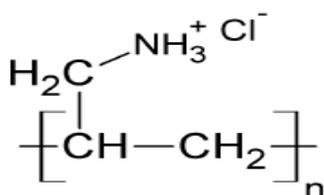
A utilização de polímeros na modificação de superfície do eletrodo como na imobilização de biomoléculas favoreceu o rápido progresso na área de polímeros condutores orgânicos que vem sendo observados desde o final de 1970 por Aizawa e Yabuki como pioneiros (Aizawa et al.,1985).

Conceituamos polímeros como (poli = muitos e meros = partes) são macromoléculas em que sua estrutura mínima é denominada de monômeros que por meio de um processo de polimerização ocasionará a formação de uma cadeia de monômeros. Sua classificação tem como base seu comportamento em processos térmicos, mecanismo de polimerização e estrutura. (Fried 1995).

Havendo a possibilidade de inserir na cadeia principais grupos de polímeros ionizáveis são chamados de polieletrólitos e de acordo com a carga podem ser negativos ou positivos(Dobrynin et al.,2005). Como a poli (alilamina) é um polímero em que sua densidade de cargas é dependente dos valores de ph da solução, classificada como um polieletrólito fraco pelo fato de quando se ioniza libera contraíons e adquire carga positiva chamada de polication. (Shiratori et al.,2000; Barros 2006).

Com a formação eletroquímica de camadas de polímeros oferece varias vantagens em especial na fabricação de micro-sensores como também da matriz de micro-sensores (Schwuhmann,1993). A partir daí tivemos o interesse de utilizar poli (alilamina) na montagem da sonda de tuberculose para que pudéssemos obter um melhor sinal elétrico associado a nanopartículas metálicas.

Figura 3- Estrutura molecular da poli (alilamina)



Além do uso da poli (alilamina) o uso de compostos alifáticos tiolados despertou interesse para o desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos através da estratégia de camadas automontadas. O uso destes compostos apresenta como principal vantagem o aumento do desempenho do biossensor devido a presença de grupos tióis no anel aromático (Wang H. et al., 2011), enquanto que o grupo carboxílico pode ser utilizado para a ligação de biomoléculas (Nuzzo et al., 1990). O ácido mercaptobenzóico pode ser utilizado no desenvolvimento de uma plataforma sensora, sendo uma excelente alternativa para melhoria do sinal eletroquímico e adsorção química de elementos que constituem a camada sensora.

3.2. Nanopartículas magnéticas

Materiais nanoestruturados podem ser definidos como sólidos que são constituídos por elementos estruturais, em sua maioria cristalina e que apresente pelo menos um tamanho de poucos nanômetros (Ghandoor et al., 2012).

De maneira geral os materiais nanoestruturados possuem propriedades superiores aos materiais policristalinos convencionais e sólidos amorfos, devido a possibilidade de aumento de resistência, dureza, tenacidade e propriedades magnéticas inferiores (Ghandoor et al., 2012; Asim et al., 2012). As nanopartículas de oxido ferro

são chamadas de materiais granulares por apresentarem em sua constituição aglomerados de partícula além de apresentar um comportamento superparamagnético.

Atualmente, os óxidos de ferro vêm recebendo atenção especial devido a potencial aplicação como pigmento contraste em ressonância magnética nuclear (RMN) para formação de imagens, ferrofluidos, catalisadores e meios de armazenamento de dados. Dentre os óxidos metálicos podemos destacar a magnetita (Fe_3O_4).

As nanopartículas magnéticas são de grande importância nas aplicações biológicas devido a sua baixa toxicidade em seres humanos, possibilidade de atuar em procedimentos diagnósticos como agentes de contraste em imagem por RMN, carreador magnético de drogas e hipertermia magnética (Chastellain et al., 2004; Răcuciu et al., 2006), embora as aplicações terapêuticas ainda estejam sob investigação.

Processos de imobilização de nanopartículas metálicas em superfícies têm relevância para diversos ramos da ciência em especial para a fabricação de dispositivos. A imobilização de nanopartículas tem como função promover o aumento da área superficial do material a ser imobilizado, fornecendo estabilidade mecânica ao material e atuar na estabilidade evitando a agregação de partículas.

Nanocompósitos magnéticos à base de sílica mesoporosa e magnetita podem ser aplicados para a biosseparação de DNA e na extração de RNA de células bacterianas (Sem et al., 2006). O método mais utilizado para a obtenção de nanopartículas de magnetita é através da química molhada pela síntese de oxidação-precipitação. Nesta síntese uma fonte de Fe^{2+} é oxidada de forma controlada para Fe^{3+} numa proporção molar de 1:2 e posterior precipitação da magnetita.

3.3. Imobilização do Sistema Sensor

Para que ocorra a imobilização do elemento biológico na superfície de trabalho é importante utilização de uma matriz estável com função de prolongar o tempo de vida operacional, como também aumentar a termoestabilidade do biorrecetor (Susanto et al., 2013). No geral, o biorrecetor é um elemento frágil, susceptível de degradação ou inativação, ocasionado por alterações de pH, temperatura como também pela presença de outras espécies reativas (Newan et al., 2006).

É importante que na escolha do suporte de imobilização seja levada em consideração a natureza do elemento biológico, assim como, o tipo de medição a ser realizado, além das condições do meio em que o dispositivo será utilizado e a natureza da amostra.

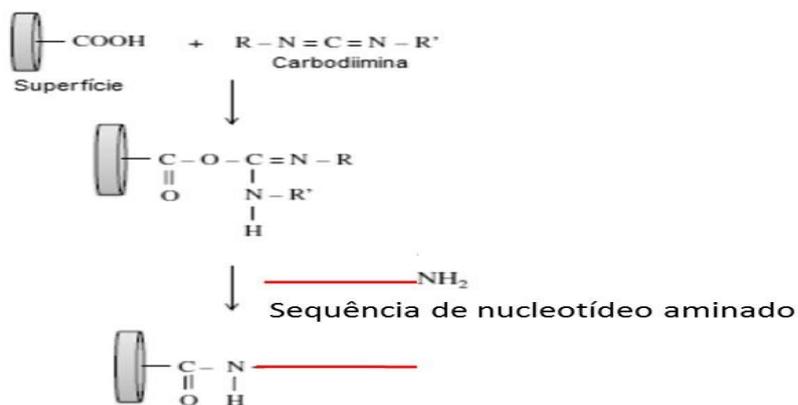
Na construção de biossensores é empregada uma variedade métodos de imobilização de biomoléculas em superfícies, destacando-se os métodos físicos (adsorção física) e químicos (adsorção química). A adsorção física baseia-se na interação entre o suporte e a biomolécula sendo fraca, podendo ocasionar a perda do material biológico, como exemplos podemos citar a adsorção, encapsulação e imobilização em matrizes. A adsorção química é mais complexa necessitando o uso de solventes adicionais, sendo a força de interação superior devido a presença das ligações covalentes, o que proporcionam distribuição e densidade homogênea de biomoléculas. Além disso, a adsorção química promove uma maior reprodutibilidade e homogeneidade da superfície do sensora reduzindo ou eliminando as situações de instabilidade, difusão ou agregação de biomoléculas (Susanto et al.,2013; Moyo et al.,2012; akai et al.,2009).

A imobilização de biomoléculas por ligação covalente consiste em ligações de grupos não ativos das biomoléculas, ou seja, não essenciais para sua atividade catalítica (no caso de enzimas), e grupos reativos (grupos funcionais ou espaçadores), como hidroxila, carboxila, amino, tiol, glutaraldeído, carbodiimina, ligados na superfície sólida do suporte insolúvel (Thevenot et al., 2001). Os suportes podem ser materiais inorgânicos, naturais ou polímeros sintéticos (Sassolas et al., 2011).

Os agentes mais utilizados para o processo de imobilização do sistema sensor são: N-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida(EDC),que atua aperfeiçoando a durabilidade das ligações na superfície do biossensor (Berdran et al.,2010). Em adição, a N-hydroxisuccinimida(NHS) oferece ésteres ativos e apresentam baixa toxicidade (Olde et al.,1996; Zeeman et al.,1999; Saito et al.,2004; Chen et al.,2011).

A ligação covalente por meio destes reagentes se dá pela ativação inicial da superfície usando reagentes multifuncionais, destacando-se as carbodiiminas, como pode ser observado na Figura 4. Em seguida é realizado o acoplamento da biomolécula ao suporte ativado e remoção do excesso e biomoléculas não ligadas (SASSOLAS et al., 2011).

Figura 4- Representação do processo de modificação química da superfície eletroquímica por meio de ativação com carbodiimida.



Neste trabalho, utilizamos o ácido maectobenzóico como espaçador que fornece grupos-COOH para ligação com NPsFe₃O₄ aminado e sonda modificada com -NH₂ ativados por meio de carbodiimida e N-hidroxisuccinimida.

4. MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

Os processos que ocorrem por transferência de elétrons através da interface eletrodo/eletrólito, são mediados por reações de oxi-redução e governadas pelas leis de Faraday. A referida lei está baseada nas quantidades de substâncias liberadas ou acumuladas no eletrodo de uma célula e são diretamente proporcionais a quantidade de carga que passa através da solução e as quantidades de diferentes substâncias que são depositadas ou liberadas, sendo proporcionais aos seus equivalentes, e representada como:

$$m = \frac{MQ}{nF} \quad (1)$$

onde m é a massa da substância, M a massa molar, n é o número de elétrons envolvido na reação redox, F é a constante de Faraday e Q é a quantidade de carga que flui pela célula quando uma corrente é mantida por um intervalo de tempo Δt :

$$(2)$$

Na área superficial do eletrodo ocorrem dois tipos de processos denominados de faradâicos e não-faradâicos. O primeiro está relacionado a processos que envolvem

transferência de elétrons através da interface metal-solução, resultando na oxidação ou redução. Estas reações que ocorrem são mediadas pela lei de Faraday (onde a corrente é proporcional a quantidade de eletricidade) são denominadas de processos faradâicos (Bard et al., 2000). Eletrodos em que ocorrem esses processos são chamados de eletrodos de transferência de carga. Sob certas condições uma interface de eletrodo solução não apresentando transferência de carga e essas reações passam a ser consideradas termodinamicamente desfavoráveis.

Processos não- faradâicos são os processos de adsorção e dessorção a interface do eletrodo, através do potencial ou da composição da solução pode alterar a solução. A carga não atravessa a interface e a corrente externa pode fluir quando o potencial, área do eletrodo ou a composição da solução mudar. Os efeitos presentes nos processos não-faradâicos são importantes para obtenção de informações sobre a transferência de carga e reações associadas (Bard et al., 2000).

A carga não pode atravessar a interface de um eletrodo idealmente polarizado quando o potencial é alterado, desta forma o comportamento da interface eletrodo-solução é análogo a de um capacitor (Bard, et al., 2000). Podemos definir um capacitor como elemento do circuito elétrico formado por duas placas condutoras separadas por um material dielétrico e seu comportamento é regido pela seguinte equação:

$$C=q/E \quad (3)$$

Onde q é a carga armazenada sobre o capacitor (coulombs, C), E é o potencial que atravessa o capacitor (volts, V) e C é a capacitância (Faraday, F).

Quando se aplica um potencial em um capacitor, a carga é acumulada sobre este metal até que satisfaça a equação $q/E = C$. Esta carga é constituída por um excesso de elétrons sobre uma das placas e uma deficiência de elétrons sobre a outra, em que a magnitude da corrente depende da resistência do circuito (Bard et al., 2000).

A carga presente sobre o metal pode ser positiva ou negativa dependera da solução. Esta solução pode ser constituída pelo excesso de cátions ou anions, como também do potencial ou dos componentes da solução. É denominada de dupla camada elétrica o arranjo das espécies e a orientação do dipolo existente na interface metal-solução (Bard et al., 2000).

4.1. Espectroscopia de impedância eletroquímica- EIE

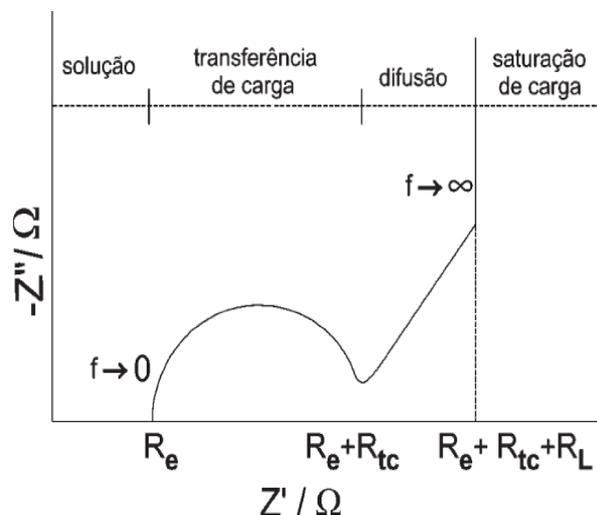
A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é um método de análise que atua na caracterização da impedância de um sistema, sensível a fenômenos de

superfície como também de alterações das propriedades dielétricas do meio. Devido a estes fatores a EIE é uma técnica relevante na área dos biossensores e importante como método de detecção da ligação entre o elemento de reconhecimento do sensor e o analito (Pänke et al., 2008; Lisdat and Schäfer, 2008).

A técnica de EIE oferece diversas vantagens tais como baixo custo, rapidez e facilidade de instrumentação. A EIE vem sendo empregada em genossensores, devido ao melhoramento da transferência de elétrons que ocorre durante o processo de hibridização do DNA.

A impedância de um sistema é determinada através do registro da corrente em resposta à aplicação de uma tensão sinusoidal de baixa amplitude (geralmente 5-250 mV). A impedância (Z) pode ser definida como o quociente entre a tensão aplicada (V) e a corrente gerada (I) em função do tempo (t) (Berggren et al., 2001; Pänke et al., 2008., Lisdat, F. & Schäfer, et al 2008). A impedância é um valor complexo, uma vez que a tensão e a corrente podem variar tanto em amplitude como em fase. A impedância pode ser expressa pelo seu módulo ($|Z|$), desvio do ângulo de fase ou pela sua parte imaginária (ZIm) e parte real (ZRe) (Figura 5) (Berggren et al., 2001; Pänke et al., 2008). Além disso, f é a frequência (Hz), φ é o ângulo do desvio de fase ($^{\circ}$) entre a tensão $V(t)$ e a corrente $I(t)$. Em adição, há a $\tan(\varphi)$ que se refere a tangente de perdas.

Esta técnica é utilizada para descrever a resposta de sistemas que são constituídos por capacitâncias, resistências e indutâncias. Através das medidas de impedância e ângulo fase há possibilidade de avaliar processos como transporte de carga incluindo a velocidade de transferência, condutividade de filmes, capacitância redox e dupla camada, coeficientes de difusão de portadores de carga, dentre outros (Jiang et al., 2000).

Figura 5- Representação esquemática do diagrama da impedância de Nyquist.

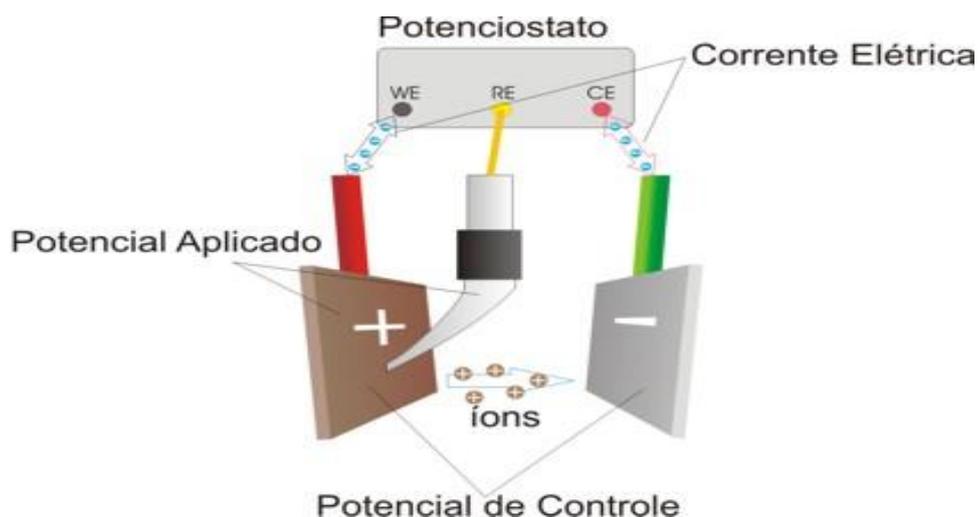
Para extrair informações dos dados de impedância são utilizados diferentes circuitos equivalentes ou modelos matemáticos. A aplicabilidade dos circuitos equivalentes permite simular o comportamento da célula eletroquímica em termos dos componentes de um circuito convencional. A EIE vem sendo aplicada em vários estudos eletroquímicos tais como cinética do eletrodo, estudos de dupla camada, processos em bateria, investigação sobre processos de corrosão, eletroquímica em estado sólido e bioeletroquímica (Fey et al., 2003; Wang et al., 2001; Salkind et al., 2003, Cheng et al., 2000). Aplicação analítica tem crescido em investigações de hibridização de oligômeros de DNA, por meio do acompanhamento da impedância total do sistema. Esta análise só é possível porque a impedância total do sistema está associada ao aumento do componente capacitivo do sistema, como resultado de mudanças na densidade e mobilidade de íons associados com a reação de hibridização (Guisseppi-Elie et al., 2004).

4.2. Voltametria cíclica-VC

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica utilizada para obter informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Sua eficácia é resultante da obtenção rápida de informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética e de reações heterogênea de transferência de elétrons como também das reações acopladas a processos adsorptivos (Brett & Brett, 1993).

Esta técnica baseia-se no registro de curva de corrente-potencial (voltamograma) obtida pela eletrólise de uma espécie em que a intensidade de corrente que flui através de um eletrodo é medida em função do potencial aplicado a esse eletrodo. O potencial (E) é aplicado em forma de varredura e varia a uma velocidade constante em função do tempo. Os sistemas voltamétricos estão fundamentados na utilização de potenciostatos que servem para controlar o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e permitem a medição da intensidade de corrente que se estabelece numa célula eletroquímica constituída por três eletrodos (Figura 6).

Figura 6- Representação esquemática de uma célula eletroquímica com três eletrodos: eletrodo de trabalho (WE); eletrodo de referência (RE); eletrodo auxiliar (CE). Fonte: <http://br.images.search.yahoo.com/images/view>.

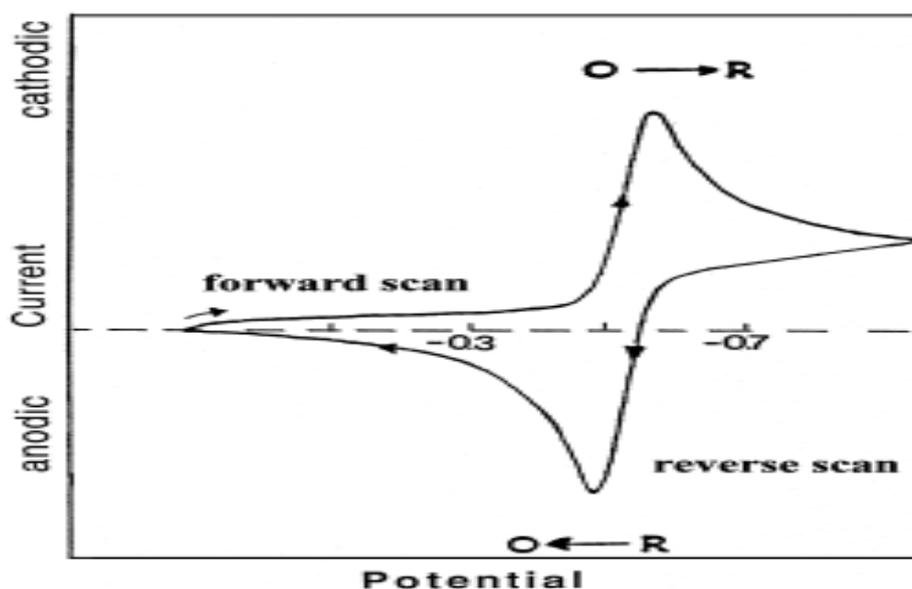


É imprescindível a escolha do eletrodo para o desempenho da técnica voltamétrica, nomeadamente na construção de biossensores. Atualmente, o desenvolvimento de eletrodos de trabalho quimicamente modificados veio minimizar várias limitações que os sensores eletroquímicos que apresentavam a passivação gradual da sua superfície, a cinética de transferência de elétrons entre os analitos e os materiais dos eletrodos serem demasiadamente lentos e a dificuldade em discriminar entre compostos alvos que possuam características de oxidação-redução similares (Freire et al., 2002).

Na voltametria cíclica, parte-se de um determinado potencial e faz-se o varrimento de uma determinada gama de potenciais. Depois se inverte o sentido, ou

seja, efetua-se o varrimento no sentido inverso da mesma gama de potenciais. O ponto de partida e de chegada é o mesmo. Nesta técnica, realiza-se o varrimento de potencial direto e inverso em vários ciclos sucessivos observando-se a oxidação e/ou a redução da espécie eletroativa (Figura 7). 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. A principal aplicação deste tipo de técnica é na análise qualitativa de processos eletroquímicos.

Figura 7- Voltamograma cíclico típico para sistema reversível.



Na célula eletroquímica, a corrente passa entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, evitando que ocorram distúrbios no eletrodo de referência de modo a assegurar o seu papel sem interferências, que é o de manter o seu potencial constante durante as medidas. O fato da área do eletrodo trabalho ser menor faz com que o eletrodo de trabalho se polarize, isto é, assumo o potencial que lhe é aplicado. As reações que ocorrem no eletrodo são determinadas por dois principais componentes: a transferência difusional de massa do analito em solução para a superfície do eletrodo, a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo. O eletrodo de referência, por possuir uma área grande não se polariza, mantendo o seu potencial constante.

A aplicação do potencial resulta num aumento do potencial para as regiões mais negativas (catódicas) onde ocorre a redução do composto em solução que vai fornecer

um pico de corrente proporcional à concentração do composto analisado. Posteriormente, quando atingir um valor onde nenhuma reação de redução ocorre, o potencial passa agora a ser varrido em sentido inverso até o valor inicial se a reação for reversível. Durante este processo os produtos gerados no sentido direto estarão localizados próximos à superfície do eletrodo e serão oxidados gerando um pico simétrico ao pico de redução. O voltamograma gerado dependerá do tipo de mecanismo redox que o composto analisado sofre no eletrodo, fazendo da VC um instrumento importante para os estudos mecanísticos (Lojou et al., 2006).

5. MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

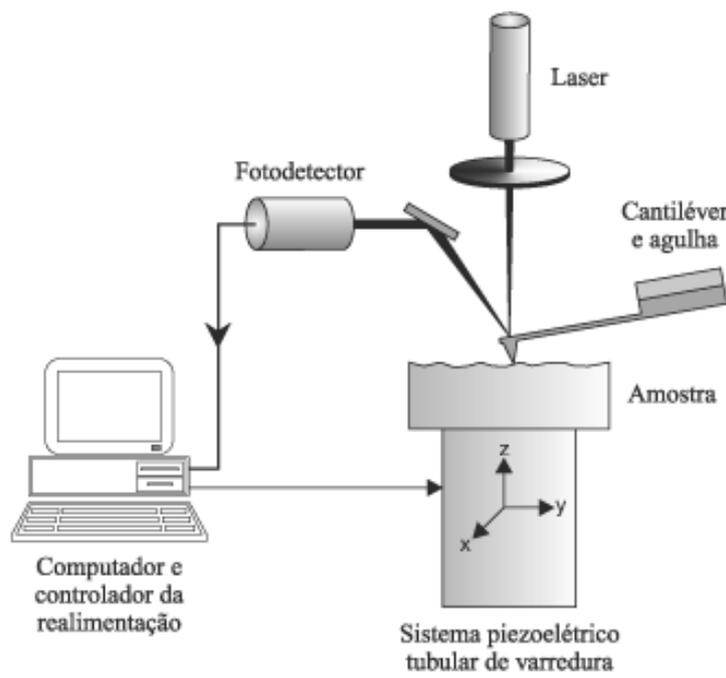
No início década de 80 foi criado o microscópio de varredura por sonda e posteriormente Being e colaboradores desenvolveram a microscopia de tunelamento (Scanning Tunneling Microscopy-STM) (Being et al.,1982). Desta forma, inovando na área da microscopia através da obtenção de imagens em nível atômico. Portanto, os efeitos quânticos de tunelamento de elétrons previamente conhecidos passaram a ser utilizados pela primeira vez na produção de imagens de uma superfície condutora (Being et al.,1986).

Posteriormente, Being e colaboradores (Being et al.,1982) avançaram com as suas descobertas através do acoplamento do STM a um perfilômetro, criando assim um novo equipamento em que a ponta varre a amostra ocorrendo a atração/repulsão pelos átomos da superfície. Deste modo, desenvolveram o microscópio de força atômica (Atomic Force Microscopy-AFM), destacando que sua utilização é vantajosa ao possibilitar a realização de medidas em superfície condutoras, semicondutoras e não condutoras. A aplicabilidade é destinada a estudos de sistemas biológicos como também a realização de medidas em meios líquidos (dos Santos, 2008). A utilização do AFM tem permitido a caracterização de superfícies de filmes finos automontados e diferenciando antes e após da interação do biossensor com o analito (Zhang et al., 2006).

A constituição do AFM é baseada em uma alavanca (*cantilever*), uma ponta (*tip*), um fotodetector, o laser e um “*scanner*” que fornece a movimentação nas três direções espaciais (XYZ) onde a amostra é colocada (Figura 8). O feixe do laser é ajustado para incidir na extremidade livre superior do cantilever e refletido para o fotodetector. A ponta varre a amostra próxima a superfície (Figura 8) e as forças de interação amostra–ponta fazem com que o *cantilever* oscile de acordo com o tipo de

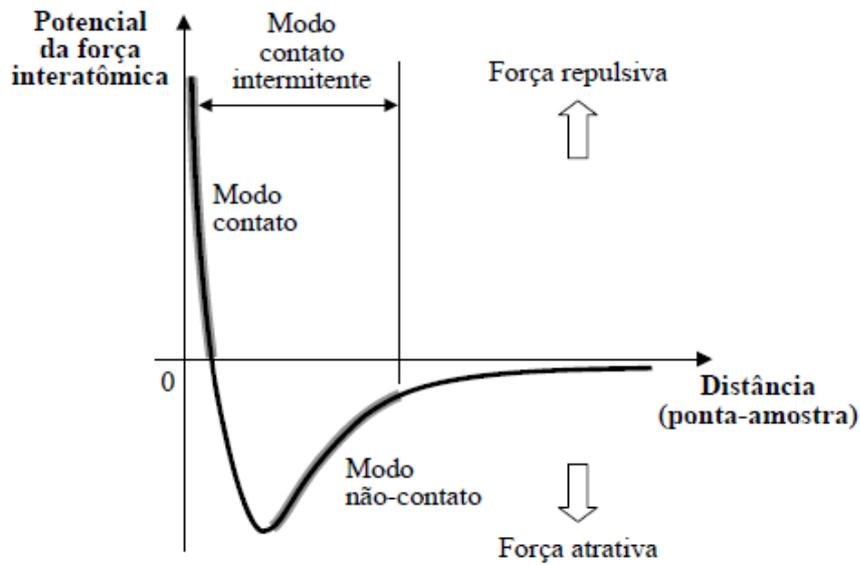
força experimentada, atração ou repulsão. Desta forma, o fotodetector registra essas variações ocorridas e esse sinal é enviado para um computador.

Figura 8. Representação esquemática do funcionamento de um microscópio de força atômica a ponta varre a amostra, enquanto o laser incide sobre o *cantilever* sendo refletido em direção ao fotodetector.



A Figura 9 ilustra a variação de força em função da distância de separação a partir da interação entre ponta e amostra. As forças envolvidas no funcionamento do AFM são do tipo *van der Waals* (Magnov et al 1996).

Figura 9. Gráfico de força interatômica vs. distância entre a sonda e a amostra (extraída de Dotto 2003).



Os substratos mais comumente empregados nos estudos com AFM são vidro, mica e substratos à base de silício, que podem apresentar um filme metálico sobre a superfície. A superfície de mica é comumente utilizada para obtenção de imagens topográficas de proteínas por AFM devido ao caráter hidrofílico, ao fato de ser atômica e de possuir alta afinidade por moléculas bioquímicas. Para estudo de amostras biológicas é importante encontrar o método adequado de imobilização das moléculas no substrato e que não cause alteração estrutural do sistema. Vários trabalhos, envolvendo a modificação química de superfícies e imobilização de moléculas, foram desenvolvidos para obtenção de imagens topográficas de alta resolução da interação de sonda-alvo de DNA com a técnica de AFM, através do monitoramento direto (Ferreira e Yamanaka, 2006).

Pode-se observar que a partir das imagens topográficas é possível observar o número de interações entre as moléculas que interagem por meio de hibridização, avaliação de interações específicas e não-específicas.

Desta forma, o AFM vem sendo utilizado como uma ferramenta útil no estudo de superfícies modificadas com o intuito de observar biointeração do tipo antígeno-anticorpo, proteína-carboidrato, hibridização de fitas de DNA e morfologia associado aos processos de modificação.

CAPÍTULO III

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo principal deste trabalho consistiu em preparar e caracterizar filmes de NPsFe_3O_4 -HPA depositados sobre eletrodo de ouro e avaliar a ligação covalente da sonda de tuberculose no sistema NpsFe_3O_4 -ácido mercaptobenzóico (AMB), para a aplicação como sensor impedimétrico e voltamétrico para a detecção de tuberculose.

3.2. Específicos

- Avaliação das características eletroquímicas da interação da sonda de tuberculose com o sistema NPsFe_3O_4 -HPA;
- Avaliação da adsorção de AMB sobre o eletrodo de ouro e sua ativação via EDC:NHS;
- Imobilização de NpsFe_3O_4 aminado na camada automontada de AMB;
- Avaliação das características eletroquímicas da interação da sonda de tuberculose com o sistema AMB- NPsFe_3O_4 via EDC:NHS;
- Estudo da viabilidade do sistema AMB- NpsFe_3O_4 -Sonda (tuberculose) para detecção por hibridização do alvo de tuberculose e avaliação do controle negativo;
- Análise estrutural dos filmes biológicos de AMB- NPsFe_3O_4 -Sonda (tuberculose)-genoma por microscopia de força atômica (AFM);
- Determinação da capacitância da dupla camada elétrica (Cdl) através de cálculos teóricos a partir de resultados experimentais e da resistência à transferência de carga (Zre);
- Determinação das correntes de pico anódicas (ipa) e catódicas (ipc) dos voltamogramas cíclicos;
- Utilização da técnica de EIE para caracterização da interação Sonda-genoma do *M. tuberculosis*.

CAPÍTULO IV

4. METODOLOGIA

4.1. Materiais

A sonda e o genoma do *M. tuberculosis* foram gentilmente fornecidos pelo Aggeu Magalhães por intermédio do Prof. Fábio Melo. O soro de albumina bovina (BSA; 98% de pureza) foi obtido da Sigma- Aldrich (EUA). O hidrocloreto de poli (alilamina) foi adquirido da SPI supplies (EUA). Cloreto férrico e cloreto ferroso foram adquiridos da Vetec (Brasil). Em adição, todos os reagentes e solventes foram de grau analítico.

4.2. Síntese da nanopartículas magnética (NPsFe₃O₄) e obtenção de NpsFe₃O₄ modificadas

As NPsFe₃O₄ foram preparadas via método de co-precipitação (Vereda et al., 2002; de Oliveira et al., 2008). Inicialmente, cloreto férrico (0,32 M) e cloreto ferroso (0,31 M) foram misturados em solução diluída de HCl (0,45 M) em água deionizada. Em seguida, a mistura foi adicionada numa solução de hidróxido de sódio 0,32 M, e agitada vigorosamente em temperatura ambiente. Finalmente foi realizada a centrifugação para separação das partículas e em seguida lavada com água deionizada. Após a obtenção das NpsFe₃O₄ estas foram adicionadas e imobilizadas ao sistema AMB-EDCNHS, ocasionando modificação da superfície, respondendo de maneira satisfatória.

4.3. Preparação do sistema PAH- NPsFe₃O₄-Sonda_{tuberculose}

A solução contendo a sonda de tuberculose foi preparada em tampão fosfato de sódio (TFS, 10mM em pH 7,4). O eletrodo de ouro polido com alumina 0,5µm e sonificado por 1 minuto em água deionizada (Oliveira et al., 2008), e posteriormente seco com nitrogênio (N₂). Em seguida, o eletrodo foi submetido a um potencial de -0,2 V para torná-lo catódico por 2 min. Posteriormente, 10 µL do sistema NPsFe₃O₄-HPA-Sonda_{tuberculose} foi adicionado à superfície do eletrodo em tempos distintos (5, 10, 15 e 20 min), em seguida lavado com TFS pH 7,4 e seco. Após obtenção do eletrodo

modificado com $\text{NPsFe}_3\text{O}_4\text{-HPA-Sonda}_{\text{tuberculose}}$, este sistema foi submetido à incubação com o genoma do *M. tuberculosis* diluído em TFS (pH 7,4).

4.4. Preparação do sistema $\text{AMB-MNPsFe}_3\text{O}_4\text{-Sonda}_{\text{tuberculose}}$

O AMB foi gotejado sobre a superfície do eletrodo em uma quantidade de 2 μL por 2 min e, em seguida, as $\text{MNPsFe}_3\text{O}_4$ foram imobilizadas sobre a camada de AMB tendo como agentes ligantes o N-ethyl-3-(3-dimetilaminopropil) (EDC) e a N-hydroxisulfosuccinimida (NHS) (1:1) por 10min. Posteriormente, 1 μL do Primer de TB foi imobilizado sobre o sistema $\text{AMB-MNPsFe}_3\text{O}_4$ por 30 min através de EDC:NHS sendo obtido o biossistema $\text{AMB-MNPsFe}_3\text{O}_4\text{-EDC:NHS-PrimerTB}$.

4.5. Caracterização morfológica

A análise estrutural foi realizada por um microscópio de força atômica (Agilent AFM/STM microscope, Molecular Imaging Picoplus, EUA) dos filmes depositados sobre lamínulas de vidro. As medidas foram realizadas em modo não contato (Oliveira et al.,2011b). As medidas de AFM foram realizadas sobre lamínulas de vidro hidrofílicas após submetê-las a sonicação em etanol, clorofórmio e água e, em seguida, secas com nitrogênio e então submetidas a análise.

4.6. Medidas de VC e EIE

As análises de VC e EIE foram realizadas utilizando um potenciostato/galvanostato AUTOLAB 128N (Metrohm, Holanda) numa célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução de 10 mM ferro-ferricianeto de potássio, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1), a qual atua como sonda redox. O eletrodo de trabalho utilizado foi o eletrodo de Au modificado, o eletrodo de referência foi Ag/AgCl saturado com KCl e o contra-eletrodo foi platina. As análises de VC foram realizadas em diferentes etapas da construção do biodispositivo, a um potencial de -0,2 a 0,7 V e velocidade de varredura de 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. As medidas de impedância eletroquímica foram realizadas na mesma solução de ferro-ferricianeto de potássio numa faixa de frequência entre 100 mHz a 100KHz com um potencial de amplitude alternada de 10mv.

CAPÍTULO V

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A, ERDEM.; K. KERMAN.; B. MERIC.; U. S. AKARCA.; M. OZSOZ. Anal. **Chim. Acta** 422 (2000) 139-149.

AMERICAN THORACIC SOCIETY. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in adults and children. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v. 161, p.1376-1395, 2000.

AHNMED, M., HOSSAI, M., M, TAMIYAA.E. Electrochemical Biosensors for Medical and Food. **Applications.Electroanalysis**. 2008; 20(6): 616-626

API CONSENSU EXPERT COMMITTEE.,API TB CONSENSU GUIDELINES 2006., Management of pulmonary tuberculosis, extra-pulmonary tuberculosis and tuberculosis in special situations. **Journal of the Association of Physicians of India, Mumbai**, v. 54, p.219-234, 2006.

ARNOLD, C.; Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology and Infection, Oxford**, v.13, p. 120–128, 2007.

N. ASIM.Synthesis of Fe₃O₄ nanocrystals using hydrothermal approach. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** 324(2012)4147–4150.

BASSI, A. S.; TANG, D.; LEE, E.; ZHU, J. X.; BERGOUGNOU, M. A.; Food Technol. **Biotechnol** 1996, 34, 9.

BARD,A.J.;FAULKNER,L.R.;**Eletrochemical** 12 ed.E-wiley,2000.

P.V. BAPTISTA.; M.K. MONTEWKA.; J. PALUCH-OLE.; G. DORIA, R. FRANCO. Gold nanoparticle- probe-based assay for rapid and direct detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples, **Clin. Chem.** 52 (2006) 1433-1434.

BARROS, D. S. **Estudo Espectroscópico e Morfológico de Filmes Automontados de compostos**. 2006.

BENNIG, G.; ROHRER, H.; GERBER, Ch.; WEIBEL,E.; **Phys. Rev. Lett.** 1982, 49,57.

BENNIG, G.; QUATE, C.; GERBER, CH.; **Phys. Rev. Lett.** 1986, 56, 930

BERGGREN, C.; BJAMASON, B. & JOHANSSON, G. Capacitive Biosensors. *Electroanalysis* 13, 173–180 (2001).

BOHUNICKY B.; MOUSA S. Biosensors: the new wave in cancer diagnosis. **Nanotechnology Science and Application**. 2011; 4: 1-10

BRASIL. Ministério da Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica/Programa Nacional de controle da tuberculose: **Situação da Tuberculose no Brasil e no Mundo**. Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde/ **Manual Nacional de Vigilância em Saúde e outras Micobactérias**. 1. ed. Brasília, DF, 2008. Disponível em:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_laboratorio_tb.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde/ Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes. Disponível:http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_tecnica_versao_28_de_agosto_v_5pdf Acesso em: 20 mar 2010.

BRETT, CHRISTOPHER M. A.; BRETT, ANA MARIA O., **Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications**, Oxford, 1993.

B.W. Lu.; W.C. Chen, A disposable glucose biosensor based on drop-coating of screen printed carbon electrodes with magnetic nanoparticles, **J. Magn. Magn. Mater.** 304 (2006) E400–E402.

C. FERNÁNDEZ.; SÁNCHEZ M. B. GONZÁLEZ-GARCÍA, and A. COSTA-GARCÍA, “AC voltammetric carbon paste-based enzyme immunosensors,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 14, no. 12, pp. 917–924, 2000.

CASTRO, M. D. L.; HERRERA, M. C.; *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 279.

CASTELO FILHO, A., II Consenso Brasileiro de Tuberculose: Diretrizes Brasileiras para Tuberculose. *Jornal Brasileiro Pneumologia, Brasília*, v.30, n.1, p. S57-S86, 2004.

CHEN.Y.; ZHANG,M.; LIU, W.; LI,G. Korea-Aust. *Rheol. J.* 23 (2011) 41–48

C. A. S. ANDRADE. de OLIVEIRA.; H. P. DE OLIVEIRA.; OLIVEIRA, M. D. L. OLIVEIRA, M. T. S. CORREIA.; COELHO, L. C. B. B. COELHO; C. P. DE MELO. *Coll. Surf. B* 88 (2011) 100 -107.

COBERLY, J.S.; CHAISSON, R.E. Tuberculosis. In: NELSON, K.E; WILLIAMS, C.M; GRAHAM N.M.H. (Ed.) *Infectious Disease Epidemiology: Theory and Practice*. Aspen: Marylan, 2011. p 411-437.

CONDE, M. B.; SOUZA, G. M.; KRITSKI, A. L. *Tuberculose sem medo*. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

C.JIANG.; T.YANG K.;JIAO,H.;GAO *Eletochem,Acta* 53(2008),2917.

CHASTELLAIN, M.; PETRI, A.; GUPTA, A.; RAO, K. V.; HOFMANN, H.; *Adv. Eng. Mater.* 2004, 6, 235.

C. A. S. ANDRADE.; M. D. L. OLIVEIRA.; C. P. DE MELO.; COELHO, L. C. B. B. COELHO.; M. T. S. CORREIA.; M. L. NOGUEIRA.; S. P. R. SINGH .; X. ZENG. J. *Coll. Int. Sci.* 362 (2011) 517-523.

DAI, Z.; YAN, F.; CHEN, J.; JU. H.X., 2003. Reagentless amperometric immunosensor based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase for determination of carcinoma antigen-125. *Anal. Chem.* 75 (20), 5429–5434.

DAS,M.; SUMANA,G.; NAGARAJAN,R. AND MALHOTRA,B.D. “Zirconia based nucleic acid sensor for Mycobacterium tuberculosis detection,” *Applied Physics Letters*, vol. 96, no. 13, Article ID 133703, 2010.

DE CARVALHO,R.M.; RATH,S. E KUBOTA,L.T. SPR – Uma nova ferramenta para biossensores. *Quim. Nova*, Vol. 26, No. 1, 97-104, 2003).

DEMKOW,U.; ZIOLKOWSKI,J.; FILEWSKA,M.; BIALAS-CHROMIE,B.; ZIELONKA,T.; MICHALOWSKA-MITCZUK,D.; KUS,J.; AUGUSTYNOWICZ, E.; ZWOLSKA,Z.; SKOPINSKA-ROZEWSKA, E.; ROWINSKA-ZAKRZEWSKA,E.;*J. Physiol. Pharmacol.* 55 (2004) 57-66.

DOTTO, M. E. R., Universalidade e Leis de Escalas em Amostras de Silício Atacadas Quimicamente. 2003. 188p. Tese (Doutorado em Ciências). **Instituto de Física. Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2003.

D. BRODIE.; N. W. SCHLUGER. **Clin. Chest Med.** 26 (2005) 247-271.

DOBRYNIN, A. V.; RUBISTEIN, M.; **Prog. Polym. Sci.**, 30, 1049 (2005)

D. XUE.; C. M. ELLIOTT.; P. GONG.; D. W. GRAINGER.; C. A. BIGNOZZI.; S. CARAMORI, J. **Am. Chem. Soc.** 129 (2007) 1854-1855.

DOS SANTOS, D. F. A.; Microscopia de Força Atômica in-Situ de Superfícies de Membranas Poliméricas de Nafion com Nanopartículas de Sílica Incorporadas. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

DUCATI, R.G.; RUFFINO-NETTO A.; Basso L.A, Santos D.S. The resumption of consumption: a review on tuberculosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2006; 101(7): 697-714.

EMBRAPA. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimento,2008. Disponível em:<http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc> 117. Pdf.

THEVENONT,D.R; THOT,K.; DURST,R.A; WILSON,G.S. Electrochemical biosensors/recomend definitions and classification. **Biosens.Bioelectron**,v.16,n. 1-2,p.121-131,2001.

E. L. S. WONG.; F. J. MEARS.; J. J. GOODING. **Sens. Act. B** 111 (2005) 515-521.

E. LIANDRIS.; M. GAZOULI.; M. ANDREADOU.; M. CÔMOR.; N. ABAZOVIC.; L.A. SECHI.; J. IKONOMOPOULOS. Direct detection of unamplified DNA from pathogenic mycobacteria using DNA-derivatized AuNPs, **J. Microbiol. Methods** 78 (2009) 260–264.

F.F. ZHANG.; C.X. LI.; X.H. LI.; X.L. WANG.; Q. WAN.; Y.Z. XIAN.; L.T. JIN.; K. YAMAMOTO,**Talanta** **68** (2006) 1353.

FRIEDEN,T.R.; STERLING,T.R.; MUNSIFF,S.S.; WATT,C.J.; Dye,C. **Lancet** 362 (2003) 887-899.

FEY, G. T.-K.; WENG, Z.-X.; CHENG, J.-G.; KUMAR, T. P.; **Mater. Chem. Phys.**2003, **80**, 309.

FRACCHIOLLA, N. S.; ARTUSO, S. & CORTELEZZI, A. Biosensors in clinical practice: focus on oncohematology. **Sensors** 13, 6423–6447 (2013).

FREIRE, RS.; PESSOA CA.; KUBOTA, LT.; Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos.**Química Nova.** 2002; 26(3): 81-389

FRIED, J. R.; **Polymer Science and technology**. Prentice Hall PTR, New Jersey, 1995.

GAVA,V.; AL.E . Electrochemical Molecular Analysis Without Nucleic Acid Amplification. **Methods**,v.8,n.1,p.2043-2081,2008.

GAO ,Y.; MASUDA,Y.; OHTA,H.; AND KOUMOTO, K.“Roomtemperature preparation of ZrO₂ precursor thin film in an aqueous peroxozirconium-complex solution,” **Chemistry of Materials**, vol. 16, no. 13, pp. 2615–2622, 2004.

GUNTUPALLI,R.; HU,J.; LAKSHMANAN, R.S.;T. S. HUANG, J. M. BARBAREE, AND B. A. CHIN, “A magnetoelastic resonance biosensor immobilized with polyclonal antibody for the detection of *Salmonella typhimurium*,” **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 22, no. 7, pp. 1474–1479, 2007.

HUANG,X.L.; MENG,X.W.; TANG,F.Q.; Li,L.LCHEN,D.; LIU,H.Y.; ZHANG,Y.Q. J. Mesoporous magnetic hollow nanoparticles – protein carriers for lysosome escaping and cytosolic delivery, **Nanotechnology** 19 (2008) 445101–445106.

GAO ,Y.; MASUDA,Y.; OHTA,H.; AND KOUMOTO, K.“Roomtemperature preparation of ZrO₂ precursor thin film in an aqueous peroxozirconium-complex solution,” **Chemistry of Materials**, vol. 16, no. 13, pp. 2615–2622, 2004.

GAZOULI,M.;LIANDRIS,E.; M. ANDREADOU, L.A. SECHI, S. MASALA, D. PACCAGNINI, J. IKONOMOPOULOS, Specific detection of unamplified mycobacterial DNA by use of fluorescent semiconductor quantum dots and magnetic beads, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 2830–2835.

GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL: **WHO report** 2011.

KURLYANDSKAYA.G.;V. LEVIT. Advanced materials for drug delivery and biosensors based on magnetic label detection, **Mater. Sci. Eng. C** 27 (2007) 495–503.

KARAA,P.;CAVUSOGLUB,C.; CAVDARA,S.; OZSOZA,M.;**Biosens. Bioelectr.** 24 (2009) 1796-1800.

GABIG-CIMINSKA,M.;AL,E. Identification of Pathogenic Microbial Cells and Spores by Electrochemical Detection on a Biochip. **Microbial Cell Factories**,v.3,n.e,p.1-11,2004.

GUPTA, AK.; GUPTA. M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials** 2005; 26: 3995–4021.

GUISEPPI-ELIE, A.; Gheorghe, M.; **Biosens. Bioelectron.** 2004, 19, 95.

HUANG,X.L.; MENG,X.W.; TANG,F.Q.; Li,L.LCHEN,D.; LIU,H.Y.; ZHANG,Y.Q. J. Mesoporous magnetic hollow nanoparticles – protein carriers for lysosome escaping and cytosolic delivery, **Nanotechnology** 19 (2008) 445101–445106.

HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F. & HIGSON, S. P. J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics** 34, 12–24 (2012).

H. SAITO.; T. TAGUCHI.; H. KOBAYASHI.; K. KATAOKA.; J. TANAKA, S.; MURABAYASHI, Y.MITAMURA, **Mater. Sci. Eng. C** 24 (2004) 781–785.

H. VARELA.; M. MALTA.; R.M. TORRESI. Técnicas in situ de baixo custo em eletroquímica a microbalança de cristal de quartzo. **Química nova**,23(5)(2000).

HUANG,X.L.; MENG,X.W.; TANG,F.Q.; Li,L.LCHEN,D.; LIU,H.Y.; ZHANG,Y.Q. J. Mesoporous magnetic hollow nanoparticles – protein carriers for lysosome escaping and cytosolic delivery, **Nanotechnology** 19 (2008) 445101–445106.

H. P. O. NASCIMENTO.; M. D. L. OLIVEIRA.; C. P. DE MELO.; G. J. L. SILVA.; M. T. CORDEIRO.; C. A. S. ANDRADE. **Coll. Surf. B** 86 (2011) 414-419.

H,El, GHANDOOR.; H.M.ZIDAN.; M,H. KHALIL.; M,I.M.ISMA. Synthesis and some physical properties of magnetite(Fe_3O_4) nanoparticles. **International Journal of Electrochemical Science** (2012)5734–5745.

KISSINGER, P.T. AND HEINEMAN, W.R., **Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry**, New York: Marcel Dekker, 2005.

KRITSKI, A. L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G.R.M. In: Tuberculose: do Ambulatório à Enfermaria, 2. ed. São Paulo: Atheneu,2000.Cap. 1.

KHAN, M.A.; MIRZA,S.H.;ABBASE,S.A.;BUTT,T.;ANWAR,M. Peripheral Blood-Based Polymerase Chain Reaction in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad* , v. 18, n. 2, p. 25- 28, 2006.

K.ARORA.; N. PRABHAKAR.; S. CHAND, AND B. D. MALHOTRA, “*Escherichia coli* genosensor based on polyaniline,” **Analytical Chemistry**, vol. 79, no. 16, pp. 6152–6158, 2007.

J. S. AHN.; P. T. HAMMOND.; M. F. RUBNER.; I. LEE. **Coll. Surf. A** 259 (2005) 45-53.

J, ZHANG.; S. P. SONG.; L. Y. ZHANG.; L. H. WANG.; H. P. WU.; D. PAN.; C. H. FAN, **J. Am. Chem. Soc.** 128 (2006) 8575-8580.

L,H.H. OLDE DAMINK.; P.J. DIJKSTRA.; M,J.A. VAN LUYN.; P.B.VAN WACHEM, J, FEIJEN, **Biomaterials** 17 (1996) 765–773.

LISDAT,F.; SCHAEFER,D. The use of eletrochemical impedance spectroscopy for biosensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**,v.391,n.5,p.1555-1567,2008.

LIMA, J. F. C.; MONTENEGRO,L.M.L.; MONTENEGRO,R.A.; CABRAL,M.M.; LIMA,A.S.;COUTINHO,F.G.; SCHINDLER,H.C.Desempenho da técnica *nested* PCR na detecção específica do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em amostras sanguíneas de pacientes pediátricos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília**, v.35, n.7, p. 690-697, 2009.

LIU,S.,LEECH,D.,JU,H.**Anal.Lett.**2003.36,1.

M. AIZAWA AND S. YABUKI. Electrochemical characteristics of an enzyme-immobilised conducting polymer membrane, *Roe. 51s I Ann. Meet. Jpn. Chem. Soc.*, 1985, p. 6.

MERHVAR,M.;AL.E.Fiber-optic biosensors-trends and advance. **Analytical Science**,v.16,n.1,p.677-692,2000.

M, D'IAZ-GONZ'QLEZ.; M. B. GONZ'ALEZ-GARCÍA AND A. COSTA-GARCÍA.“Immunosensor for *Mycobacterium tuberculosis* on screen-printed carbon electrodes,” **Biosensors and Bioelectronics**, vol. 20, no. 10, pp. 2035–2043, 2005.

MAGNOV, S. N.; WHANGB, M. H.; Surface Analysis with STM and AFM – **Experimental and Theoretical Aspects of Image Analysis.VHC**, Verlagsgessellschaft, 1996.

MELLO, F.C.; FONSECA-COSTA.; J. The utility of molecular biology in the diagnosis of tuberculosis. **Journal Brasileiro Pneumologia, Brasília**, v. 31, n.3, p.188-190, 2005.

MELLO,L.D.;KUBOTA,L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta**,v.72,n.2,p.335-348,2007.

MELLO,A.F. **Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor enzimático para Detrminação de Taninos Hidrolisaveis**.2008.104f.Dissertação de Mestrado em Ciências. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro,2008.

M. GAZOULI., E. LIANDRIS., M. ANDREADOU, L.A. SECHI, S. MASALA, D. PACCAGNINI, J. IKONOMOPOULOS, Specific detection of unamplified mycobacterial DNA by use of fluorescent semiconductor quantum dots and magnetic beads, *J. Clin. Microbiol.* 48 (2010) 2830–2835.

MOYO, M.; OKONKWO, J. O. & AGYEI., N. M. Recent Advances in Polymeric Materials Used as Electron Mediators and Immobilizing Matrices in Developing Enzyme Electrodes. **Sensors** 12, 923–953 (2012).

MONOSIK,R.;STREDANSKY,M.& STURDÍK,E. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca** 5, 109–120 (2012).

NEWMAN, J. D. & SETFORD, S. J. Enzymatic Biosensors. **Molecular Biotechnology** 32, 249–268 (2006).

N. PRABHAKA.; H. SINGH. AND B. D. MALHOTRA. “Nucleic acid immobilized polypyrrole-polyvinylsulphonate film for *Mycobacterium tuberculosis* detection,” **Electrochemistry Communications**, vol. 10, no. 6, pp. 821–826, 2008.

NOUSSAIR, L.;BERT,F.;LEFLON-GUIBOUT.V.;GAYETN E NICOLAS-CHANOINE,M.H. Early Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by a New

Procedure Combining Broth Culture and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, n. 5, p. 1452–1457, 2009

OLIVEIRA,M.D.L.; ANDRADE,C.S.A.; OLIVEIRA,H.P.; C. P. DE MELO. Determinação do ponto isoelétrico de proteínas a partir do uso de diagramas de relaxação dielétrica. Patente, PI 0602995-7. 2006.

OLIVEIRA,M.D.L.; CORREIA,M.T.S.;COELHO,L.C.B.B.;DINIZ,F.B. **Coll. Surf. B** 66 (2008) 13-19.

OLIVEIRA,M.D.L.; CORREIA, M.T.S.; DINIZ,F.B. **Biosens. Bioelectron.** 25 (2009) 728-732.

OLIVEIRA, M.D.L.; CORREIA,T.S.;DINIZ,F.B. **Synth. Metals**, 159 (2009) 2162-2164.

OLIVEIRA,M.D.L.; ABDALLA, D.S.P.; GUILHERME,D.F.; FAULIN,T.E.S.; ANDRADE,C.A.S. **Sens. Act. B** 155 (2011) 775-781.

OLIVEIRA,M.D.L.; DE MELO,C.P.; OLIVA,G.; ANDRADE,C.A.S.. **Coll. Surf. B** 82 (2011) 365-370.

OLIVEIRA,M.D.L.; ANDRADE, C. A. S.; CORREIA, M. T. S. CORREIA, L. C. B. B. COELHO, P. R. SINGH, X. ZENG. **J. Coll. Int. Sci.** 362 (2011) 194-201.

OLIVEIRA, M.D.L.; NOGUEIRA,M.L.; CORREIA,M.T.S.; COELHO, L. C. B. B.; ANDRADE, C. A. S. **Sens. Act. B** 155 (2011) 789-795.

OUERGHIO.;SENILLOU,A.;JAFFREZIC-RENAULT,N.; MARTELET,C.; BEN OUADA,H.;COSNIER,S. 2001. Gold electrode functionalized by electropolymerization of a cyano N substituted pyrrole: application to an impedimetric immunosensor. **J. Electroanal. Chem.** 501 (1–2), 62–69.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Global tuberculosis control, surveillance, planning, financing**: Report. Geneva, 2007. Disponível em: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/full.pdf

PEREIRA ARIAS-BOUDAM.L.; KUIJPER.S.; H. VAN DEUTEKOM, R.; VAN GIJLSWILK, I. PEK EL.; JANSEN.H.M.; KOLK,A.H.J. J. **Immun. Meth.** 283 (2003) 115-124.

PATHIRANA,S.T.;BARBAREE,J.;CHIN,B.A.;HARTELL,M.G.;NEELY,W.C.;VODY ANOY,V.2000.

PANKE, O., BALKEHNHOHL, T., KAFKA, J., SCHAFER, D. & LISDAT, F. Impedance Spectroscopy and Biosensing. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology** 109, 195–237 (2008).

P.V. BAPTISTA.; M.K. MONTEWKA.; J. PALICH-OLE.; G. DORIA.; R. FRANCO. Goldnanoparticle-probe-based assay for rapid and direct detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in clinical samples, **Clin. Chem.** 52 (2006) 1433–1434]

RACUCIU, M.; **Analele Stiintifice ale Universitatii** “Al. I. Cuza” iasi Tomul II, s. Biofizică, Fizică medicală și Fizica mediului 2006, 67.

RIBEIRO, L. **Medicina no Brasil Colonial**. Rio de Janeiro: Sul Americana, 1971.

RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília**, v. 35, n.1, p.51-58, 2002.

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

SALKIND, A. J.; SINGH, P.; CANNONE, A.; ATWATER, T.; WANG, X.; REISNER, D.; **J. Power Sources** 2003, 116, 174.

SARMIENTO, O.L.; WEIGLE, K.A.; ALEXANDER, J.; WEBER, D.J.; MILLER, W.C. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. **Journal of Clinical Microbiology, Washington**, v. 41, p. 3233-3240, 2003.

SHIRATORI, S. S.; RUBNER, M. F.; **Macromolecules**, 33, 4213, (2000).

SAKAI-KATO, K. & ISHIKURA, K. Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology. **Analytical Sciences** 25, 969–978 (2009).

SCHERER, L.C. Cost-effectiveness analysis of PCR for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. **BioMed Central Infectious Diseases**, London, v.9, p.216, 2009.

SUSANTO, H.; SAMSUDIN, A. M.; ROKHATI, N. & WIDIASA, I. N. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. **Enzyme and Microbial Technology** 52, 386–392 (2013).

SCHUHMANN, W. Elektronentransfermechanismen zwischen Redoxenzyme und Elektrodenoberflächen als Grundlage für die Entwicklung amperometrischer Enzymelektroden, **Habilitationsschrift, TLJ München**, Germany, 1993.

TORTOLI, E. The new mycobacteria: an update. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.48, p.159-178, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TALELLI, M., RIJKEN CJ, LAMMERS, T et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles encapsulated in biodegradable thermosensitive polymeric micelles:

toward a targeted nanomedicine suitable for imageguided drug delivery. **Langmuir** 2009; 25: 2060–2067.

TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology** 20, 55–62 (2009).

TUBERCULOSE. **Boletim de Vigilância em Saúde**, Recife, p.6-7, 2011.

UPADHYAY,P.; HAINF, M.;S. Bhaskar, Visual detection of IS6110 of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a test based on colloidal gold and látex beads, **Clin. Microbiol. Infect.** 12 (2006) 1118–1122.

VIEIRA, F. D. et al. Metodologia para caracterização de proficiência em leitura de resultados baciloscópicos para o diagnóstico da tuberculose. *Jornal Brasileiro Pneumologia*, Brasília, v.34, n.5, p.304-311, 2008.

ZENG,X.; ANDRADE,C.A.S.; OLIVEIRA, M.D.L.;X. L. SUN. **Anal. Bioanal. Chem.** 402 (2012) 3161-3176.

ZEEMAN,R.; DIJKSTRA, P.J.; VAN WACHEM,P.B.; M.J.A., VAN LUYN, M. HENDRIK, P.T. Cahalan, **J. Feijen, Biomaterials** 20 (1999) 921–931.

ZHANG.H.L.; LAI,G.S; D.Y. HAN.; A.M. Yu. An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of horseradish peroxidase on an electrode modified with magnetic dextran microspheres, **Anal. Bioanal. Chem.** 39(2008).

WANG, Q.; LI, N.; **Talanta** 2001, 55, 1219.

WHO GLOBAL TUBERCULOSIS CONTROL 1, 2009. **Epidemiology, Strategy, and Financing**. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/pdf/full_report.pdf.

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

7. CONCLUSÕES

As análises realizadas de VC e EIE indicaram que a imobilização correta do sistema sensor PAH/NpFe₃O₄/TB e AMB/NpFe₃O₄/TB na superfície do eletrodo de ouro por etapa de adsorção do analito. As análises realizadas de VC e EIE para os sistemas PAH/NpFe₃O₄/TB e AMB/NpFe₃O₄/TB, indicaram uma resposta satisfatória para o sistema AMB/NpFe₃O₄/TB, pois em VC obteve uma transferência eletrônica satisfatória e na EIE um aumento da resposta na transferência de carga. Com relação as análises realizadas de VC e EIE para os sistemas PAH/NpFe₃O₄/TB/MTB não respondeu de maneira satisfatória além de apresentar baixa sensibilidade do sensor. O sistema AMB/NpFe₃O₄/TB/MTB indicou uma resposta satisfatória para o sistema com uma excelente sensibilidade do sistema frente ao MTB. As imagens obtidas pelo AFM também indicaram a presença do sistema sensor AMB/NpFe₃O₄/TB como também do mesmo frente ao MTB. De modo geral, o Sistema sensor AMB/NpFe₃O₄/TB foi capaz de detectar o MTB, proporcionando uma perspectiva para detecção e tratamento da tuberculose.

Ms. No.: JCIS-14-1274R1

Title: SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS OF MERCAPTOBENZOIC ACID AND MAGNETITE NANOPARTICLES AS AN EFFICIENT SUPPORT FOR DEVELOPMENT OF TUBERCULOSIS GENOSENSOR

Corresponding Author: Dr Maria Danielly Lima de Oliveira

Authors: Maurilia P Costa, BSc; Cesar A Andrade, PhD; Rosana Montenegro, PhD; Fabio L Melo, PhD;

Dear Dr de Oliveira,

I am pleased to inform you that your manuscript referenced above has been accepted for Publication in the Journal of Colloid & Interface Science.

Proofs of the article will be sent to you in the near future.

Many thanks for submitting your manuscript to the Journal of Colloid & Interface Science. We hope that you have been pleased with the handling of your manuscript, and that you will consider submitting other quality manuscripts in the future. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/5 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly.

With kind regards,

The Editors
Journal of Colloid and Interface Science
Editorial Office
Elsevier
525 B Street, Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495
USA
Phone: [\(619\) 699-6397](tel:(619)699-6397)
Fax: [\(619\) 699-6855](tel:(619)699-6855)
E-mail: jcis@elsevier.com

SELF-ASSEMBLED MONOLAYERS OF MERCAPTobenzoic ACID
AND MAGNETITE NANOPARTICLES AS AN EFFICIENT SUPPORT
FOR DEVELOPMENT OF TUBERCULOSIS GENOSENSOR

Maurilia P. Costa¹, Cesar A.S. Andrade², Rosana A. Montenegro³,

Fabio L. Melo³, Maria D.L. Oliveira^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de
Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901
Recife, PE, Brazil

³Laboratório de Doenças Transmissíveis, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
50670-420, Recife, PE, Brazil

*To whom correspondence should be addressed:

M.D.L. Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil

Phone: +55-81-2126.8450; Fax: +55-81-2126.8547

E-mail:

m_danielly@yahoo.com.br

Abstract

In this work, a genosensor for the electrochemical detection of genomic DNA from *M. tuberculosis* was developed. The biosensor is based on self-assembled monolayers of mercaptobenzoic acid (MBA) and magnetite nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$) on bare gold electrode for immobilization of DNA probe. The aim of this work was the development of a platform based on cysteine-coated magnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ linked via the carboxylate group from MBA to the work electrode surface and subsequently to the DNA probe. The probe-genome interaction was evaluated using a $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ redox pair. Cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) were used to evaluate the bioelectrochemical behavior of the sensor. Atomic force microscopy images showed $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ immobilized across the electrode surface. The interaction of the sensor with different genome DNA concentrations resulted in changes in the charge transfer resistance, indicating a possible use for tuberculosis detection at low concentrations (detection limit of $6 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$).

Keywords: biosensor; tuberculosis; nanoparticles; electrochemical impedance spectroscopy; cyclic voltammetry.

1. Introduction

Tuberculosis (TB) is a common infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* and is one of the most widespread causes of death from a single infectious agent. The World Health Organization estimates that millions of new cases are discovered every year, resulting in ~2.4 million of deaths. Conventional methods for TB diagnosis, such as bacteriological culture, radiographic methods, polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, immunoassays and southern hybridization techniques are expensive, time-consuming and laborious [1]. Diverse molecular methods have been developed for the direct identification of TB [2, 3]. Due to the precedence of TB as an important public health issue and the spread of drug-resistant tuberculosis the development of a new and rapid method for diagnosis is crucial. TB is a worldwide public health problem which demands new methods for diagnosis that include portability, cost-efficiency, and the possibility for reuse. To overcome these limitations, electrochemical assays have been used to provide a simple, reliable, inexpensive, sensitive, and selective platform for the deoxyribonucleic acid (DNA) detection [4].

Electrochemical biosensors are based on the application of low AC voltage overlaid onto a DC bias potential for the sensing electrode, and the AC current obtained thereof in the steady state [5]. It is important to note that the applicability of electrochemical impedance spectroscopy (EIS) in the development of biodevices has been increasing [6-9]. EIS has become one of the most used techniques for the development of biosensors since it is a useful tool to evaluate the interactions between biomolecules. In this context, this technique has found diverse applications in distinct fields due to its sensitivity and effectivity for analyzing interfacial phenomena in modified electrodes, essentially becoming an excellent alternative to traditional methods

of diagnosis [10, 11]. Compared to other techniques, one of the advantages of EIS is that it provides information about electrode kinetics and the electrical double layer. Cyclic voltammetry (CV) is a method that provides the interface information of a biologically modified electrode, enabling monitoring of the rate of charge transfer between the electrode and the solution [12]. Electrochemical techniques have been extensively used to characterize the development of biosensors and to evaluate biomolecular recognition [13, 14].

Metal oxide nanoparticles exhibit unique properties, such as increased surface area, magnetism, chemical reduction, ligand sequestration and optical characteristics [15-17]. In general, magnetic nanoparticles have advantages such as good susceptibility, dispersibility and the ability to be used in association with other metal nanoparticles to obtain new properties without change in its magnetic properties [18, 19]. In addition, magnetic nanoparticles covered by a thin gold layer have been used for isolation, purification or detection of genomic DNA [20]. In addition, magnetite nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$) offer a versatile tool for the development of DNA-based electrochemical sensors [21]. The use of nanotechnology for the development of genosensors has attracted attention due to potential applications in forensic identification, epidemic prevention and disease diagnosis [22].

Self-assembled monolayers (SAMs) have been extensively used in derivatization procedures to obtain versatile modified surfaces, offering a molecular dimension with organization and homogeneity [23, 24]. Metal surfaces can be modified using SAMs based on organic molecules that contain anchor groups such as thiols, disulphides, silanes or acids to enhance the biomolecular stability. Mercaptobenzoic acid (MBA) has an SH sulfhydryl functional group that interacts with metal surfaces and a carboxylic acid group available for covalent interaction with nanostructures and biomolecules. In

this point of view, nanostructured sensors are an excellent alternative for new methods of diagnosis since they are rapid, inexpensive, sensitive and present accurate identification [25, 26].

In the present study, we developed a sensitive nanostructured layer based on DNA probes chemically attached to Fe₃O₄Nps that can be used for monitoring the hybridization of TB DNA. The proposed sensor requires the use of small volumes and low concentrations of analyte. Amino functionalized Fe₃O₄NPs were bound to the self-assembled monolayer of the MBA through 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) coupling. After that, 5'-amino modified DNA probes were chemically bound to the Fe₃O₄Nps-MBA-modified electrode using the EDC/NHS coupling method. The modification of Fe₃O₄Nps with aminated groups was important to provide covalent linkage between COOH MBA groups and NH₂-Fe₃O₄Nps. This assembly enabled electrode surface modification to receive the biological sample in study. In addition, this coverage of the electrode is an efficient maintenance tool for the biological structure. Finally, the obtained sensor system was used for specific detection of the genetic material of patients contaminated with *M. tuberculosis*. To the best of our knowledge, this is the first report about TB diagnosis using Fe₃O₄Nps and MBA self-assembled monolayers (SAMs). An overview of the fabrication process of the biosensor is shown in Fig. 1. The assembly process and sensor assays were characterized by CV, EIS and atomic force microscopy.

2. Experimental

2.1. Materials

Ferric chloride, ferrous chloride, potassium ferri- and ferrocyanide were obtained from VETEC (Brazil). 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) and MBA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). All chemicals and solvents were of analytical grade and used as received, without further purification. Water used was obtained from a Milli-Q plus (Billerica, USA) purification system. TB samples were obtained from the stocks at the Laboratory of Parasitology at Aggeu Magalhaes Research Center (Recife, Brazil). All samples were previously characterized using RT-qPCR. The sequence for the amine-modified DNA probes used for the development of the biosensor was 5' - TCAGGGGATGGGGCCTAG - 3' [27].

2.2. *Synthesis and chemical modification of Fe₃O₄Nps*

Magnetite nanoparticles were synthesized using the coprecipitation method of Fe³⁺ and Fe²⁺ [28]. 0.1 M FeCl₃•6H₂O and 0.5 M FeSO₄•7H₂O were mixed in 200 mL of water under stirring for 30 min under N₂ atmosphere. Subsequently, a 1.5 M NH₄OH aqueous solution was added into the resulting mixture dropwise until the liquid turned blackish, and was left under stirring overnight at room temperature. The synthesized magnetite particles were separated using magnetic field. NH₂-modified Fe₃O₄Nps were obtained according to the literature [29]. First, 0.2g magnetite particles were dispersed in 90mL of ethanol (50%) using an ultrasonic bath. Afterward, 300 μL APTES and 500 μL NH₄OH were added dropwise to the previous solution. The resulting solution was heated to 60° C under a stream of nitrogen for 6 hours with vigorous agitation.

2.3. *Immobilization of TB DNA probe and hybridization with genomic DNA target*

The bare gold disk electrode (BGE) with $\phi = 2\text{mm}$ (Microchimica, Brazil) was polished with alumina powder (0.05 μm), sonicated in ultrapure water (18 MΩ cm⁻¹) for

10 min and air dried. Afterward, 2 μL MBA (5%) was dropped on the electrode surface until dry to obtain MBA SAMs on gold surface. The carboxylic groups presented in the MBA molecules were activated using an aqueous solution containing 0.4 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDC and 0.1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NHS (1:1 v/v) for 20min. Subsequently, the electrode was washed and 2 μL $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ was dropped on the MBA-EDC/NHS-modified electrode, waiting 10 min to obtain the MBA-EDC/NHS- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ system. Then, MBA-EDC/NHS- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -modified electrode was activated with glutaraldehyde to allow the immobilization of DNA probe_{tuberculosis}, incubated for 30 min and washed with phosphate buffered saline (PBS). In addition, the specificity of the AMB- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe_{tuberculosis}-modified electrode was evaluated against genomic DNA target (Fig. 1) at different incubation times (1, 10, 20 and 30 min).

2.4. Electrochemical measurements

Electrochemical data was obtained by a PGSTAT 128N potentiostat/galvanostat (Autolab, Eco-Chemie, Netherlands) interfaced with an analyzer controlled by a computer. The experiments were performed using a three-electrode system in a conventional cell composed by a BGE platinum electrode and Ag/AgCl saturated with KCl as working, counter and reference electrodes, respectively. 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1:1) solution containing 0.15 M NaCl was used as a redox probe in PBS (pH 7.4). CV measurements were performed at potential range between +0.7 V and -0.2 V at a scan rate of 50 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. EIS frequency ranges were between 100 mHz to 100 kHz with amplitude of the applied sine wave potential of 10 mV. Electrochemical measurements were carried out at room temperature and inside a Faraday cage. All experiments were performed in triplicate using at least three different sensors.

2.5. Atomic force microscopy measurements

Structural analysis of the sensor was performed by an atomic force microscope (Agilent AFM, Picoplus Molecular Imaging, USA) [7]. Cantilevers with a silicon AFM probe (Multi 75AL, NCHR, resonant frequency = 75 kHz, force constant = 3 N m⁻¹) were used for the noncontact mode AFM in air at room temperature (approximately 25° C). Lateral resolution was set to 512 × 512 pixels in a scan area of 5 × 5 μm. To eliminate artifacts, images were obtained from at least two macroscopically-separated areas on each sample and analyzed using AFM Gwyddion software [30].

3. Results and discussion

Morphological analyses

Atomic force microscopy was used to confirm the self-assembled process of the biosensor construction and investigate the changes of the surface morphology of the sensor system before and after interaction with TB genomic DNA samples. After the adsorption of the Fe₃O₄Nps nanoparticles on the solid substrate surface, the smooth surface morphology of the clean substrate was modified due to the presence of dispersed particles (Fig. 1a). It was observed that the small particles had z-average diameter values of 15 ± 1.7 nm, similar to previous studies [31]. In sequence, the interaction of the Fe₃O₄Nps with the oligonucleotide sequence resulted in the increase of the surface roughness (Fig. 1b) and z-average diameter values of 21 ± 2.2 nm. The difference of ~6nm corresponded to the height of oligonucleotides comprised by 18 bases [32]. Of note, amino groups on the surface of the Fe₃O₄Nps were used not only as covalently linked groups, but also as protective groups [33].

The specific interaction with samples from patients contaminated with TB resulted in a dramatic change in the morphology and heterogeneous surface with the presence of some peaks, indicating that the TB sample was successfully recognized on the sensor surface (Fig. 1c). On the other hand, Fig. 1d shows the morphology for a non-complementary target where there were no significant changes on the sensor surface. Therefore, our results confirm the specificity of the sensor, since the nonspecific adsorption on the DNA modified-biosensor surface was not significant.

Electrochemical characterization

CV is an effective method for providing information for the changes in electrode behavior after each step of modification, since the changes in peak current and the separation of peak potentials are related to electron transfer resistance [6]. Each step of surface modification was monitored by CV using a $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ solution containing 0.15 M NaCl in PBS (pH 7.4) as a redox probe.

CV and EIS spectra of the stepwise electrode surface modification are shown in Fig. 3. As shown in Fig. 3a, the redox probe $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ revealed a reversible cyclic voltammogram for the gold electrode. A decrease in the current response was observed after the modification of BGE by MBA, due to the repulsion effect between the negative charges of MBA and the redox pair. MBA SAMs are an excellent alternative to enhance the genosensor performance due to the presence of the aromatic ring [34]. In addition, the carboxylic group can be used for the covalent linkage of biomolecules and act as an anchor for interfacing the modified magnetic nanoparticle [34, 35]. Previously, some authors [36] reported no difference in electrode surface coverage using MBA after a prolonged adsorption time due to the formation of stable and ordered MBA films. In addition, the presence of aromatic thiols can lead to the

establishment of π -stacking [37]. Metal nanoparticles, such as $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$, can be oxidized or reduced electrochemically resulting in enhanced sensitivity of the biosensor [38]. Voltammograms have demonstrated a quasi-reversible behavior after the presence of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -MBA at the electrode surface when compared with cleaned electrode. Subsequently, the electrode was activated by the co-addition of NHS and EDC coupling agents.

The negatively charged terminal carboxylic group of MBA was replaced by NHS ester. Thus, the carboxylic group replacement contributed to the electrostatic attraction between the neutrally/positively charged NHS ester and the negative redox probe resulting in increased current response [39]. The amperometric response decreases after the binding of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ to MBA monolayers, since the penetration of the redox probe is reduced. This modification decreased the current peaks and the presence of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ at electrode surface, promoting a biocompatible layer for biosensor development. In addition, after the DNA probe immobilization and DNA target hybridization, the anodic and cathodic peaks were reduced. The decrease in the amperometric response of the sensor system was attributed to the blocking effect of biomolecular recognition that reduces the electron transfer of the redox pair (Fig. 3a).

EIS can provide further information for the impedance changes during the modification process and is an effective way to measure to electron transfer resistance (R_{CT}) [8]. R_{CT} corresponds to the semicircle diameter of the Nyquist diagram. EIS was carried out to characterize the assembly process on the BGE surface in the frequency range of 100 mHz to 100 kHz.

Complex impedance plots of BGE and stepwise electrode modification are shown in Fig. 3a. Fig. 3b shows the Nyquist plots for each step of assembly. Cole-Cole semicircle is composed by two well-defined regions at higher and lower frequencies,

corresponding to the electron transfer-limited and diffusion-limited electron transfer processes, respectively. The MBA impedimetric response showed greater interfacial electron transfer resistance ($R_{CT} = 175 \text{ k}\Omega$), indicating that the adsorbed layer obstructed the electron transfer of the electrochemical probe. The modification of the MBA layer using NHS/EDC coupling agents resulted in a decrease of the R_{CT} ($R_{CT} = 14.50 \text{ k}\Omega$). After the immobilization of the $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ on AMB-modified electrode an increased in the $R_{CT} = 29.50 \text{ k}\Omega$ was obtained. As expected, after the coupling of $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -AMB-modified electrode with DNA probe_{tuberculosis}, the interfacial resistance increased remarkably ($R_{CT} = 168.0 \text{ k}\Omega$). EIS data indicated the presence of molecules at the electrode surface, where the amount of material immobilized and adsorbed reflected the increase in impedance response. Furthermore, the layers were successfully assembled on the BGE surface.

In addition, the time of incubation and hybridization have an important role for the performance of biosensor. Of note, the incubation period is involved in the rate of available molecules for biomolecular recognition. A detailed study to determine the incubation time was carried out (Fig. 3c). In our study, the increased time of incubation resulted in an increase in the electrochemical response. Estimates of the best response were based on tendency of plateau of the R_{CT} of DNA probe_{tuberculosis} versus time of incubation.

Detection of TB genomic DNA target

Fig. 4 shows the representative voltammograms and Nyquist diagrams of the genosensor exposed to different concentrations of TB genomic DNA target. Fig. 4a shows the CVs for the sensor system at different concentrations of genomic DNA target. After the modification of the electrode surface and the DNA target recognition

process, a decrease was observed in the CV peaks of the redox probe followed by an increase in the peak-to-peak separation (Fig. 4a). The extent of adsorption can be expressed in a relative percent deviation (RPD),

$$I(\%) = \frac{[(1/I_b) - (1/I_a)]}{(1/I_b)} \quad (1)$$

, where I_b and I_a correspond to the anodic peak current before and after the hybridization process, respectively. Table 1 shows the result of RPD for the MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe-modified electrode before and after the reaction with different concentrations of DNA target.

A more detailed study was carried out for different TB genomic DNA target concentrations, demonstrating that specific DNA interaction can be quantitatively assessed by the sensor (Fig. 4b and 4d). Curves d-h (Fig. 4b) represent the concentration of TB genomic DNA target (6, 12, 20, 30 and 40 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). R_{CT} increased along with the increase of TB DNA target concentration as shown in curves d-h (Fig. 4b).

The electrochemical impedance diagrams (Nyquist plots) were subjected to an analysis of data through EQUIVCRT [40], from which theoretical curves were obtained for each system as a valuable tool to explore the interfacial behavior of the sensor system in the recognition of TB DNA target sequences. The experimental spectra were fitted using a modified Randles equivalent circuit (Fig. 4c). Warburg impedance (Z_w) represents the impedance of semi-infinite diffusion of the redox probe to the electrode. The ohmic resistance of the solution (R_Ω) is associated with the bulk properties of the electrolyte solution. Constant-phase element (Q) represents the behavior of a double layer for a non-homogeneous system. Electron transfer resistance (R_{CT}) is related to the dielectric features of a material to charge transport.

The Bode plot demonstrates three types of elements of the equivalent circuit (Fig. 4d). At the low frequency range the response of the double layer capacitance

represented by the phase constant element was observed. A frequency region below 3 kHz corresponded to R_{CT} and the region above 20 kHz was related to solution resistance. In this context, in the capacitance region of frequency negligible changes in Q values were obtained during the hybridization process at different concentrations of genomic DNA target, showing a non-capacitive behavior of the bioelectrode. MBA- Fe_3O_4 Nps-DNA-probe modified electrode showed a well-defined concentration-dependence curve for the TB genome interaction.

The obtained results demonstrated that the biosensor retained the capability to recognize the specific DNA target (Table 2). The performance of the biosensor for detection of TB genomic DNA target was evaluated through the relative variation of the R_{CT} (ΔR_{CT}), according to the equation:

$$\Delta R_{CT}(\%) = \frac{R_{CT(recog)} - R_{CT(sensor)}}{R_{CT(sensor)}} \quad (2)$$

where $R_{CT(recog)}$ is the value of the electron-transfer resistance after the DNA target recognition, and $R_{CT(sensor)}$ corresponds to the R_{CT} value of the sensor layer. Sensitivity analysis for TB genomic DNA target was evaluated from the ΔR_{CT} results.

A linear relationship between the ΔR_{CT} and DNA target concentration was found (Fig. 5a) with the correlation coefficient of 0.98, indicating that the interactions between probe and DNA target can be sensed by the modified electrode. The detection limit of $6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ was estimated from the signal-to-noise characteristics of these data ($S/N=3$). The signal-to-noise ratio was obtained from the impedimetric variation divided by the standard deviation [41]. The increase in ΔR_{CT} seemed to present a profile of saturation (Fig. 5a). Our detection limits were similar to previous reports that used electrochemical techniques for the specific detection of the TB DNA target [42, 43]. However, these reports had limitations based on the identification of only a small tuberculosis-specific

DNA fragment [42] or necessity of Co(phen)_3^{3+} indicator binding to the biorecognition analysis [43]. On the other hand, gold nanoparticles associated with nucleotide probes have been used in colorimetric assays to identify TB DNA with a detection limit of $18.75 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ [44], but the cost per test corresponds to ~70-120% of RT-PCR.

We can observe that the filling of the recognition sites by DNA target surface coverage (Θ) can be calculated by:

$$\text{---} \quad (3)$$

, where R_B is the charge transfer resistance for MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe biosystem and R_C is the charge transfer resistance obtained for different concentrations of the TB DNA target hybridized with the biosensor. Figure 5b shows a plot of Θ as a function of concentration of DNA target bound to the sensor. The value of Θ increases with increasing DNA-target concentration and is found to be ~0.82 (82%) of the $40 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNA target.

A regeneration study was performed by exposing the sensor to a $100\mu\text{L}$ alkaline solution (0.5 M NaOH with 3 M NaCl) for 20 minutes [45]. Of note, extra time for the dehybridization experiments was necessary as compared to hybridization study, since it is necessary to disrupt the DNA base-stacking interactions [46]. The biosensor can be regenerated for five cycles, allowing reuse until its loss of hybridization capacity. The results revealed a relative standard deviation (R.S.D.) of 1.32%, $n= 3$.

In addition, selectivity is a crucial factor to be considered for DNA sensors. The selectivity of the biosensor was investigated by monitoring changes in the R_{CT} response by incubating with complementary and non-complementary DNA sequences (Fig. 4c, curve c). We used non-complementary genomic DNA from Leishmaniasis as a negative control. The interaction of the biosensor with a non-complementary DNA sequence

(negative control) resulted in an insignificant R_{CT} value, revealing the selectivity of the bioelectrode. The reproducibility of the DNA sensor using at least three DNA sensors fabricated independently at the same conditions was evaluated. An acceptable R.S.D. of ~5% was obtained, suggesting that the DNA sensor is reproducible. Our results indicate the applicability of the MBA-Fe₃O₄Nps layer as an excellent matrix to immobilize biomolecules for the development of a useful biosensor for tuberculosis using small volumes of samples.

4. Conclusions

The impedimetric response demonstrates the success of the modification process on the electrode surface. The TB DNA sensor showed an increased impedimetric response to increasing target DNA concentrations. The sensitivity of the biosensor for TB genomic DNA target was 6 ng.μL⁻¹. The biosensor showed acceptable performances for the determination of TB DNA target, exhibiting low detection limit, selectivity and reproducibility in the DNA hybridization assay. The proposed biosensor has advantages such as operation convenience, capability of analyzing small quantities of biological material within minutes and the possibility for use in a miniaturized format. We believe that the present results are an important basis for the development of sensitive DNA sensors and a useful strategy for tuberculosis diagnosis using clinical samples.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support provided by FACEPE, CNPq and Rede de Nanobiotecnologia/CAPES. Andrade and Oliveira are also gratefully for the financial support from CNPq (grant 310305/2012-8 and 310361/2012-5, respectively). M.P. Palmeira would like to thank FACEPE for a M.Sc. scholarship.

References

- [1] N. Prabhakar, K. Arora, S.K. Arya, P.R. Solanki, M. Iwamoto, H. Singh, B.D. Malhotra, *Analyst* 133 (2008) 1587.
- [2] K.L. Kaul, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1553.
- [3] M. Koziol-Montewka, A. Kolodziejek, J. Oles, L. Janicka, *Immunol. Invest.* 33 (2004) 277.
- [4] C.P. Wang, X.Q. Yuan, X.H. Liu, Q. Gao, H.L. Qi, C.X. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 799 (2013) 36.
- [5] J.Y. Park, S.M. Park, *Sensors* 9 (2009) 9513.
- [6] M.D.L. Oliveira, D.S.P. Abdalla, D.F. Guilherme, T.E.S. Faulin, C.A.S. Andrade, *Sensors Act. B-Chem.* 155 (2011) 775.
- [7] M.D.L. Oliveira, C.A.S. Andrade, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.R. Singh, X.Q. Zeng, *J. Coll. Interf. Sci.* 362 (2011) 194.
- [8] M.D.L. Oliveira, M.L. Nogueira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, C.A.S. Andrade, *Sensors Actuat. B-Chem.* 155 (2011) 789.
- [9] A.B. Kharitonov, L. Alfonta, E. Katz, I. Willner, *J. Electroanal. Chem.* 487 (2000) 133.
- [10] Y.X. Hou, S. Helali, A.D. Zhang, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, J. Minic, T. Gorojankina, M.A. Persuy, E. Pajot-Augy, R. Salesse, F. Bessueille, J. Samitier, A. Errachid, V. Akimov, L. Reggiani, C. Pennetta, E. Alfinito, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1393.
- [11] I. Navratilova, P. Skladal, *Bioelectrochem.* 62 (2004) 11.
- [12] A.J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, 2000.

- [13] J.G. Guan, Y.Q. Miao, Q.J. Zhang, *J. Biosci. Bioeng.* 97 (2004) 219.
- [14] E. Katz, I. Willner, *Electroanal.* 15 (2003) 913.
- [15] S. Sarkar, E. Guibal, F. Quignard, A.K. SenGupta, *J. Nanopart. Res.* 14 (2012) 715.
- [16] K. Pospiskova, I. Safarik, M. Sebela, G. Kuncova, *Microchim. Acta* 180 (2013) 311.
- [17] E. Katz, I. Willner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 6042.
- [18] P. Tartaj, M.D. Morales, S. Veintemillas-Verdaguer, T. Gonzalez-Carreno, C.J. Serna, *J. Phys. D Appl. Phys.* 36 (2003) R182.
- [19] M. Pita, J.M. Abad, C. Vaz-Dominguez, C. Briones, E. Mateo-Marti, J.A. Martin-Gago, M.D.P. Morales, V.M. Fernandez, *J. Coll. Interf. Sci.* 321 (2008) 484.
- [20] H.D. Hill, R.A. Vega, C.A. Mirkin, *Anal. Chem.* 79 (2007) 9218.
- [21] K. Li, Y.J. Lai, W. Zhang, L.T. Jin, *Talanta* 84 (2011) 607.
- [22] Q.R. Zhang, P.P. Dai, Z.S. Yang, *Microchim. Acta* 173 (2011) 347.
- [23] A. Ulman, *An introduction to ultrathin organic films from Langmuir-Blodgett to self-assembly*, Academic Press, New York, 1991.
- [24] J.D. Swalen, D.L. Allara, J.D. Andrade, E.A. Chandross, S. Garoff, J. Israelachvili, T.J. Mccarthy, R. Murray, R.F. Pease, J.F. Rabolt, K.J. Wynne, H. Yu, *Langmuir* 3 (1987) 932.
- [25] W. Wang, L.N. Song, Q. Gao, H.L. Qi, C.X. Zhang, *Electrochem. Commun.* 34 (2013) 18.
- [26] Y. Zhang, K. Zhang, H. Ma, *Amer. J. Biomed. Sci.* 1 (2009) 115.
- [27] L.E. Desjardin, M.D. Perkins, K. Wolski, S. Haun, L. Teixeira, Y. Chen, J.L. Johnson, J.J. Ellner, R. Dietze, J. Bates, M.D. Cave, K.D. Eisenach, *Am. J. Resp. Crit. Care* 160 (1999) 203.
- [28] H.P. de Oliveira, C.A.S. Andrade, C.P. de Melo, *J. Coll. Interf. Sci.* 319 (2008)

441.

- [29] N. Gan, H.J. Jin, T.H. Li, L. Zheng, *Int. J. Nanomed.* 6 (2011) 3259.
- [30] D. Necas, P. Klapetek, C. Anderson, *Gwyddion*, <http://www.gwyddion.net> (2008).
- [31] M. Yamaura, R.L. Camilo, L.C. Sampaio, M.A. Macedo, M. Nakamura, H.E. Toma, *J. Magn. Magn. Mater.* 279 (2004) 210.
- [32] Z.L. Zhang, D.W. Pang, H. Yuan, R.X. Cai, H. Abruna, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 833.
- [33] Z.X. Zhang, X.L. Wang, X.R. Yang, *Analyst* 136 (2011) 4960.
- [34] H. Wang, H. Ohnuki, H. Endo, M. Izumi, *Phys. Procedia* 14 (2011) 2.
- [35] R.G. Nuzzo, L.H. Dubois, D.L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 558.
- [36] Y. Jalit, F.A. Gutierrez, G. Dubacheva, C. Goyer, L. Coche-Guerente, E. Defrancq, P. Labbe, G.A. Rivas, M.C. Rodriguez, *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 424.
- [37] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1103.
- [38] L. Ding, A.M. Bond, J.P. Zhai, J. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 797 (2013) 1.
- [39] P. Geng, X. Zhang, W. Meng, Q. Wang, W. Zhang, L. Jin, Z. Feng, Z. Wu, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 4663.
- [40] B.A. Boukamp, *Sol. State Ionics* 18-9 (1986) 136.
- [41] N. Couniot, D. Flandre, L.A. Francis, A. Afzalian, *Sens. Act. B-Chem.* 189 (2013) 43.
- [42] E. Torres-Chavolla, E.C. Alocilja, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4614.
- [43] J. Wang, G. Rivas, X.H. Cai, N. Dontha, H. Shiraishi, D.B. Luo, F.S. Valera, *Anal. Chim. Acta* 337 (1997) 41.
- [44] E. Liandris, M. Gazouli, M. Andreadou, M. Comor, N. Abazovic, L.A. Sechi, J. Ikononopoulos, *J. Microbiol. Meth.* 78 (2009) 260.

[45] M. Lazerges, H. Perrot, N. Zeghib, E. Antoine, C. Compere, *Sens. Act. B-Chem.* 120 (2006) 329.

[46] A.V. Ladik, F.M. Geiger, S.R. Walter, *Nanoscape* 7 (2010) 19.

Figure Captions

Figure 1. Schematic representation of the fabrication process of the biosensor.

Figure 2. 3D and 2D AFM images of the BGE coated with Fe₃O₄Nps (a), Fe₃O₄Nps-probe (b), MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe-complementary DNA (c) and MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe non-complementary DNA (d), with the corresponding cross section.

Figure 3. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) of the stepwise immobilization of the MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe: bare gold electrode (■), MBA-modified gold electrode (▲), MBA-EDC/NHS (◆), MBA-Fe₃O₄Nps (×), MBA-Fe₃O₄Nps-EDC/NHS (○) and MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe (+). R_{CT} of DNA probe-tuberculosis versus time of incubation (c). The impedance spectra were taken in 10 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz.

Figure 4. Cyclic voltammograms (a), Nyquist plots (b) and Bode plots (d) of the sensor system and its respective interaction with genomic DNA target at different concentrations. Supporting electrolyte: 10mM [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) solution; scan rate of 50 mV.s⁻¹. Equivalent circuit (c) adopted to fit the impedance data where R_Ω is the ohmic resistance of the electrolyte solution, Q the phase constant element, Z_W the Warburg impedance, and R_{CT} the electron-transfer resistance.

Figure 5. $\Delta R_{CT}\%$ of the sensor system after exposure to different concentrations of TB genomic DNA target **(a)** and Θ as a function of concentration of DNA target **(b)**.

Table Captions

Table 1. Amperometric anodic shift for the sensor before and after the hybridization with TB genomic DNA target.

Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

7. APÊNDICE DAS FIGURAS DO ARTIGO

7.1 Figura 1

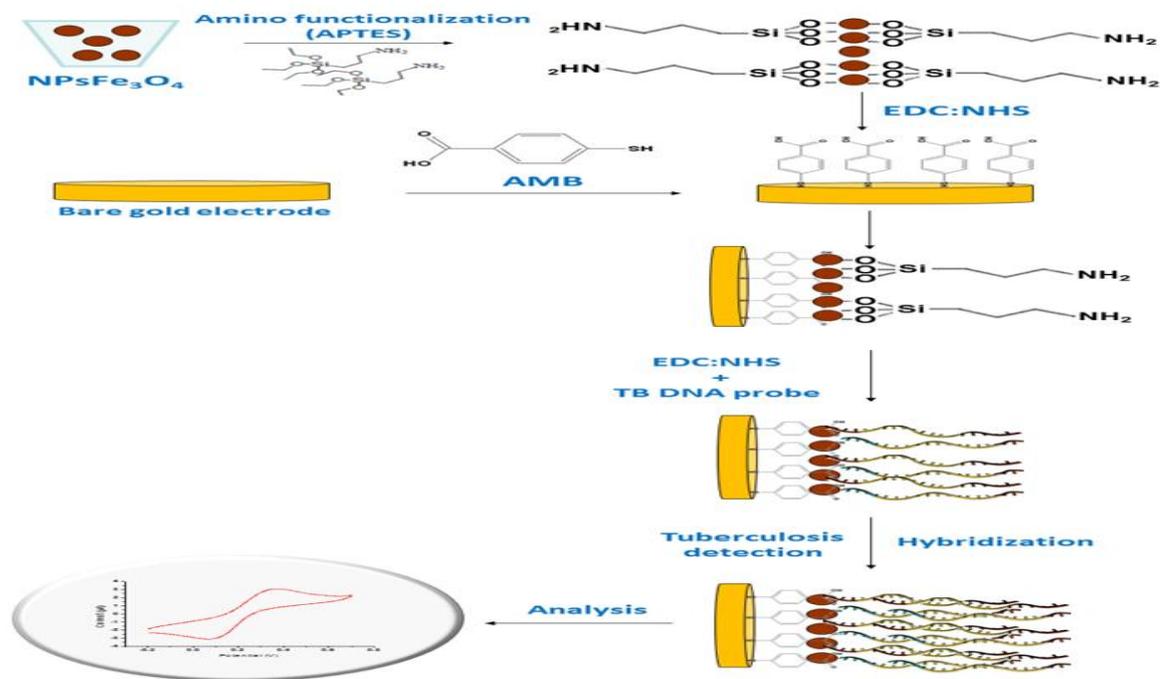


Figure 1. Schematic representation of the fabrication process of the biosensor.

7.2 Figura 2

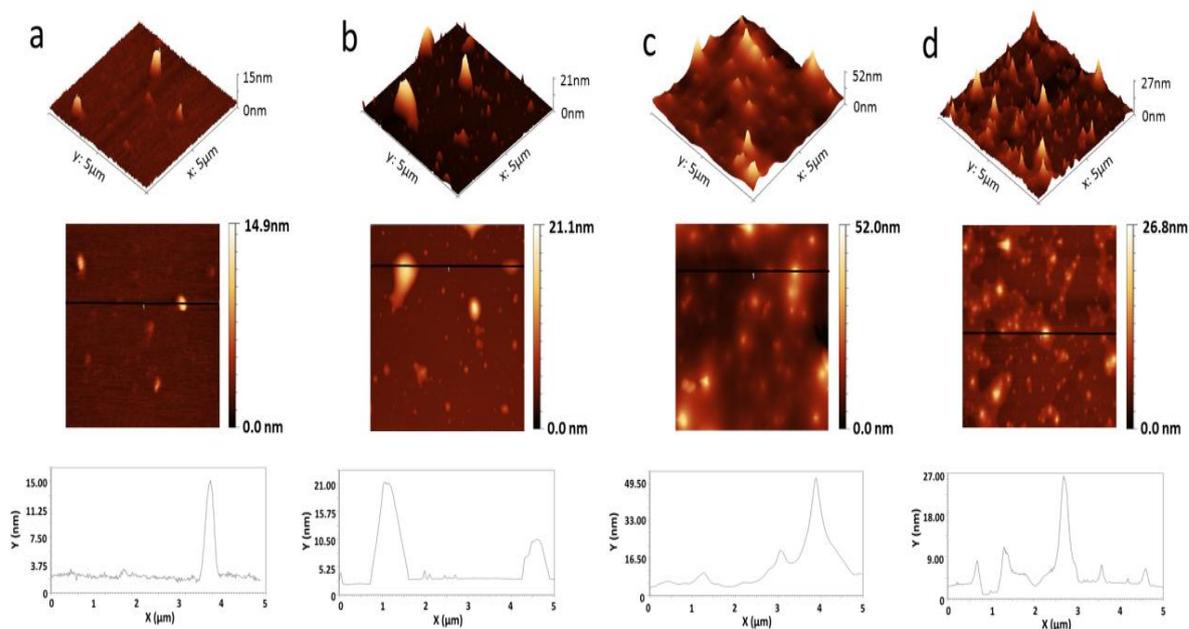


Figure 2. 3D and 2D AFM images of the BGE coated with $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -probe (b), MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe-complementary DNA (c) and MBA- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{Nps}$ -DNA-probe non-complementary DNA (d), with the corresponding cross section.

7.3 Figura 3a

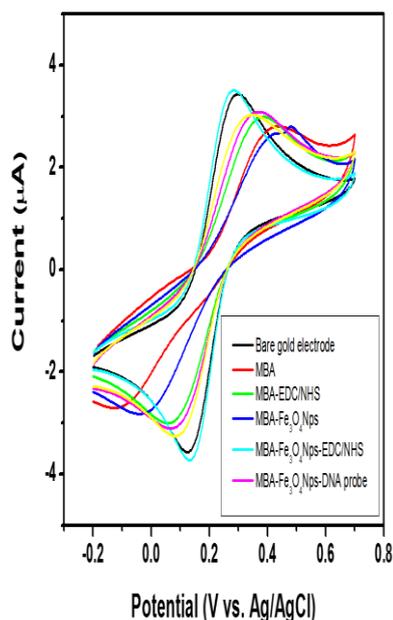


Figura 3b

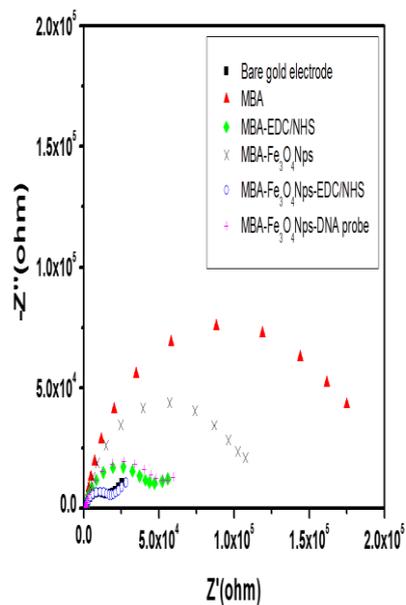


Figura 3c

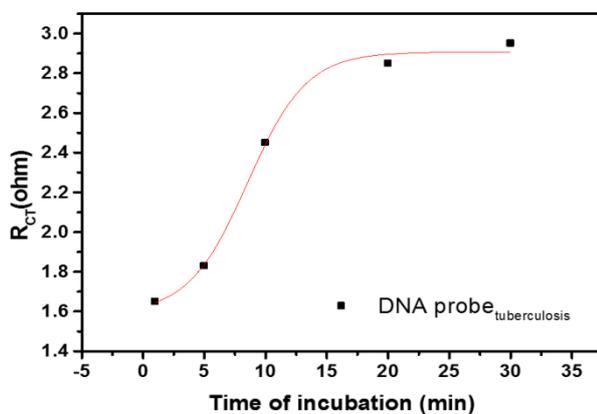


Figure 3. Cyclic voltammograms (a) and Nyquist plots (b) of the stepwise immobilization of the MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe: bare gold electrode (■), MBA-modified gold electrode (▲), MBA-EDC/NHS (◆), MBA-Fe₃O₄Nps (×), MBA-Fe₃O₄Nps-EDC/NHS (○) and MBA-Fe₃O₄Nps-DNA-probe (+). R_{CT} of DNA probe-tuberculosis versus time of incubation (c). The impedance spectra were taken in 10 mM [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) in the frequency range from 100 mHz to 100 kHz.

7.4 **Figura 4a**

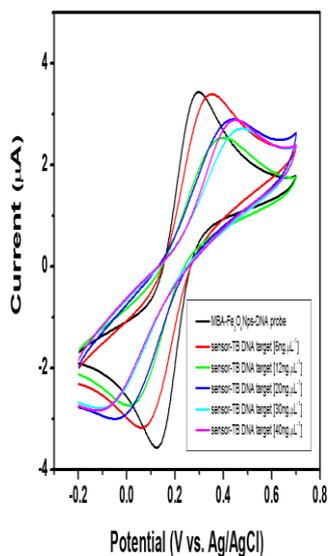


Figura 4b

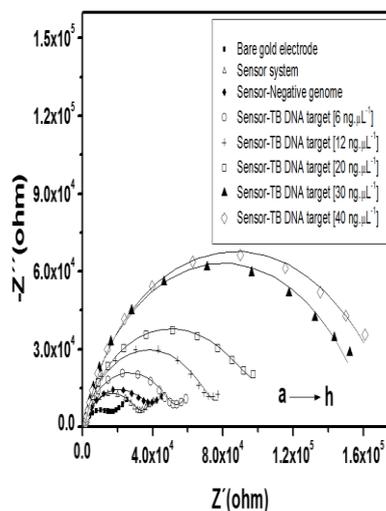


Figura 4c

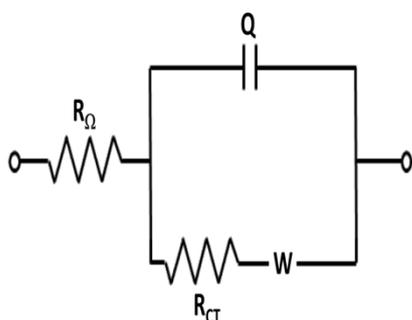


Figura 4d

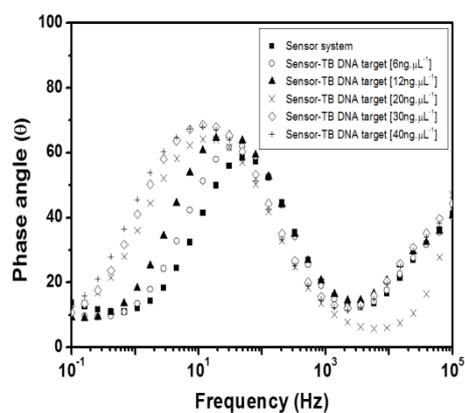


Figure 4. Cyclic voltammograms (a), Nyquist plots (b) and Bode plots (d) of the sensor system and its respective interaction with genomic DNA target at different concentrations. Supporting electrolyte: 10mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 1:1 + 0.15 M NaCl in 10 mM PBS (pH 7.4) solution; scan rate of $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Equivalent circuit (c) adopted to fit the impedance data where R_Ω is the ohmic resistance of the electrolyte solution, Q the phase constant element, Z_W the Warburg impedance, and R_{CT} the electron-transfer resistance.

7.5 Figura 5a

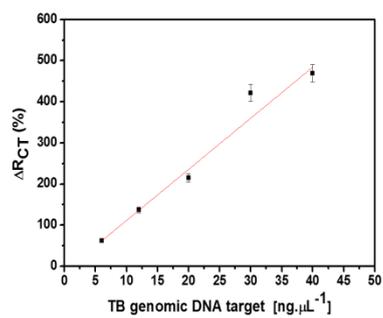


Figura 5b

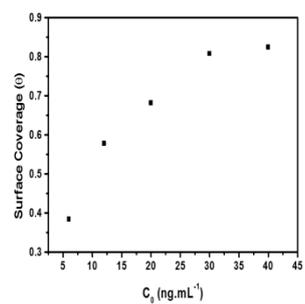


Figure 5. $\Delta R_{CT}\%$ of the sensor system after exposure to different concentrations of TB genomic DNA target **(a)** and Θ as a function of concentration of DNA target **(b)**.

8. APÊNDICE DAS TABELAS DO ARTIGO

8.1 Table 1. Amperometric anodic shift for the sensor before and after the hybridization with TB genomic DNA target.

Sample*	TB DNA target [ng.µL ⁻¹]	Before (1/Ib µA)	After	ΔI (%)
Sensor system	-	0.312	-	-
Sensor system-TB genomic DNA target	6	-	0.482	54.48
Sensor system-TB genomic DNA target	12	-	0.518	66.02
Sensor system-TB genomic DNA target	20	-	0.613	96.47
Sensor system-TB genomic DNA target	30	-	0.621	99.03
Sensor system-TB genomic DNA target	40	-	0.735	135.50

*Sensor system = AMB-Fe₃O₄Nps-DNAprobe_{tuberculosis}

8.2 Table 2. Values of the equivalent circuit elements from fitted impedance results.

Modified electrode	TB DNA target [ng.μL ⁻¹]	R _{CT} (kΩ)	Q (μF)	N
Bare gold electrode	-	15.30 ± 0.21	3.20 ± 0.33	0.82 ± 0.05
AMB-Fe ₃ O ₄ Nps-DNAprobe _{tuberculosis}	-	29.50 ± 0.30	0.82 ± 0.02	0.89 ± 0.03
Sensor system-TB genomic DNA target	6	47.90 ± 0.40	0.77 ± 0.17	0.89 ± 0.09
Sensor system-TB genomic DNA target	12	70.00 ± 0.13	0.93 ± 0.02	0.88 ± 0.04
Sensor system-TB genomic DNA target	20	92.90 ± 0.22	1.92 ± 0.11	0.85 ± 0.02
Sensor system-TB genomic DNA target	30	154.0 ± 0.34	1.44 ± 0.30	0.86 ± 0.02
Sensor system-TB genomic DNA target	40	168.0 ± 0.65	1.66 ± 0.80	0.85 ± 0.04
Sensor system-non complementary DNA target	-	15.30 ± 0.15	1.88 ± 0.44	0.84 ± 0.04

Sensor system = AMB-Fe₃O₄Nps-DNAprobe_{tuberculosis}