

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DESENVOLVIMENTO DE PROTÓTIPOS BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS PARA AVALIAÇÃO DE NÍVEIS GLICÊMICOS E
SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS**

ROBERTO MÁRCIO MOTA DE LIMA

RECIFE - 2011

Desenvolvimento de Protótipos Biossensores Eletroquímicos para Avaliação de Níveis Glicêmicos e Sequências Nucleotídicas

ROBERTO MÁRCIO MOTA DE LIMA

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: PROF^o DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

RECIFE - 2011

Lima, Roberto Márcio Mota de

Desenvolvimento de protótipos biossensores eletroquímicos para avaliação de níveis glicêmicos e sequências nucleotídicas/ Roberto Márcio Mota de Lima. – Recife: O Autor, 2011.

141 folhas : il., fig, tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. DNA 2. Glicose. 3. Biossensores I. Título.

572.8

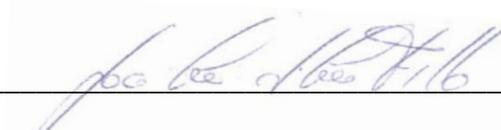
CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-172

Desenvolvimento de Protótipos Biossensores Eletroquímicos para Avaliação de Níveis Glicêmicos e Sequências Nucleotídicas

Roberto Márcio Mota de Lima

MEMBROS DA BANCA DE AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO



1º Membro: Profº Dr. José Luiz de Lima Filho



2º Membro: Profª Dra. Rosângela Ferreira Frade de Araújo



3º Membro: Profª Dra. Maria da Paz de Carvalho

1º Suplente: Profª Ana Lúcia Figueiredo Porto

2º Suplente: Profª Tatiana Souza Porto

À minha amada avó, Irene, que no decorrer da escrita desta dissertação acometeu-se de mal grave, mas que, mesmo ciente de tudo que passará, ainda consegue me entregar toda atenção e carinho, pelo mesmo tempo de sempre, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, e acima de tudo, a Deus, por ter me dado serenidade, sabedoria e confiança nos momentos que mais Lhe pedi.

A meus pais, Dulce e Roberto, por terem investido no meu futuro, desde sempre, acreditando nas minhas capacidades e ideais.

À minha namorada, Carolina, por sempre ter me incentivado, estando do meu lado nos momentos mais difíceis e ter compartilhado das minhas alegrias nos tempos de conquistas.

A meu irmão, Fábio, pelo grande apoio, credibilidade e sugestões.

A todos os meus familiares, que sempre me apoiaram em todos os meus projetos de vida.

Ao meu orientador, professor José Luiz de Lima Filho, pela oportunidade, confiança que me concedeu e pelos inúmeros ensinamentos e conselhos que sempre me prestou.

Aos amigos Rosângela Frade e Fernando Teles pelos inúmeros ensinamentos, apoio e paciência que me prestaram no início de meus estudos com Biossensores, e que sempre se mostraram de braços abertos para esclarecerem-me quaisquer dúvidas

À professora Maria do Carmo pelas inúmeras colaborações que prestou em meus trabalhos, e pela luz e alegria que sempre traz consigo.

Às professoras Danyelly Bruneka, Maria da Paz, Graça Paiva, Elizabeth Chaves, Ana Porto e Neide Shinohara pelo grande apoio.

Aos amigos Leonardo e Cinthya, por terem me honrado com a participação em seus trabalhos de dissertação.

Aos amigos de laboratório Roberto, Pabyton, Gustavo, Alessandro, Nathaly, Juliana, Kamila, Ariele, Bela, Danielly, Pedro, Elaine, Germana, Marcela, Danielle, Érica, Alice, Viviane e todos os outros, pela paciência, amizade e contribuição.

A todos os colegas da minha turma de Mestrado, pela confiança e companheirismo.

À amiga Amilka Karla por todas as palavras de incentivo.

Aos amigos Rafael Padilha e Sérgio Santos do laboratório de Microscopia Eletrônica, pela inegável colaboração e amizade sincera.

Aos funcionários do LIKA, Conceição, Ilma e Paulina, pelo profissionalismo e capacidade, a Seu Otaviano, por sempre me ajudar na criação de produtos

“homemade”, a Moisés, Oscar e Cláudio pela cordialidade e apoio, e a todos os demais pelos inúmeros serviços prestados.

Ao corpo de professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), pelas excelentes aulas ministradas.

Aos técnicos da Metrohm Brasil, Renato e Thiago, e da Sono Plot, Pete Johnson, pelo esclarecimento de dúvidas e pelo treinamento prestado.

Aos funcionários da secretaria do PPGCB, em especial a Adenilda, pela paciência e compromisso.

Ao pessoal do Centro de Informática, em especial ao Prof^o Manoel Eusébio e a Victor Wanderley pela constante colaboração.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro concedido.

A todos os demais, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1. Biossensores	19
2. Caracterização de um Biossensor	21
2.1 Atributos desejáveis	21
3. Classificação dos Biossensores	24
3.1. Transdutores	24
3.1.1. Transdutores Ópticos	25
3.1.2. Transdutores Piezoelétricos	26
3.1.3. Transdutores Eletroquímicos	27
4. A Eletroquímica e os Transdutores Eletroquímicos	27
4.1. Eletroquímica	27
4.1.1 A Célula Eletroquímica	28
4.2. Os Transdutores Eletroquímicos	30
4.2.1. Transdutores Eletroquímicos Condutimétricos	30
4.2.2. Transdutores Eletroquímicos Potenciométricos	31
4.2.3. Transdutores Eletroquímicos Amperométricos	33
4.3. Técnicas Voltamétricas	33
4.3.1. A Voltametria Cíclica	34
4.3.2. A Voltametria de Pulso	42
5. Métodos de Biorreconhecimento	49
5.1. Biossensores Baseados no Método Enzimático	50
5.2. Biossensores Imunológicos (Imunossensores)	51
5.3. Genossensores: os Biossensores de DNA	52
6. Técnicas de Fabricação de Eletrodos	54
6.1. Eletrodos em Pasta de Carbono	54
6.2. Eletrodos <i>Screen Printed</i>	55
6.3 Eletrodos em Filme	57
7. Métodos de Deposição de Biomoléculas e Polímeros	59

7.1. <i>Spin Coating</i>	59
7.2. <i>Dip Coating</i>	60
7.3. <i>Inkjet Printing</i>	61
8. Imobilização de Compostos Biológicos em Matriz Sólida	64
8.1. Quitosana	64
8.2. APTES (<i>Aminopropiltrimetoxisilano</i>)	65
9. Mediadores Eletroquímicos	65
9.1. TCNQ	66
9.2. Azul de Metileno	66
OBJETIVOS	68
ARTIGO CIENTÍFICO I	69
ARTIGO CIENTÍFICO II	85
CONCLUSÕES	112
PERSPECTIVAS	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
ANEXO	130

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho representativo da arquitetura de um biossensor	24
Figura 2	Desenho esquemático ilustrando a Lei fundamental da eletroquímica. Adaptado. ²¹	27
Figura 3	Célula eletroquímica composta de 3 eletrodos. Eletrodo de Referência (a), eletrodo auxiliar (b), eletrodo de trabalho (c).	29
Figura 4	Foto de um pHmetro digital. Fonte: http://www.microscopesblog.com/uploaded_images/pH_Meter-783982.jpg .	32
Figura 5	Glicosímetro, exemplo de biossensor baseado em um transdutor amperométrico. Fonte: http://www.wordsun.com/release.php?id=47	33
Figura 6	Potencial x Tempo aplicado em Voltametria Cíclica. Adaptado. ²⁰	36
Figura 7	Voltametria cíclica. Comportamento redox de um processo reversível ²⁰	37
Figura 8	Voltamograma cíclico típico, mostrando os principais aspectos de interesse. ²⁰	41
Figura 9	Excitação do sinal na Voltametria de Pulso normal. ⁴⁰	43
Figura 10	Em (a) Sinal de excitação na Voltametria de Pulso Diferencial Digital. Em 1, medição inicial; 2, medição final. ³⁰ Em (b), voltamograma de pulso diferencial. O valor máximo da função $f(E)$, corrente, que ocorre em E_p está diretamente relacionado à concentração do analito estudado. ³⁸	45
Figura 11	Polarogramas de Pulso diferencial (a) e DC (b) para sol. cloranfenicol $1,3 \times 10^{-5} M$. ¹⁴	47
Figura 12	Comparação entre polarogramas de pulso normal (a) e diferencial (b) para uma mistura de 1mg/L de cádmio e íons em eletrólito 0.1M HNO_3 . ²⁰	49
Figura 13	Eletrodos produzidos por screen printing com impressão em tiras de PVA (a). Em b, as trilhas condutoras impressas em prata para contato independente com os eletrodos de referência (Ag/AgCl) – não visualizado, e o de trabalho (Carbono), mostrado em c.	56
Figura 14	Lâminas de ITO retangulares em substrato de vidro. Fore Vision Instruments. ⁹⁶	57

Figura 15	Impressora a jato de tinta e substratos biológicos passíveis de impressão. Adaptado de http://www.epson.com .	61
ARTIGO I		
Figure 1	Epson Stylus Photo Printhead.	77
Figure 2	Scheme of inkjet printing. 1mg/mL Glucose Oxidase solution was printed on a carbon electrode surface, as shown.	78
Figure 3	(a) Scanning Electron Microscopy of an Epson R290 Inkjet Printer (270x). (b) Amplificação em região de (a) via software para melhor visualização.	79
Figure 4	Kinetics study of glucose oxidase (0.034mg/mL) under glucose solution (0.17mg mL ⁻¹).	80
Figure 5	Cyclic voltammetry of GOD inkjet printed on a carbon electrode surface under different glucose concentrations. Scan rate=50mVs ⁻¹	81
ARTIGO II		
Figure 1	Adsorption of DNA on the surface of carbon electrodes (more porous). In I, native dsDNA, II, single-stranded ssDNA and III, single-stranded DNA oligos. [Based on Ref. 17]	91
Figure 2	Scheme showing the apparatus with mini electrochemical cell (Sensor Holder). a) reference electrode, b) platinum auxiliary electrode, c) screw adjustment near the electrodes, d) mini electrochemical cell, e) working electrode (ITO-glass slide), f) screw, g) support base.	94
Figure 3	ITO-glass slides virtually divided into 8 individual parts. Each circular region will function as a working electrode to be used in the Sensor Holder.	95
Figure 4	Stages of ITO slides modification with NaOH (5M), APTES (0.2%) and immobilization with ssDNA probes	97
Figure 5	Cyclic voltammetry of ITO-glass electrode in a solution of 5 mM ferrocyanide in 0.5 M KCl involving transfer of an electron, for the test of the so-developed Sensor Holder system. Scan rate = 50mVs ⁻¹ . ITO vs. Ag / AgCl.	99
Figure 6	Analysis of peak current in a solution of 5 mM of ferrocyanide in 0.5 M KCl for 6 repetition with 3 cycles each. 50mV / s. ITO vs. Ag / AgCl.	100

Figure 7	Differential pulse voltammetry of APTES modified ITO electrode vs Ag / AgCl . TrisHCL 20mM buffer, pH 7.0, T = 22 ° C, Scan rate = 50mVs ⁻¹	101
Figure 8	Mechanism of the oxidation of guanine. ⁴	102
Figure 9	The differential pulse voltammetry of ITO electrode modified with APTES vs Ag / AgCl. a) no DNA, b) after adsorption with a sequence of 27 bases probe (1µM). TrisHCL 20mM buffer, pH 7.0, T = 22° C, Scan rate = 50mVs ⁻¹	103
Figure 10	Adsorption of single-stranded DNA oligos on carbon electrodes (more porous) (a) and on ITO-glass electrode surface (b).	104
Figure 11	Differential pulse voltammetry of ITO electrode under the conditions a) without DNA, b) with immobilized ssDNA, c) after hybridization with complementary sequence (dsDNA) in TrisHCL buffer 20mM, pH 7.0, T = 22 ° C , Scan rate = 50mVs-1	105
Figure 12	Baseline corection for the determination of Ipa in DNA-modified ITO electrode vs Ag / AgCl: a) without DNA, b) with ssDNA, Ipa = 0.73 µA, c) after hiobridization with complementary sequence (dsDNA) : Ipa = 0,19 µA. TrisHCL 20mM buffer, pH 7.0, T = 22 ° C, Scan rate = 50mVs ⁻¹	107

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag/AgCl – Prata/Cloreto de Prata

A – Ampère (unidade)

A – Área do eletrodo (medida)

AC – Corrente alternada

APTES - *3-Aminopropyltriethoxysilane*

BPV – *Bovine Papillomavirus*

C – Coulomb

cm - Centímetro

D – Coeficiente de difusão

DC – Corrente contínua

ddp – Diferença de Potencial

dsDNA – *Double stranded DNA*

e - Elétron

E – Potencial

ER – Eletrodo de referência

EA – Eletrodo Auxiliar

ET – Eletrodo de Trabalho

$E_{1/2}$ – Potencial de meia-onda

fe – Ferroceno

F – constante de Faraday, carga de um mol de elétrons

G – Guanina

GOD – Glicose Oxidase

HPV – Human Papillomavirus

i – Corrente Elétrica

i_a – Corrente anódica

i_c – Corrente catódica

ITO – Indium Tin Oxide (Óxido de índio-Estanho)

mg/dL – Miligrama por decilitro

mM – Milimolar

mVs^{-1} – Milivolt por segundo

mm – Milímetro

n – Número de estequiométrico de elétrons envolvidos em uma reação

NP – Pulso Normal

Ox – Oxidado

PEDOT – Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)

PEDOT-PSS - (Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) poly(styrenesulfonate)

PET - Polyethylene terephthalate

PVA – Álcool Polivinílico

R - Constante dos gases

Red – Reduzido

SCE – Saturated Calomel Electrode

SEM – *Scanning Electron Microscopy*

ssDNA – single stranded DNA

T - Temperatura

TCNQ – Tetracianoquinodimetano

V – Volts

v – Velocidade de varredura de potencial elétrico

$W_{1/2}$ - Largura de pico de corrente na metade do valor da altura

μA – Microampère

μg – Micrograma

μm - Micrômetro

δ – Espessura da camada de difusão

Ω – Ohms

σ - NFv/RT

RESUMO

Entre outras técnicas, os métodos eletroquímicos têm emergido como sendo atrativos devido à sua simplicidade, baixo custo, possibilidade de medição em tempo real e, geralmente, apresentarem alta sensibilidade. Neste estudo, foi desenvolvido um protótipo de um biossensor amperométrico de glicose, parcialmente baseado na tecnologia de impressão jato de tinta (Inkjet). Dois eletrodos foram confeccionados pelo método *screenprinting* em uma fita de PVA (Polivinil Álcool). Em um deles, uma solução de glicose oxidase foi depositada por impressora a jato de tinta, modificada para os experimentos. O eletrodo de referência foi constituído de Ag /AgCl. Antes do processo de impressão, foi realizada uma verificação dos sistema impressor por Microscopia Eletrônica de Varredura, para avaliação dos poros de impressão. A Voltametria cíclica apresentou resposta linear entre concentração de glicose e os picos de corrente anódica em um mesmo intervalo de potencial, indicando a viabilidade do método. Neste trabalho também foi desenvolvido um genosensor para a detecção de sequências específicas de DNA transduzidas por Voltametria de Pulso Diferencial. Os eletrodos foram feitos pela imobilização de sequências de DNA em um eletrodo de ITO (*Indium Tin Oxide*) modificado com NaOH e APTES. Os resultados demonstraram um aumento do valor de corrente anódica (0,73 μA) quando a sequência de DNA estava presente no eletrodo, diferindo da corrente encontrada nos eletrodos sem a sequência imobilizada. Os resultados também mostraram que após a hibridização do DNA imobilizado com uma sequência complementar de uma região específica do vírus BPV contendo 27 bases, a corrente anódica diminuiu, indicando que o processo de hibridização ocorreu na superfície do eletrodo. A sequência utilizada para a hibridização foi uma região específica do vírus BPV, contendo 27 bases. Os

achados indicam que o eletrodo de ITO poderia ser um instrumento viável e de fácil manipulação para construção de biossensores de DNA.

Palavras-chave: DNA, Glicose, Biossensor, Inkjet, ITO, BPV.

ABSTRACT

Among other techniques electrochemical methods have been recently emerged as attractive due to their simplicity, low cost, possibility for real time measurements and generally high sensitivity. In this study, a prototype of an amperometric glucose biosensor, partly based on inkjet printing technology, was realized. Two electrodes were made by screen printing on a Poly Vinyl Alcohol slide. On one of them, a solution of Glucose Oxidase was deposited by a modified InkJet printer. The reference electrode was an Ag/AgCl one. Before the printing process take place, a Scan Electron Microscopy of the print-head was made, to evaluate the general characteristics of the printing pores. Cyclic voltammetry showed a linear response of glucose concentration and current peaks in a same potential range, indicating the feasibility of the method. Also, in this work, a genosensor was developed for detection of specific DNA sequences transduced by Differential Pulse Voltammetry. The electrodes were made by the immobilization of DNA sequences on a NaOH- APTES modified ITO electrode. The results demonstrated an increase in the anodic current value ($0,73\mu\text{A}$) when the DNA sequence was present on the electrode, differing from the bare electrode found current. The results also showed that, after the hybridization of the so-immobilized DNA with a complementary sequence of an specific region from BPV, containing 27 bases, the anodic current decreased, indicating that the hybridization process occurred at the electrode surface. The reported findings indicate that ITO electrode could be a viable instrument of easy manipulation for the construction of DNA biosensors.

Keywords: DNA, Glucose, Biosensor, Inkjet, ITO, BPV.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1. Biossensores

Os biossensores são aparelhos analíticos compactos que incorporam elementos sensores, biológicos ou biomiméticos, a um sistema transdutor, que interpreta um sinal biológico, como os gerados em interação enzima substrato, amplificam-no, e fazem o processamento para a determinação qualitativa e/ou quantitativa da variável desejada.¹ Considerando o reconhecimento seletivo de biomoléculas, um biossensor pode ser definido como qualquer aparelho de medida que incorpore uma espécie biológica como parte essencial do processo de reconhecimento.¹ Os biossensores representam uma nova tendência que emerge em termos de efeitos tecnológicos e teóricos para o desenvolvimento e exploração de aparelhos analíticos para detecção e quantificação e monitoramento de espécies químicas específicas para análise industrial ambiental e clínica². Nesses aparelhos a detecção de uma espécie de interesse é adquirida por meio de um elemento biológico imobilizado, traduzida e amplificada através de um transdutor eletrônico tradicional.³ Os biossensores apresentam um largo leque de aplicações, como na área médica, no monitoramento de condições crônicas de pacientes, a exemplo no controle de níveis glicêmicos no Diabetes mellitus, na área ambiental, em controle de qualidade do ar e da água, em monitoramento de substâncias como fenóis, pesticidas e metais pesados, na área militar, no combate ao bioterrorismo com detecção de toxinas, gases tóxicos e patógenos, na área industrial alimentícia para a análise de composição de alimentos, teor de contaminação microbiana, concentração de nutrientes e corantes, e na indústria de fermentações, na

monitoração e controle contínuo da composição de biomassa, substrato, produtos e subprodutos presentes no meio.⁴

A definição de que um biossensor é um dispositivo analítico compacto que incorpora um elemento sensor biológico, ou biologicamente derivado, associado a um transdutor físico-químico, produzindo um sinal eletrônico proporcional a determinado analito, ou a um grupo dos mesmos, como já descrito neste artigo, permite-nos identificar claramente o Professor Leland C. Clark, Jr. como o pai do conceito de biossensor.¹ Em 1956, Clark publicou seu artigo definitivo sobre seu eletrodo de oxigênio. Com base nesta experiência, e endereçando seu desejo de ampliar o leque de analitos corporais que podem ser medidos, ele fez um discurso histórico em 1962, em um simpósio da *Academy of Sciences* em Nova Iorque. No mesmo, ele descreveu, “como construir sensores eletroquímicos (pH, polarográficos, potenciométricos, ou condutométricos) mais inteligentes”, pela adição de transdutores enzimáticos em arranjo “sanduíche”. O conceito foi ilustrado por um experimento no qual a enzima glicose oxidase (GOx) foi aprisionada em um eletrodo de oxigênio de Clark utilizando uma membrana de diálise. A diminuição da concentração de oxigênio medida foi proporcional à concentração de glicose. No artigo publicado,⁵ Clark e Lyons cunharam o termo “eletrodo enzimático”, que muitos críticos erroneamente atribuíram a Updike e Hicks, que expandiram o detalhe experimental necessário para construção de eletrodos enzimáticos funcionais para glicose.⁶

O sensor, essencialmente inventado por Clark, foi a base de inúmeras variações sobre o projeto básico, e muitas outras enzimas (oxidases) foram imobilizadas como resultado em trabalhos de vários autores.⁷

Dentre as principais vantagens no uso de um biossensor estão a possibilidade de miniaturização, alta tecnologia empregada, portabilidade, baixo custo e fácil manuseio.⁸

2. Caracterização de um Biossensor

Para ser categorizado como um biossensor, o dispositivo em questão deve conter: um biorreceptor (substância imobilizada, com a qual o analito em questão irá ligar-se), transdutor (o sistema que converterá o sinal gerado da ligação do analito ao sistema de biorreconhecimento em um sinal mensurável), amplificador (dispositivo que, assim como o próprio nome já diz, amplificará o sinal emitido pelo transdutor), além de um sistema de apresentação (que exibirá a leitura de dados de forma clara, de fácil interpretação ao utilizador). De acordo com o método de identificação da biomolécula, o biossensor pode receber distintas classificações de acordo com o tipo de biorreconhecedor imobilizado na superfície do mesmo.¹ Um dos exemplos mais conhecidos e bem sucedidos de biossensor, utilizado principalmente por pacientes diabéticos, é o de verificação da concentração de glicose, disponível comercialmente.⁹

2.1. Atributos Desejáveis

Uma vez que carregam uma gama de peculiaridades características, dependentes do analito a ser estudado, a minimização das variáveis é essencial para o desenvolvimento de um biossensor. Entretanto, não se podem definir quantitativamente as características ideais de um biossensor perfeito, visto que a

variabilidade dos mesmos é muito grande, e um parâmetro que pode ser importantíssimo para um dado biossensor pode não o ser para um outro.¹ No entanto algumas características são tidas como cruciais para o bom funcionamento de qualquer biossensor a ser desenvolvido. Abaixo estão listadas as principais:

Especificidade:⁷ O biossensor deve ser seletivo, específico, capaz de diferenciar tipos de analitos diferentes dentro de uma mesma solução.

Sensibilidade:¹ A sensibilidade do biossensor é de suma importância para determinar em que faixas de concentração de analito o mesmo será utilizado e quão preciso o mesmo é para discriminar valores os mais próximos possíveis entre si.

Estabilidade:¹⁰ O biossensor, ao que o mesmo se propõe, deve manter seu perfeito funcionamento sob as variações possíveis do ensaio e que possam alterar os valores de leitura, como pH, temperatura, umidade, luminosidade, etc... dentro de seus parâmetros de uso.

Reprodutibilidade:¹⁰ Um biossensor deve ser capaz de, sob as mesmas condições físico-químicas, reproduzir os mesmos valores dentro da faixa de confiabilidade em testes com um analito no mesmo meio e em mesma concentração.

Capacidade de reutilização: Para fins de pesquisa, é uma característica que deve ser levada em consideração em alguns casos. Para fins comerciais, não é um atributo desejável.⁷

Rápido tempo de resposta:^{1, 10} Quanto mais rápido o tempo de resposta, menos suscetível a variações de ambiente e contaminação será o biossensor, além de o resultado ser expresso rapidamente, com economia de tempo.

Possibilidade de miniaturização e portabilidade:¹⁰ Por terem como principal característica o fato de incorporarem sistemas de reconhecimento e interpretação em um único aparato, a ideia de miniaturização chega a ser um objetivo no desenvolvimento de biossensores para fins comerciais.

Baixo custo:¹⁰ Um dos principais entraves para o desenvolvimento de qualquer método analítico é o custo do mesmo. Os biossensores são pensados para substituírem métodos de análise caros e dispendiosos, por fazerem uso de pequenas quantidades de material biológico e serem passíveis de produção em larga escala e em série.

Em um biossensor, a camada de reconhecimento biológico deve estar intimamente associada a um transdutor físico, para que seja detectado o sinal de interação entre o analito desejado, contido na amostra biológica, e o bioelemento presente na superfície de detecção. Uma vez ocorrida a interação, o sinal deve ser amplificado de forma a ser facilmente detectado e amplificado por um transdutor.⁷

Para o desenvolvimento de um biossensor alguns fatores devem ser levados em consideração, como a seleção do bioelemento adequado ao analito a ser detectado, a escolha de um método de imobilização, a adequação de um transdutor, e considerações como a faixa de medição, linearidade e minimização de interferência, além da caracterização física do biossensor.¹⁰

3. Classificação dos Biossensores

Os biossensores podem ser classificados basicamente de acordo com o método de transdução e o biorreceptor utilizados (Fig. 1).

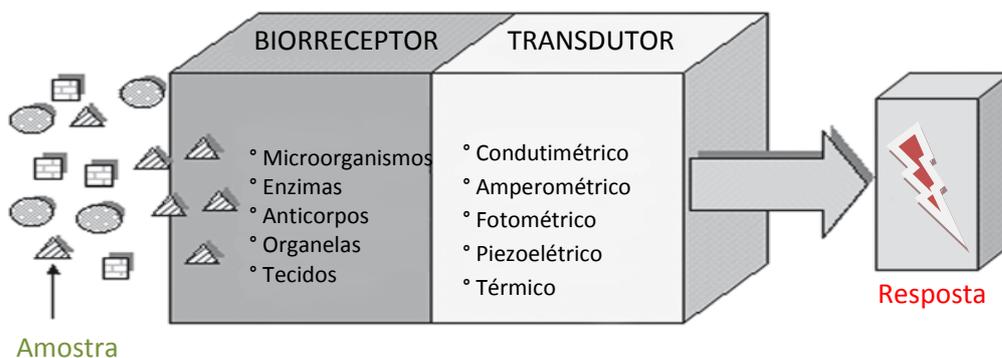


Figura 1: Desenho representativo da arquitetura de um biossensor.

A seguir serão listadas algumas das principais técnicas de transdução e biorreconhecimento utilizadas no desenvolvimento de sensores biológicos.

3.1. Transdutores

Transdutores são sistemas responsáveis por converterem sinais biológicos gerados por interações físico-químicas na superfície de um sensor, em um sinal, geralmente elétrico, com alta sensibilidade e o mínimo ruído, mensurável e passível de interpretação. Diferentes tipos de transdutores agem sob o calor, luz, eletricidade, som, radiação, vibrações, magnetismo, pressão, etc, e muitos desses já foram aplicados em biossensores.¹¹

3.1.1 Transdutores Ópticos

No processo de transdução óptica, a transmissão do sinal gerado no processo de biorreconhecimento ocorre principalmente por meio de transmissão de luz (ou mudança no estado de refração na transmissão da mesma), fluorescência, elipsometria ou ressonância. Tais alterações são então captadas pelo transdutor óptico e convertidas em um sinal elétrico, que será traduzido para um dado mensurável. O número de moléculas receptoras que pode se ligar à superfície planar é relativamente baixo. Por exemplo, para uma proteína de tamanho médio como a estreptavidina (~72000 Da), a cobertura da superfície quantitativa corresponde a cerca de 1010 moléculas/mm². A detecção direta (aquela que não requer preparação da amostra lavagem ou várias técnicas de amplificação) é baseada na diferença do índice de refração (n) entre a água ($n_{600\text{ nm}} \sim 1.333$) e moléculas ($n_{600\text{ nm}} \sim 1.5$) o que resulta em uma mudança no índice de refração na superfície do transdutor quando uma molécula biológica de um diâmetro aproximado a 4nm se liga.¹² Pesquisas envolvendo sensores baseados na tecnologia de ressonância de plasmons de superfície (RPS) têm apresentado um avanço significativo. RPS refere-se é uma técnica óptica sensível de superfície que pode ser usada para estudar camadas (orgânicas) ultrafinas em filmes de metais nobres. A técnica se baseia na análise da mudança no índice de refração devido, por exemplo, a ligação de uma camada orgânica sobre a superfície do metal.¹³ Essa camada é depositada sobre um dos planos de um prisma. Quando uma luz polarizada passa através de um dos outros planos do prisma, induz os elétrons a um estado ressonante, o que resulta na absorção de energia luminosa.¹⁴

3.1.2. Transdutores Piezoelétricos

A interação de anticorpos com os antígenos correspondentes é um motivo atraente para tentar desenvolver biossensores químicos baseados na ligação antígeno-anticorpo, ou seja, imunossensores. Teoricamente, se um anticorpo pode ser lançado na corrente sanguínea contra um antígeno, um imunossensor pode ser desenvolvido para reconhecê-lo. Apesar da elevada especificidade e afinidade dos anticorpos para moléculas ligantes complementares, a maioria das interações antígeno-anticorpo não causam uma mudança eletronicamente mensurável.¹⁵ No entanto, a seletividade notável de anticorpos tem alimentado muitas pesquisas para superar este problema intrínseco. O efeito piezoelétrico em várias substâncias cristalinas é uma propriedade útil que leva à detecção dos analitos, e é dependente, dentre outros fatores, do material de que é composto o cristal, além de sua espessura e área de contato.¹⁶ O imunossensor piezoelétrico é pensado para ser um dos instrumentos analíticos mais sensíveis desenvolvidos até hoje, sendo capaz de detectar antígenos na faixa de picogramas, além disso, este tipo de dispositivo é acreditado para ter o potencial para detecção de antígenos na fase gasosa, bem como na fase líquida.¹⁷

A frequência de oscilação do cristal piezoelétrico muda linearmente com a mudança da massa sobre o mesmo. No caso de um imunossensor, por exemplo, ao se imobilizar um antígeno/anticorpo sobre o mesmo, a ligação entre o seu componente biológico específico (antígeno, no caso de um anticorpo, e anticorpo, no caso de um antígeno) levaria a uma alteração de massa sobre o cristal, mudando (em grande parte dos casos, diminuindo) a frequência de ressonância do mesmo.¹⁶

3.1.3. Transdutores Eletroquímicos

Os biossensores baseados em sistemas eletroquímicos são os de maior aplicabilidade,⁷ e serão tratados de forma mais detalhada a seguir.

4. A Eletroquímica e os Transdutores Eletroquímicos

4.1. Eletroquímica

Os biossensores eletroquímicos oferecem grandes vantagens por sua alta sensibilidade, baixo custo e compatibilidade com a tecnologia de microfabricação.^{18, 19}

A transferência de elétrons entre duas fases é o ato fundamental da eletroquímica (Fig. 2) e representa muito na natureza. Até bem depois de meados do século XX, não havia conhecimento da amplitude de transferência de carga interfacial. Pensava-se apenas que era algo relacionado unicamente aos metais. Agora, entretanto, já se sabe que a eletroquímica envolve semicondutores e isolantes, também no fato de que esses organismos estão em contato com íons contendo líquidos. Por exemplo, proteínas estão sujeitas a transferências de carga quando estão em contato com glicose em solução, por exemplo.²⁰

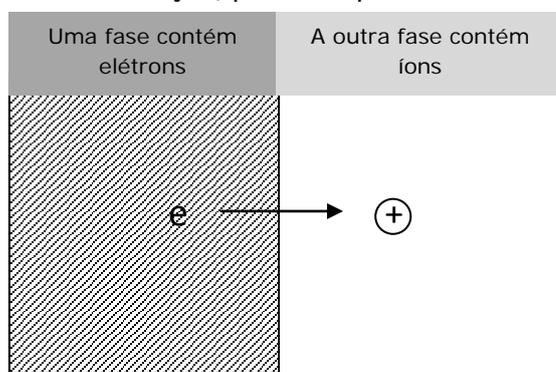


Figura 2. Desenho esquemático ilustrando a Lei fundamental da eletroquímica. Adaptado.²¹

As leis fundamentais da eletroquímica estão presentes na natureza, e este é o motivo pelo qual interações eletródicas são uma parte tão importante da ciência. É um campo vasto e fundamental a todos esses fenômenos em química, biologia e engenharia que envolvem ambientes reais de teor úmido ou líquido.²¹

Em contraste com muitas medições químicas, que envolvem soluções homogêneas, processos eletroquímicos ocorrem na interface eletrodo-solução. A distinção entre as várias técnicas eletroanalíticas reflete o tipo de sinal elétrico utilizado para a quantificação. Os dois principais tipos de medidas eletroanalíticas são a potenciométrica (análise de variações de potencial) e a amperométrica (análise de variações de corrente), e ambas exigem pelo menos dois eletrodos (condutores) e uma solução de contato (eletrólito), constituindo assim a célula eletroquímica.²⁰ A superfície do eletrodo é, assim, uma junção entre um condutor iônico e um condutor eletrônico.

4.1.1. A Célula Eletroquímica

Uma célula eletroquímica (Fig. 3) pode ser definida como um aparato composto de 2 ou mais eletrodos e que dá condições favoráveis para que uma reação eletroquímica possa ocorrer e ser medida.²²

Uma célula eletroquímica padrão é composta de 3 eletrodos:

Eletrodo de Referência (*reference electrode* - representado por R). Este tem um potencial constante (isto é, independente das propriedades da solução). É sobre este potencial que será caracterizado o potencial do eletrodo de trabalho. Os mais comuns são os de Calomelano e Prata/Cloreto de Prata.^{16,20,22}

Eletrodo Auxiliar, contra-eletrodo (*auxiliary* ou *counter electrode* – representado por A ou C). O eletrodo auxiliar evita que correntes geradas em uma reação eletroquímica, sob aplicação de potencial a um eletrodo de trabalho, interfiram no de referência, alterando seu potencial.^{16,20,22}

Eletrodo de Trabalho ou, do Inglês, *working electrode*, o que o faz muitas vezes ser representado pela letra W. Este é o eletrodo que responde ao analito alvo, e é assim denominado o eletrodo de trabalho (ou eletrodo indicador). É sobre este que todo o tratamento bio-físico-químico será atribuído. No eletrodo de trabalho, enzimas, sequências nucleotídicas, anticorpos, tecidos, e todas as biomoléculas passíveis de utilização nos estudos com biossensores podem ser imobilizadas para reagirem com o analito desejado em uma solução.^{16,20,22}

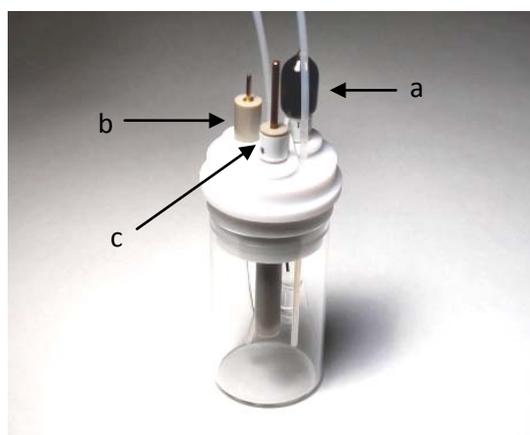


Figura 3: Célula eletroquímica composta de 3 eletrodos. Eletrodo de Referência (a), eletrodo auxiliar (b), eletrodo de trabalho (c). Fonte: Fonte: <http://www.microbialfullcell.org/MFC/images/Designs/>

Uma grande variedade de materiais utilizados para a confecção de eletrodos têm sido exploradas, incluindo ouro, compostos semicondutores, polímeros eletronicamente condutores, prata, soluções de óxidos, como o ITO (Óxido de Estanho e Índio),²³ platina e grafite. A escolha do tipo de material do qual será constituído o

eletrodo utilizado leva em consideração diversos fatores, como sua resistência ao desgaste, condutância elétrica, ter baixo peso específico, boa estabilidade dimensional, elevada condutibilidade térmica, além da interferência no potencial padrão final do eletrodo, dentre outros.^{20,21} As células eletroquímicas podem ser classificadas como eletrolíticas (quando as mesmas consomem electricidade a partir de uma fonte externa) ou galvânica (se elas são usados para produzir energia elétrica).²⁰

4.2. Os Transdutores Eletroquímicos

4.2.1. Transdutores Eletroquímicos Condutimétricos

Um biossensor condutimétrico mede condutância/resistencia elétrica assim como a sua mudança de sinal.²⁴ Existe um interesse considerável na utilização de polímeros condutores (polianilina, poliacetileno, polipirrol e politiofeno) para o desenvolvimento de biossensores condutométricos.^{25,26} Os polímeros condutores são transdutores em biossensores condutométricos, e Polianilina (Pani) tem sido um dos mais extensivamente utilizados, devido às suas fortes interações bio-moleculares,²⁷ à excelente estabilidade do ambiente e boa condutividade.²⁸ Em um biossensor condutométrico, moléculas de Pani podem ser colocadas próximas ou integradas ao elemento biológico (anticorpo).²⁴ Assim as moléculas de Pani transmitem qualquer ligação antígeno-anticorpo como uma quantidade de medida elétrica. Com a necessidade crescente de testes de detecção rápida nos últimos tempos, os biossensores condutométricos têm sido usados em diversas aplicações biológicas e biomédicas, e essas incluem a determinação de glicose e uréia no sangue,²⁹ íons de

metais pesados e pesticidas na água,³⁰ e detecção de *E. coli*,³¹ *Bacillus cereus*,³² e vírus da Diarréia Viral Bovina.³³

A condutância específica de uma solução de um eletrólito depende dos íons presentes, variando a sua concentração de acordo com reações químicas ou bioquímicas, onde há consumo ou liberação de íons.³⁴ Pelo fato de o princípio da condutimetria basear-se na condutividade elétrica de um meio eletrolítico,²¹ essa condutividade pode, em muitos casos, não ser específica de um analito, fazendo com que a mesma não seja indicada para leituras qualitativas, mas apenas quantitativas, sendo indicada para se avaliar a condutividade total de uma solução.¹⁴

4.2.2. Transdutores Eletroquímicos Potenciométricos

A Potenciometria, que é de grande importância prática, é uma técnica estática (corrente-zero), em que as informações sobre a composição do analito são obtidas a partir de medição do potencial criado através de uma membrana.²⁰ Diferentes tipos de materiais de membrana, que processam diferentes métodos de reconhecimento iônico, foram desenvolvidos para proporcionar alta seletividade ao sistema.²¹ Os transdutores potenciométricos são também chamados de eletrodos íons seletivos.¹⁴ Estes eletrodos detectam a atividade de íons na amostra e são de simples preparação e moderada seletividade, sendo o potencial elétrico de uma célula eletroquímica medido a partir dos mesmos.¹⁴ As pontas de provas potenciométricas resultantes, têm sido amplamente utilizadas por várias décadas para o monitoramento direto de espécies iônicas como os prótons ou cálcio, flúor, potássio e íons em amostras complexas.²⁰ Um dos exemplos mais conhecidos de sensores potenciométricos é o pHmetro (Fig. 4)



Figura 4. Foto de um pHmetro digital. Fonte: http://www.microscopesblog.com/uploaded_images/pH_Meter-783982.jpg.

Quando ligados a sistemas enzimáticos apropriados, os Eletrodos Íon Seletivos (do Inglês, *Ion Selective Electrodes - ISE*), agem como transdutores em biossensores potenciométricos. Em 1977, Guilbault *et al* construíram um biossensor para o nitrogênio da uréia sanguínea. O mesmo foi construído como ISE em cloreto de polivinil para detecção de NH_4^+ usando o ionóforo nonactina.³⁵ O conhecido eletrodo de pH, aplicado nos pHmetros, foi o primeiro eletrodo íon seletivo utilizado em química analítica. O princípio do mesmo se baseia no fato de que quando uma membrana de vidro é imersa em uma solução contendo íons H^+ , inicia-se um mecanismo de troca iônica com grupos SiO^- , negativamente carregados, fixados na membrana do vidro.¹⁴ A leitura do aparelho é feita em função de leituras de potencial (Sensor potenciométrico) que o eletrodo gera quando submerso na amostra. Os potenciais lidos são convertidos para uma escala de pH (no caso do pHmetro). O aparelho faz essa conversão e tendo como uma escala usual de 0 a 14, apresenta o resultado como grandeza de pH.³⁶

4.2.3. Transdutores Eletroquímicos Amperométricos

Os transdutores amperométricos utilizam-se da medição de corrente elétrica gerada, que ocorre sob uma reação redox, numa diferença de potencial aplicada.^{7,20} A técnica amperométrica leva vantagem pelo fato de que certas espécies químicas eletroativas são oxidadas ou reduzidas (reações redox) em eletrodos condutores conduzidos em um potencial constante aplicado²¹ e é, sem dúvida, a mais utilizada em biossensores com caráter comercial⁹ (Figura 5).



Figura 5: Glicosímetro, exemplo de biossensor baseado em um transdutor amperométrico. Fonte: <http://www.wordsun.com/release.php?id=47>

4.3. Técnicas Voltamétricas

Os principais métodos amperométricos aplicados em biossensores são a Cronoamperometria e Cronopotenciometria, a Voltametria Cíclica e a Voltametria de Pulso diferencial. Neste trabalho dar-se-á mais ênfase à Voltametria Cíclica e à Voltametria de Pulso Diferencial, mesmo assim, os conceitos das duas primeiras serão apresentados.

A **Cronoamperometria** é a medida da corrente sob uma variação de tempo em um potencial fixo aplicado.²⁰ O processo de Cronoamperometria envolve variar-se o potencial do eletrodo de trabalho em passos a partir de um valor no qual nenhuma reação faradáica ocorre a um potencial no qual a concentração da espécie eletroativa na superfície do eletrodo é igual a zero. Um eletrodo de trabalho fixo e uma solução sem agitação são usados neste caso.^{21,22} A dependência corrente-tempo é então monitorada. Como o transporte de massa nessas condições é unicamente feito por difusão, a curva tempo-corrente reflete a mudança no gradiente de concentração nas proximidades da superfície do eletrodo de trabalho. Isso envolve uma expansão gradual da camada de difusão associado com o esgotamento do reagente, e inclinação, portanto, diminuição da concentração em decorrência do tempo.²⁰

A **cronopotenciometria** é bastante similar, diferindo apenas no fato de que neste caso o potencial é que é medido a partir de um passo de corrente.²¹

4.3.1 A Voltametria Cíclica

Voltametria é uma técnica eletroquímica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida, em função de um potencial, entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar.³⁷ Assim, informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial neste comparado ao de referência. O parâmetro ajustado é o

potencial e o parâmetro medido é a corrente resultante. O registro da corrente em função do potencial é o voltamograma.³⁷

Na voltametria cíclica, o eletrodo de trabalho recebe um potencial que varia entre dois potenciais pré-estabelecidos. Um potencial inicial (E_i) e um final (E_f). Essa variação ocorre sob passos de potencial e a determinada velocidade (Vs^{-1}).²¹ A corrente é então medida em função do potencial. Sabe-se que cada espécie química tem um potencial específico em que a mesma se oxida ou reduz. Ao ponto em que o potencial varrido se aproxima do potencial de redução/oxidação da espécie em questão, a transferência de elétrons gerada pela reação redox produzirá um pico de corrente que será medido pelo potenciostato (equipamento utilizado para análises eletroquímicas).³⁶

A Voltametria cíclica é a técnica mais utilizada para a aquisição qualitativa de informações sobre reações eletroquímicas.²¹ O poder da voltametria cíclica está na sua capacidade de fornecer rapidamente as informações importantes sobre a termodinâmica dos processos redox, a cinética das reações heterogêneas de transferência eletrônica e sobre as reações de acoplamento ou processos de adsorção.^{21,37} A Voltametria Cíclica é muitas vezes a primeira experiência realizada em um estudo eletroanalítico. Em particular, oferece uma localização rápida de potenciais redox das espécies eletroativas e avaliação prática dos efeitos do meio sobre o processo redox.²⁰ Este método consiste em escanear linearmente o potencial de um eletrodo de trabalho estacionário (em uma solução não agitada), utilizando variação na forma de onda triangular (Fig. 6). Dependendo das informações desejadas, ciclos simples ou múltiplos podem ser utilizados. Durante a varredura do potencial, o

potenciostato mede a corrente resultante do potencial aplicado. O gráfico resultante (corrente vs potencial) é chamado de voltamograma cíclico. O voltamograma cíclico depende de um grande número de parâmetros físicos e químicos, o que torna sua interpretação um pouco complexa em certos casos.²⁰

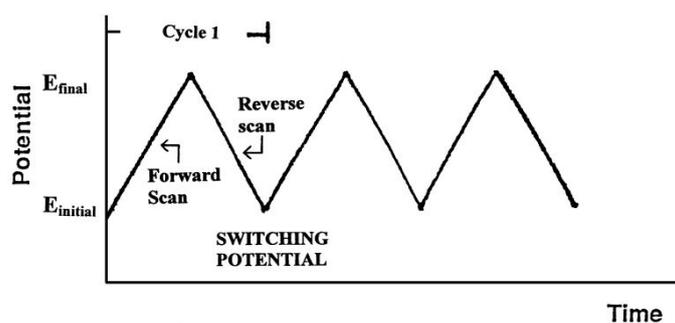


Figura 6. Potencial x Tempo aplicado em Voltametria Cíclica. Adaptado.²⁰

A Figura 7 ilustra a resposta esperada de um par redox reversível durante um único ciclo de potencial aplicado em voltametria cíclica.²⁰ Supõe-se que apenas a forma oxidada (O) está presente inicialmente.^{20,21,37} Assim uma varredura de potencial em sentido negativo para a primeira metade do ciclo é escolhida, iniciando-se em um valor onde não ocorre redução. À medida que o potencial aplicado se aproxima das características de E^0 (Potencial padrão) do processo redox do analito desejado, uma corrente catódica começa a aparecer em sentido crescente, até que um pico de corrente é alcançado. Depois de atravessar a região de potencial em que o processo de redução ocorre (pelo menos $90n^{-1}mV$ além do potencial de pico – essa distância pode ser configurada por meio do software do potenciostato), a direção da varredura de potencial é invertida.²⁰

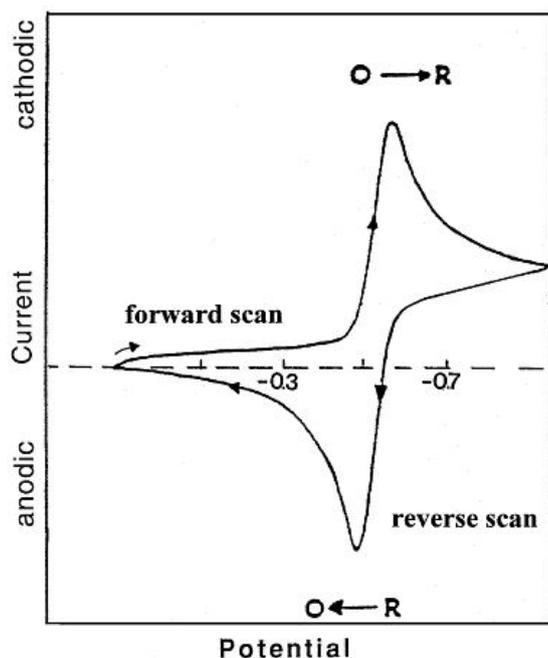


Figura 7.: Voltametria cíclica. Comportamento redox de um processo reverssível.²⁰

Durante o escaneamento reverso, moléculas reduzidas, R (geradas no meio-ciclo inicial e que se acumularam próximas à superfície do eletrodo), são reoxidadas (passam para a forma O), resultando em um pico anódico.^{21,22,37}

A Voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica muito versátil, que permite sondar a mecânica de propriedades redox e de transporte de um sistema em uma solução em repouso.³⁷ Isso é conseguido com um arranjo de três eletrodos em que o potencial relativo ao potencial do eletrodo de referência (ER) é digitalizado em um eletrodo de trabalho (ET), enquanto a corrente resultante flui através de um eletrodo auxiliar (EA) e é monitorada.²¹ A técnica aplicada é ideal para uma pesquisa rápida de pares redox presentes em uma amostra, assim como à estabilidade dos sistema de 3 eletrodos.²⁰

O controle eletrônico que o potenciostato realiza foi projetado de modo que a potencial entre os eletrodos de trabalho e referência possa ser ajustado. Mas a grande impedância entre os mesmos força que a corrente resultante flua através do eletrodo auxiliar. Normalmente, o potencial é escaneado de forma direta e reversa, de forma linear com variação de tempo e entre dois valores de potencial extremos, e, nesses potenciais extremos é onde ocorre a mudança da varredura. Quando o potencial do eletrodo de trabalho é mais positivo do que o potencial de determinado composto redox presente na solução, a espécie correspondente pode ser oxidada, produzindo uma corrente anódica. Da mesma forma, no retorno da varredura, como o potencial do eletrodo de trabalho se torna mais negativo do que o potencial de redução da espécie redox, ocorre um processo de redução com aparecimento de corrente catódica. Para fins gerais, e assim convencionou-se, as correntes anódicas são correntes negativas e as catódicas positivas.²⁰

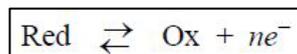
A magnitude da corrente faradáica (gerada por reações que envolvem transferência de carga) observada pode fornecer informações sobre a taxa global dos muitos processos que ocorrem na superfície do eletrodo de trabalho.^{20,21} Como ocorre em qualquer processo que envolve várias etapas, a taxa global é determinada pelo processo mais lento dentre todos. Para uma reação redox induzida na superfície de um eletrodo de trabalho, o passo determinante da velocidade pode ser qualquer uma das seguintes etapas individuais, dependendo do sistema: taxa de transporte de massa das espécies eletro-ativas, a taxa de adsorção ou de desadsorção na superfície do eletrodo, taxa de transferência de elétrons entre as espécies electro-ativas e o eletrodo, ou taxas de reações químicas específicas que

fazem parte do esquema de reação global^{20,21} (como exemplo, no caso de biossensores multienzimáticos).²⁰

A famosa Equação de Nernst mostra a relação entre o potencial e as concentrações da forma oxidada e reduzida do par redox quando em equilíbrio, para uma reação de oxidação envolvendo n elétrons e à temperatura de 298K.²⁰

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln Q$$

Equação 1



Onde: $R = 8,315 \text{ J/K mol}^{-1}$

$T = 298,2\text{K}$

$F = 96485\text{C mol}^{-1}$

Substituindo-se os valores de R, T e F, tem-se:

$$E = E^0 - \frac{0,0257}{n} \ln Q$$

Ou

$$E = E^0 - \frac{0,0592}{n} \log Q$$

Onde Q é o quociente entre as concentrações na forma reduzida e oxidada da espécie em questão, ficando:

$$E = E^{0'} + \frac{0.059}{n} \log_{10} \frac{[\text{Ox}]_{d=0}}{[\text{Red}]_{d=0}}$$

E é o potencial aplicado e E^0 o potencial padrão; o “ $d = 0$ ” é utilizado para enfatizar que $[\text{Ox}]$ e $[\text{Red}]$ representam as concentrações na interface da dupla camada eletrodo/solução, e não a concentração no meio da solução. É importante ressaltar que a equação de Nernst pode ou não ser obedecida, isso vai depender do sistema e das condições experimentais.^{21,22,36,38}

Em um voltamograma cíclico típico (Fig. 8), a varredura pode ser iniciada em um potencial ligeiramente negativo, E_i (essa escolha é arbitrária e depende, dentre outros fatores, do tipo de eletrodo utilizado e quantidade de espécies eletroativas na solução)³⁶ até um valor de mudança de sentido, E_f , onde, a partir deste, o potencial retornará ao valor inicial E_i .¹⁴ O primeiro pico de corrente observado (com valor i_{pa}) ocorre no potencial denominado E_{pa} , indicando que uma oxidação está acontecendo. Então os valores de corrente registrados vão diminuindo devido ao esgotamento das espécies redutoras na camada de difusão. No retorno, o processo de varredura ocorre de forma inversa e uma corrente de pico catódico (i_{pc}) é observada no potencial de pico catódico (E_{pc}). No caso em que a reação de transferência de carga é reversível, e que não existe interação entre a superfície do eletrodo e os reagentes, e também que os produtos redox são estáveis (pelo menos no período do experimento), a razão entre os picos de corrente que aparecem no sentido normal e no reverso $i_{pf}/i_{pr} = 1$, sendo, neste caso, $i_{pf} = i_{pa}$ e $i_{pr} = i_{pc}$.²⁰ Além disso, para tal sistema, podem ser demonstrados os fatos que: 1) os potenciais de picos correspondentes E_{pa} e E_{pc} são independentes da velocidade de varredura e da concentração, 2) que $(E_{pa} + E_{pc}) / 2$ é uma boa

aproximação para o valor do potencial padrão E_0 para a reação redox e 3) que $E_p = E_{pa} - E_{pc}$ deve assumir um valor próximo de $59 n / mV$ (para uma reação de transferência de n elétrons) em qualquer velocidade de varredura.^{20,22} Estas características são ferramentas de diagnóstico muito convenientes para testar a reversibilidade do processo redox e a estabilidade dos produtos, se qualquer uma dessas características não está satisfeita, é uma indicação de que o sistema não é totalmente reversível.²¹

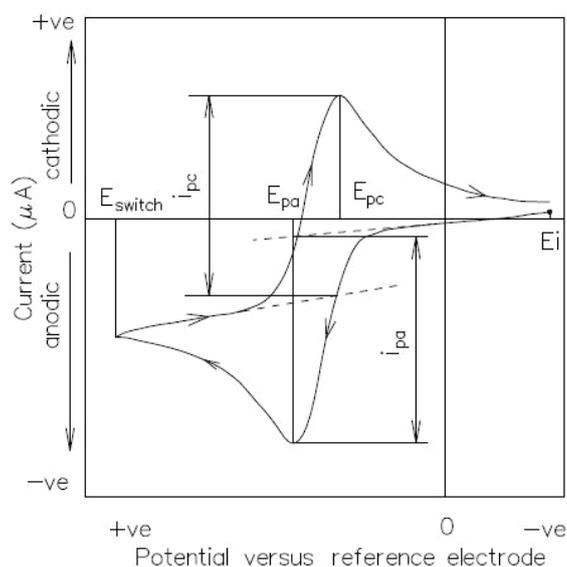


Fig 8. Voltamograma cíclico típico, mostrando os principais aspectos de interesse.²⁰

Em termos simples e conceituais, o eletrodo de trabalho pode ser considerado como um reagente, de força oxidante ou redutora ajustável. Na realidade, os processos eletroquímicos estão ocorrendo na interface entre duas fases distintas, o eletrodo e as espécies eletroativas presentes em solução.^{19,21} Ou seja, os processos em estudo são heterogêneos na natureza.³⁹ Para que a transferência de elétrons ocorra, as moléculas em solução têm de se aproximar do eletrodo. Em um experimento de voltametria cíclica, a solução é mantida em repouso, sem agitação. Nesta situação, o transporte de massa só pode ocorrer por difusão devido ao gradiente de concentração

criado em torno da superfície do eletrodo.^{40,41} Tais perfis de concentração de distância em diferentes etapas de um voltamograma cíclico de varredura são ilustrados na figura 8.

A magnitude do sinal observado dependerá em muito dessas propriedades difusionais do sistema. Intuitivamente, a intensidade da corrente deverá depender da área da superfície do eletrodo de trabalho e da concentração de espécies eletro-ativas na solução. Além disso, pode-se esperar que a taxa de varredura de tensão afete o perfil da concentração em torno do eletrodo, o qual por si só afeta diretamente a taxa de transporte de carga, e para esta questão o coeficiente de difusão surge explicitamente.³⁶

4.3.2. A Voltametria de Pulso

As técnicas de voltametria de pulso, introduzidas por Barker e Jenkin, são destinadas a reduzir os limites de detecção de medidas voltamétricas. Por aumentar substancialmente a razão entre as correntes faradáica e não faradáica, tais técnicas permitem a quantificação conveniente até a concentração de 10^{-8} M. Devido ao seu desempenho, as técnicas de pulso moderno têm suplantado de forma ampla a polarografia clássica no laboratório de análise. As técnicas de pulso diferencial são baseadas em experimentos de amostragem do tipo corrente/passo de potencial (cronoamperometria)³⁸. Uma seqüência de tais passos de potenciais, cada um com uma duração de cerca de 50ms, é aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Depois que o potencial é mudado a carga da corrente decai rapidamente (de forma exponencial) a um valor desprezível, enquanto que a corrente faradáica decai mais lentamente.²⁰

Assim, por amostragem, a corrente dura o tempo de pulso, e uma discriminação mais efetiva em relação à corrente de carga é então alcançada.³⁸

A diferença entre as várias técnicas voltamétricas de pulso é a forma da onda de excitação e o regime de amostragem de corrente.^{20,38} Em ambas Voltametria de Pulso Normal e Voltametria de Pulso Diferencial, um pulso de potencial é aplicado para cada gota de mercúrio, quando o DME (*Drop Mercury Electrode*) é usado. Nas duas técnicas também podem ser usados eletrodos sólidos. Ao controlar o tempo da gota (com um batedor mecânico), o pulso é sincronizado com o crescimento máximo da gota neste ponto, perto do final da vida útil da gota, a corrente faradáica atinge o seu valor mais alto, enquanto a contribuição da corrente de carga é mínima (baseado na dependência de tempo dos componentes).³⁸

Voltametria de pulso-Normal

A voltametria de pulso normal consiste em uma série de pulsos de aumento de amplitude aplicada a sucessivas gotas em um tempo pré-selecionado perto do final da duração de cada gota. Uma sucessão de pulsos normais é mostrada na Figura 9.⁴⁰

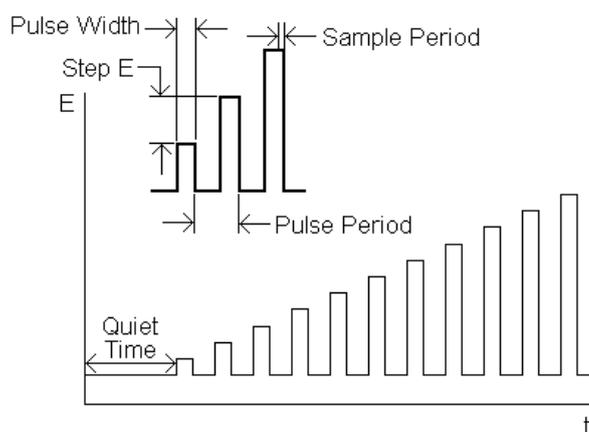


Figura 9. Excitação do sinal na Voltametria de Pulso normal.⁴⁰

Entre os pulsos, o eletrodo é mantido em um potencial constante (base) em que não ocorre nenhuma reação do analito. A amplitude do pulso aumenta linearmente com cada gota. A corrente é medida em cerca de 40 ms após a aplicação do pulso, no momento em que a contribuição da corrente de carga é quase zero. Além disso, por causa da curta duração do pulso, a camada de difusão é mais estreita do que a de polarografia DC (ou seja, maior fluxo de analito) e, portanto, a corrente faradaica é aumentada.³⁸

A Polarografia de Pulso Normal pode ser cerca de 5-10 vezes mais sensível que a polarografia DC e pode ser vantajosa também quando são usados eletrodos sólidos. Em particular, mantendo-se um baixo potencial inicial durante a maior parte da operação, é possível aliviar os problemas de incrustações da superfície (devido aos produtos de reação adsorvidos).^{20,21}

Uma técnica relacionada, Voltametria de Pulso Reverso, tem uma seqüência de pulsos que é uma imagem em espelho do que é a voltametria de pulso normal. Neste caso, o potencial inicial está no platô da onda (ou seja, onde a redução ocorre), e uma série de pulsos positivos de decaimento de amplitude são aplicados.³⁸

Voltametria de Pulso Diferencial

A Voltametria de Pulso Diferencial (VPD) é uma técnica extremamente útil para medir níveis de traço de espécies orgânicas e inorgânicas. A voltametria de pulso diferencial consiste de vários pulsos de magnitude fixa, sobrepostos a uma rampa linear de potencial⁴⁰ (Fig. 10a). A corrente é medida duas vezes, um pouco antes da

aplicação do pulso (em 1) e mais tarde, ao final do tempo de duração do pulso (após ~ 40ms, no 2, quando a corrente de carga decai)⁴⁰. A primeira corrente é então instrumentalmente subtraída da segunda, e esta diferença de corrente $\Delta i = i(t_2) - i(t_1)$ é plotada como função do potencial que foi aplicado.²¹

O voltamograma de pulso diferencial resultante consiste de um, ou vários, picos de corrente, e a altura desses é diretamente proporcional à concentração dos correspondentes analitos, como ilustra a Figura 10b.

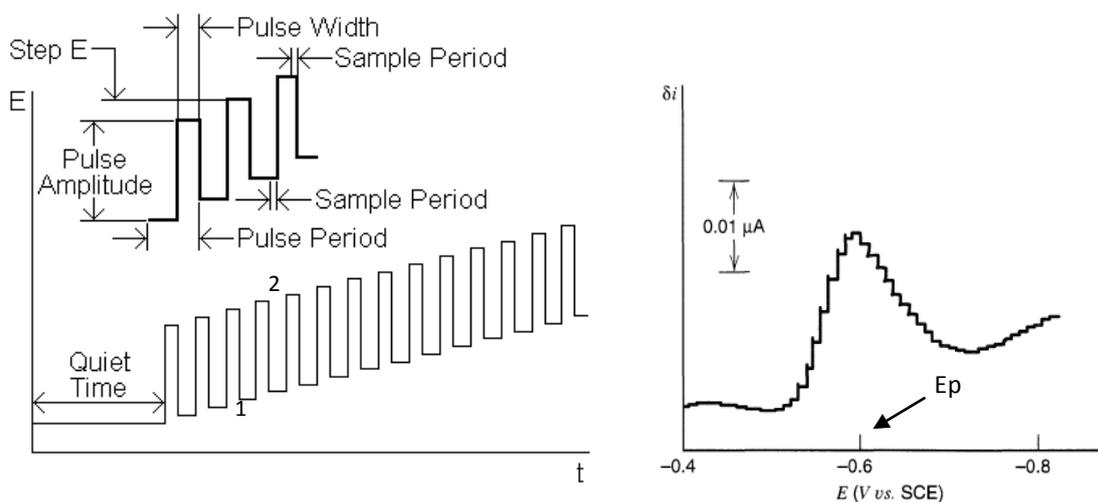


Figura 10. Em (a) Sinal de excitação na Voltametria de Pulso Diferencial Digital. Em 1, medição inicial; 2, medição final.³⁰ Em (b), voltamograma de pulso diferencial. O valor máximo da função $f(E)$, corrente, que ocorre em E_p está diretamente relacionado à concentração do analito estudado.³⁸

o mesmo ocorrer perto do potencial de meia onda polarográfica, como ilustrado na equação abaixo:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E / 2$$

Equação 2

Onde: $E_{1/2}$ = Potencial de meia-onda

O pico de corrente i_p pode, por sua vez, ser calculado pela equação 3:

$$i_p = \frac{nFAD^{1/2}C}{\sqrt{\pi t_m}} \left(\frac{1-\sigma}{1+\sigma} \right) \quad \text{Equação 3}$$

onde $\sigma = \exp [(nF / RT) (\Delta E / 2)]$ (ΔE amplitude do pulso). O valor máximo do quociente $(1 - \sigma) / (1 + \sigma)$, obtido para amplitudes de pulsos elevadas, é unitário.³⁸

A Voltametria de Pulso Diferencial resulta em uma melhoria considerável na discriminação da corrente faradáica da capacitiva.⁴¹ A contribuição da corrente de carga para a corrente diferencial é insignificante, como é descrito pela equação 4.

$$\Delta i_c \approx -0.00567C_i \Delta E m^{2/3} t^{-1/3} \quad \text{Equação 4}$$

onde C_i é a capacitância integral e m é a taxa de fluxo do mercúrio em um eletrodo gotjante de mercúrio (DME). Essa contribuição de fundo é menor, em mais de uma ordem de grandeza, do que corrente de carga da voltametria de pulso normal. Assim, a voltametria de pulso diferencial permite medições em concentrações muito baixas, na ordem de 10^{-8} M (cerca de $1\mu\text{g} / \text{L}$). A melhor detectabilidade, frente à Polarografia DC, é demonstrada na Figura 11, que compara a resposta de ambas as técnicas para o antibiótico cloranfenicol, presente no nível de $1,3 \times 10^{-5}$ M.

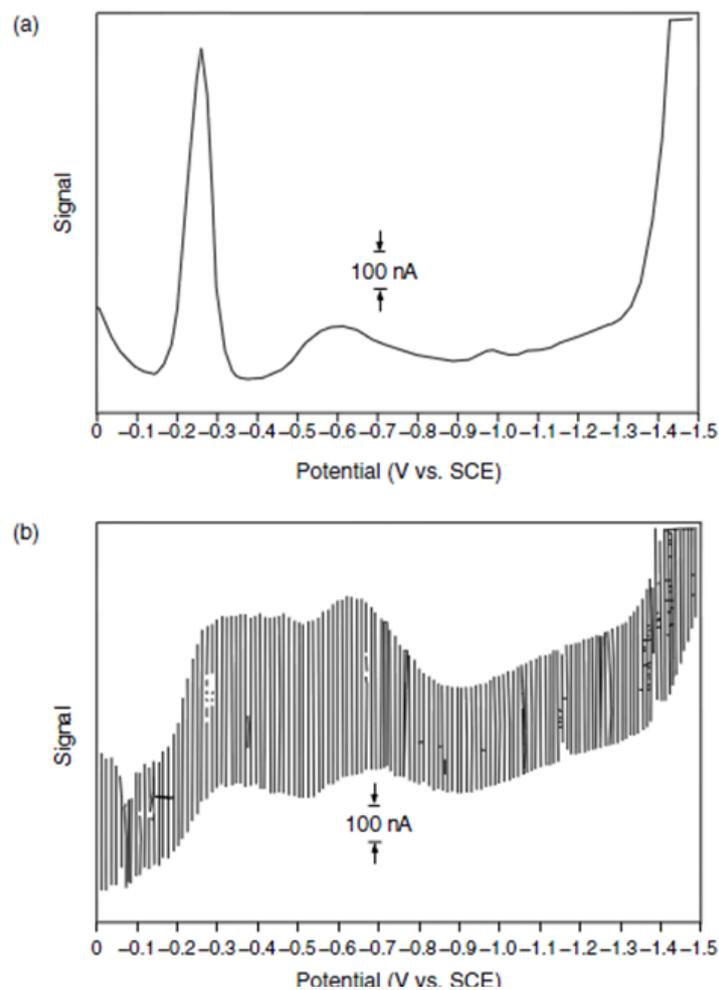


Figura 11. Polarogramas de Pulso diferencial (a) e DC (b) para sol. cloranfenicol $1,3 \times 10^{-5} \text{M}$.¹⁴

Similarmente, as melhorias frente à Polarografia de Pulso Normal estão ilustradas na Figura 12, mais adiante.

O pico de resposta resultante das medições de Pulso Diferencial resulta também em uma melhor discriminação entre duas espécies com potenciais redox similares. Em várias situações, picos de corrente separados por apenas 50mV conseguem ser medidos e visualizados. Essa quantificação depende não só dos potenciais de pico correspondente, mas também da largura dos picos. A largura do pico (na metade do valor da altura) ($W_{1/2}$) está

relacionada com a estequiometria do elétron,³⁸ sendo a mesma dependente da temperatura (T), e número de elétrons (n), sendo calculada com a aplicação da equação 5:

$$W_{1/2} = \frac{3.52RT}{nF}$$

Equação 5

Onde: R = constante dos gases, F = constante de Faraday.

e, portanto, corresponde a 30.1mV para n = 1 (25°C).

O pico de resposta, juntamente com a corrente de fundo plana, torna a técnica especialmente útil para a análise de misturas.

A seleção da amplitude do pulso e da taxa de varredura de potencial geralmente requer um equilíbrio entre a sensibilidade, resolução e velocidade. Por exemplo, pulsos de amplitudes maiores resultam em picos maiores e mais amplos.²⁰ A figura 12 ilustra a comparação entre polarogramas de pulso normal e diferencial.

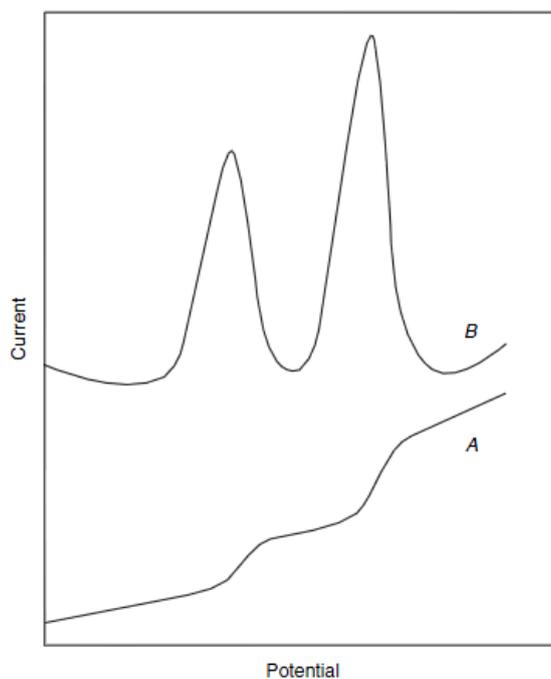


Figura 12. Comparação entre polarogramas de pulso normal (a) e diferencial (b) para uma mistura de 1mg/L de cádmium e íons em eletrólito 0.1M HNO₃.²⁰

Sistemas redox irreversíveis resultam em picos de corrente menores e mais amplos (ou seja, de sensibilidade e resolução inferiores) em comparação com aqueles previstos para sistemas reversíveis. Em adição à melhoria da sensibilidade e resolução, a técnica de Voltametria de Pulso Diferencial pode fornecer ainda informações qualitativas sobre a forma química na qual o analito aparece, como o estado de oxidação,¹⁴ além de análise de fenômenos de adsorção.⁴¹

5. Métodos de Biorreconhecimento

A função de um biossensor pode ser determinada pelo tipo de componente de reconhecimento que está associado a esse dispositivo. E esta é uma das etapas mais delicadas no desenvolvimento de um protótipo.⁷ Vários elementos biológicos podem

assumir essa função, como é o caso das enzimas, anticorpos e antígenos, DNA e RNA, organelas, tecidos e microorganismos. Dentre esses, as enzimas, os ácidos nucléicos e as imunoglobulinas citadas são os que têm demonstrado maiores aplicações^{7,42} e, portanto, serão mais profundamente abordados neste trabalho.

5.1. Biossensores Baseados no Método Enzimático

A seletividade do reconhecimento do analito, pelo componente biológico ativo, aliada à sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos na área de biossensor catalítico.⁴³⁻⁴⁵ O método de reconhecimento enzimático baseia-se no fato de um pool de uma (ou mais de uma) enzima específica estar imobilizado em um suporte parte de um transdutor. Na maioria dos casos, as enzimas são do grupo das oxirredutases e os transdutores do tipo eletroquímico.⁷ Nesses sistemas, que serão mais abordados no decorrer deste trabalho, os processos decorrentes da ligação específica enzima-substrato, que ocorrem no caso de o eletrodo entrar em contato com uma solução que contenha o analito para o qual o biossensor foi designado, liberam elétrons que serão capturados na superfície do biossensor, traduzidos e amplificados.⁴² O projeto básico do biossensor de Clark já citado anteriormente foi tão bem sucedido, que muitas pesquisas na área de biossensores foram conduzidas sob suas ideias, e pelo menos um biossensor comercial ainda é produzido utilizando o conceito original de medição de oxigênio.⁷ Entretanto, nos dias de hoje, a alternativa preferível a ser utilizada é baseada na detecção do peróxido de hidrogênio oriundo da oxidação da glicose frente à enzima glicose oxidase na presença de oxigênio. A *Yellow Springs Instrument Company* (YSI, *Yellow Springs*, OH, EUA) lançou com sucesso em

1975 um biossensor enzimático para glicose baseado na detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio. Esse foi o primeiro de muitos analisadores laboratoriais baseados em biossensores a serem construídos por companhias ao redor do mundo.⁴⁶ Zho *et al* desenvolveram um biossensor amperométrico para glicose baseado na eletrodeposição de nanopartículas de Platínio sobre nanotubos de multicamada (MWNTs) e imobilizaram a enzima com sol-gel quitosana-SiO₂. O biossensor exibiu uma boa resposta à glicose, com crescimento linear de 1μM-23mM, um baixo limite de detecção (1μM), baixo tempo de resposta (aproximadamente 5s), e alta sensibilidade (58,9μAmM⁻¹cm⁻¹).⁴⁷

5.2. Biossensores Imunológicos (Imunosensores)

A determinação de níveis de concentrações aceitáveis de compostos poluentes, e de drogas ou hormônios em química clínica, requerem o desenvolvimento de metodologias confiáveis com detecção de quantidades muito pequenas, na ordem de 10⁻⁹molL⁻¹.⁴⁸ Nesse caso a tecnologia imunológica, que é baseada na habilidade do anticorpo (Ac) formar complexo com o correspondente antígeno (Ag), é essencial, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade.⁴²

Biossensores imunológicos são baseados nessa interação antígeno-anticorpo. Nesses dispositivos, a substância de biorreconhecimento imobilizada pode ser tanto um antígeno, como seu anticorpo específico. A ligação de especificidade se procede em meio reacional, quando o sensor é posto em contato com uma solução que contém o analito próprio ao anticorpo/antígeno, ou hapteno (substância de baixo peso

molecular que por si não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico), imobilizado. Haverá uma ligação específica entre esses dois compostos, gerando um sinal traduzível e mensurável por um transdutor escolhido para a aplicação. Esse sinal pode ser decorrente da alteração da massa total de biomoléculas na superfície do eletrodo, gerando alteração da frequência de leitura, no caso de transdutores piezoelétricos, quando da ligação Ac-Ag específica,⁴⁹ ou ainda a molécula imobilizada pode estar conjugada a marcadores, como enzimas.¹⁴ O método de biorreconhecimento gerador de sinal seguiria, então, os mesmos princípios dos biossensores catalíticos (enzimáticos).⁵⁰

5.3. Genossensores: os Biossensores de DNA

As pesquisas com biossensores com sequências de ácidos nucleicos têm demonstrado resultados promissores. Nestes tipos de sensores, uma sequência de bases é imobilizada na superfície do biossensor. Ao mesmo entrar em contato com uma solução contendo uma sequência complementar à que foi imobilizada, alterações físico-químicas provenientes da hibridização gerarão/alterarão sinais que serão captados e traduzidos pelo biossensor em um sinal mensurável. O desenvolvimento de aparelhos sensores de DNA tem continuado a atrair a atenção considerável em conexão com a análise genética, detecção de desordem genéticas, compatibilidade tecidual e aplicação forense.⁵¹⁻⁵⁴

As enormes informações surgidas no Projeto Genoma Humano geraram demandas enormes para ferramentas analíticas inovadoras capazes de disponibilizar a informação genética de uma forma mais rápida, mais simples e mais barata a partir de

dada amostra. Neste contexto, os biossensores eletroquímicos de DNA, com os ácidos nucléicos diretamente imobilizados na superfície de um eletrodo para hibridização, oferecem rotas inovadoras.⁵⁵

Os biossensores têm se destinado a muitas aplicações na pesquisa e na indústria, nomeadamente no diagnóstico clínico, para a detecção de bactérias e ácidos nucléicos virais em amostras biológicas. Eles normalmente fazem uso da capacidade peculiar de cadeias de DNA livre hibridizarem tanto *in vivo* como *in vitro*, permitindo assim a distinção entre uma molécula de DNA de fita simples e uma de fita dupla. Muitas vezes, o uso de uma sonda de ácido nucleico previamente conhecida é necessária. Marcações enzimáticas com radioisótipos ³²P ou ¹²⁵I, apesar de sua alta sensibilidade, caíram em desuso devido aos perigos potenciais relacionados à radioatividade desses elementos.⁵⁶ Por conseguinte, novos processos de rotulagem, incluindo avidina / biotina,⁵⁷ digoxigenina,⁵⁸ corante fluorescente⁵⁹ e um agente quimioluminescente,⁶⁰ substituíram o método radioativo, mas, em geral, esses são complexos e demorados. Em contrapartida, concomitantemente às pesquisas citadas, foram desenvolvidos estudos com biossensores de DNA óptico,^{61,62} piezoelétricos,⁶³⁻⁶⁵ acústico^{66,67} e transdução eletroquímica.⁶⁸

Em particular, biossensores eletroquímicos são rápidos, sensíveis, baratos, passíveis de detecção em campo e têm grande potencial de portabilidade, tornando-os uma das melhores alternativas atualmente. Em contraste com muitas técnicas existentes para a detecção de DNA, tais como fluorescência,^{69,70} espectroscopia de ressonância de plasmon de superfície⁷¹ e microbalança de cristal de quartzo,⁷² a técnica eletroquímica oferece uma série de vantagens, tais como a sua simplicidade, rapidez, baixo custo e alta sensibilidade.⁷³⁻⁷⁷ Diferentes estratégias têm sido dedicadas

para a detecção eletroquímica da hibridização do DNA. Os indicadores eletroativos são comumente usados como marcadores redox para a detecção eletroquímica da hibridização do DNA.^{78,79}

6. Técnicas de Fabricação de Eletrodos

6.1. Eletrodos em Pasta de Carbono

Os eletrodos de pasta de carbono são os mais utilizados, uma vez que estas superfícies são facilmente renovadas, apresentam baixa corrente de fundo e um amplo intervalo de potencial de trabalho.⁸⁰ Apesar disso, Mullor⁸¹ considerou a incorporação de espécies em eletrodos de pasta de carbono como algo a ser melhorado, principalmente do ponto de vista dos aspectos de estabilidade e reprodutibilidade. Mesmo sendo uma opinião um pouco antiga, grande parte das pastas de carbono usadas para construção de eletrodos ainda são preparadas pela mistura de dois componentes (pó de grafite e óleo mineral) e, em certos casos, espécies eletroativas como enzimas e mediadores eletroquímicos podem ser adicionados à mistura como forma de imobilização. Kubota⁸² fez um planejamento fatorial de tipo 2^k , sendo k o número de variáveis do ensaio, e 2 a a quantidade de valores que essas variáveis podiam assumir, e encontrou a proporção de 40% de grafite e 60% de Sílica (usada como suporte para espécies eletroativas no eletrodo de carbono) com posterior adição de óleo mineral em NaNO_3 ($0,5\text{molL}^{-1}$) como melhor condição para o aparecimento de

pico de corrente anódico (I_{p_a}) quando da análise por voltametria cíclica neste eletrólito, nos parâmetros do artigo.

6.2. Eletrodos *Screen Printed*

O método de *screen printing* (serigrafia) é uma técnica de impressão que utiliza uma malha de tecido para suportar uma camada de tinta a ser aplicada. É utilizado na fabricação de filmes condutores, onde tintas condutoras, como prata, carbono e cloreto de prata, são passadas através das aberturas de uma tela e depositada sobre um substrato sólido. Esta técnica foi inicialmente desenvolvida para atender as necessidades da indústria de circuitos eletrônicos, mas mostrou-se bastante interessante para a fabricação de eletrodos para pilhas combustíveis e biossensores,⁸³ produzindo filmes homogêneos com espessuras que podem chegar a menos de 10 μm , dependendo da abertura da tela utilizada,⁸⁴ sendo essa uma de suas principais vantagens. A construção de eletrodos com a tecnologia screen-printing surgiu com a expectativa de suprimir a procura por eletrodos com praticidade operacional; proporcionando assim a oportunidade de realizar uma grande gama de análises clínicas, ambientais e industriais, sem a necessidade de estar em um laboratório para execução dessas mesmas análises.^{85,86} Essa técnica mostrou ser um procedimento simples e de baixo custo, onde uma tinta condutora serve de revestimento sobre um suporte inerte, podendo este ser de PVA (Polivinil Álcool), ou material cerâmico, por exemplo. Esses eletrodos são potencialmente portáteis, de fácil operacionalidade e de fabricação simples. Aliados ao baixo custo, juntamente com a sua versatilidade e aplicabilidade, permitem a produção de dispositivos descartáveis.⁸⁷ Muitos trabalhos

com biossensores produzidos por *screen printing* já foram realizados,⁸⁸ a exemplo para detecção de glicose,⁸⁹ de creatinina,⁹⁰ de lactato,⁹¹ de uréia,⁹² fosfatase alcalina⁹³ e de colesterol sérico.⁹⁴ A figura 13 ilustra 3 eletrodos *screen printed* feitos artesanalmente em laboratório.

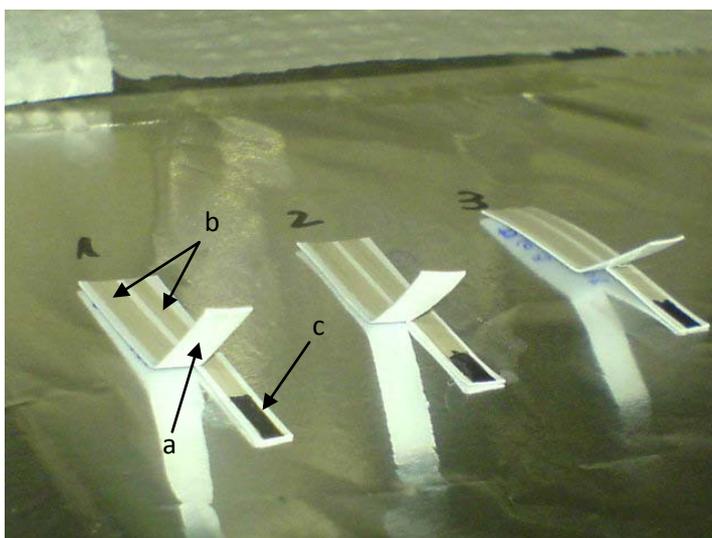


Figura 13. Eletrodos produzidos por *screen printing* com impressão em tiras de PVA (a). Em b, as trilhas condutoras impressas em prata para contato independente com os eletrodos de referência (Ag/AgCl) – não visualizado, e o de trabalho (Carbono), mostrado em c.

Na confecção dos eletrodos impressos (EI) é utilizada uma variedade de tintas condutoras, sendo as de carbono e de metais pesados as que apresentaram melhores resultados com essa finalidade,⁸⁸ principalmente na produção de eletrodos de trabalho. A disponibilidade dessas tintas no mercado é ampla, e sua utilização depende de protocolos específicos de cada fabricante. Métodos automatizados na produção de biossensores por *screen printing* já estão disponíveis, e esses podem representar um maior controle da reprodutibilidade dos eletrodos impresos, diminuindo uma etapa a ser seguida no laboratório de pesquisa, sendo um passo ideal para a produção em larga escala e capacidade de comercialização do produto final.⁹⁵

6.3. Eletrodos em Filme

ITO-glass

ITO (*Indium-Tin Oxide*) é um material de eletrodo conhecido, agindo como um eletrodo opticamente transparente, que tem sido utilizado extensivamente em espectroeletroquímica, tendo em vista as suas propriedades ópticas particulares e potenciais aplicações. ITO também é utilizado como película em monitores e outros sistemas de tela *touch screen*, encontrados em celulares e outros eletrônicos. Além disso, ITO possui muitos atributos atrativos, incluindo uma ampla janela de potencial e propriedades físicas e eletroquímicas estáveis,²⁶ apresentando ainda menor rugosidade e maior homogeneidade de superfície quando comparado aos eletrodos de carbono vítreo ou os feitos por *screen-printing*. Vários são os métodos de utilização do ITO, que pode se apresentar, por exemplo, na forma imobilizada em lâmina de vidro, ou em folhas de PET (Sigma-aldrich). A figura 14 apresenta uma fotografia de uma lâmina de ITO.



Figura 14: Lâminas de ITO retangulares em substrato de vidro. Fore Vision Instruments.⁹⁶

A escolha do formato ideal vai depender da aplicação destinada ao experimento. Xu⁹⁷ utilizou folhas de PET cobertas com ITO para construção de um eletrodo com DNA imobilizado. Por sua vez, Ballarin⁹⁸ fez uso de lâminas de vidro

(9mm x 27mm) recobertas com filme de ITO para impressão de PEDOT, numa área de 16mm x 9mm, construindo assim seu eletrodo de trabalho, para posterior análise do comportamento eletroquímico do conjugado e caracterização do filme obtido. O uso de folhas de PET adicionadas de filme de ITO apresenta algumas vantagens, como alta flexibilidade e espessura fina. Entretanto a resistividade elétrica superficial não chega a valores tão pequenos quanto nas lâminas de vidro. Além disso, por vezes a rigidez da superfície onde o ITO está imobilizado pode ser necessária para o experimento, sendo nesses casos a lâmina de vidro a melhor opção. Sabe-se, porém, que nas análises eletroquímicas um dos principais parâmetros de monitoramento na realização de análises voltamétricas é o controle da área do eletrodo de trabalho. Assim, a manutenção da mesma é de primordial importância para a reprodutibilidade dos resultados.^{20,21,36,38}

Quando da escolha das lâminas de vidro, a definição da área do eletrodo a ser usada não é tão simples como no caso de folhas PET, já que essas podem ser facilmente recortadas no próprio laboratório. O corte de lâminas de vidro muitas vezes não é indicado pelo fato da possibilidade de danificar-se o filme de ITO no momento do corte, além da dificuldade na manutenção dos tamanhos dos eletrodos. A escolha muitas vezes é optar pela compra de lâminas menores, de tamanho próximo ao desejado, mas ainda um pouco grandes para que se utilize uma região das mesmas como o eletrodo de trabalho em si, enquanto uma das extremidades funcionará como contato elétrico ao sistema gerador/transdutor,⁹⁹ o que pode aumentar o custo final.

7. Métodos de Deposição de Biomoléculas e Polímeros

7.1. *Spin coating*

O método de *spin coating* baseia-se em pôr uma solução de polímero em um substrato sólido e produzir um movimento de rotação neste substrato. A solução de polímero, então, cobrirá completamente o substrato. Devido ao movimento rotacional, o solvente é evaporado, e, após determinado tempo de rotação, uma película de polímero sólido residual cobre o substrato. Este procedimento é amplamente utilizado como um método para produzir finos filmes de polímeros com uma espessura homogênea. A aplicação varia de estruturas semicondutoras de transformação^{100,101} à pesquisa na análise do comportamento de filmes finos umedecidos^{102,103} e polímeros emissores de luz.¹⁰⁴ Em todos os casos é extremamente importante conhecerem-se os detalhes sobre o fator de impacto relevante à espessura final da película criada, como a velocidade de rotação, a concentração da solução e a massa molar dos polímeros utilizados.¹⁰⁵ Um modelo de sistema utilizado é o poliestireno dissolvido em tolueno.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Para uma solução moderada concentrada, a espessura é diretamente proporcional à concentração.¹⁰⁸ No entanto, para pequenas e altas concentrações, desvios na proporcionalidade já foram relatados.¹⁰⁹

7.2. Dip Coating

O método *dip-coating* é um processo simples para depositar uma película fina de solução em uma placa, cilindro, objeto ou de forma irregular. O processo de *dip-coating* foi primeiramente usado em termos comerciais para a produção de filmes finos com tecnologia sol-gel em 1939.¹¹⁰ Também foi usado para produzir filmes finos em outras tecnologias, tais como em filmes fotorresistentes¹¹¹ e camadas de lubrificante para discos rígidos magnéticos.¹¹² O fato de que a geometria dos substratos pode variar muito é uma característica distintiva da técnica *dip-coating*. O processo envolve a imersão do substrato em um reservatório de solução por algum tempo, assegurando assim que o substrato seja completamente coberto pela solução.¹¹³ Posteriormente, então, este é removido do banho de solução em que estava. A formação do filme líquido é atingida por dois mecanismos principais, a gravidade, ou seja, a drenagem de líquido, e a evaporação do solvente. O *dip coating* pode ser de camada única, ou multicamada. O sistema de multicamadas consiste em aplicações sucessivas de imersão e retirada de um mesmo, ou diferente, material em solução, com intervalos de secagem controlados entre as etapas. O número de imersões de um mesmo substrato sobre uma camada, além do tempo em que este fica em contato com a solução são fatores demasiadamente importantes nas características do produto final. A utilização de imersões sucessivas em diferentes soluções leva a um sistema multicamada de espessuras individuais controladas.

7.3. Inkjet Printing

Em alternativa aos métodos convencionais, a deposição por impressão a jato de tinta (Fig. 15) está atraindo muito interesse como uma ferramenta de produção e precisão. De fato, ela permite a deposição de quantidades muito pequenas (2-12 pL) em praticamente qualquer superfície (vidro, plástico, metal, etc), com uma precisão e reprodutibilidade potencialmente maiores do que a impressão por *screen printing* (no caso de matrizes condutoras), e do que métodos manuais (no caso de imobilização de enzimas, DNA, etc) devido à viscosidade das tintas formuladas para impressão a jato de tinta, que é menor do que a das pastas de impressão *screen printing*.¹²² Com efeito, por esta técnica, resoluções superiores a 1200 dpi (pontos por polegada), com uma média de pontos diâmetro de cerca de 15-40 m μ M, pode ser obtida. Uma outra vantagem está no fato de que as soluções remanescentes de um experimento de imobilização podem ser guardadas como solução estoque e utilizadas posteriormente, visto que as mesmas não entram em contato com a matriz-suporte da imobilização, o que ocorre no método de *dip coating*.¹¹³



Figura 15. Impressora a jato de tinta e substratos biológicos passíveis de impressão. Adaptado de <http://www.epson.com>

Além disso, o uso de uma matriz de bicos conectado a um sistema de dispositivo de condução eletrônica (ou seja, a cabeça de impressão), permite um grau de controle muito bom sobre o *layout* do micro modelo padrão a ser impresso.¹¹⁴ Finalmente a ausência de contato físico entre cabeçote e suporte impresso torna possível o depósito de materiais em substratos sensíveis ao contato, sem contar na enorme vantagem que esse método possui por consumir muito menos material quando comparado a outros métodos, como *spin coating*.¹¹⁵

A Impressão a jato de tinta pode ser feita com tecnologias diferentes de ejeção de tinta, dos quais o mais utilizado são os sistemas piezoelétrico e térmico. O sistema térmico é uma técnica usada por fabricantes como Canon e Hewlett Packard,¹¹⁶ este método é geralmente chamado de Bubble Jet (jato de bolha). Na tecnologia térmica os micro esguichos estão eletronicamente ligados a resistências elétricas minúsculas, as quais aquecem a tinta a elevadas temperaturas (centenas de graus) criando uma bolha de ar que empurra a tinta para o exterior e a deposita sobre o papel. Quando a bolha “estoura” (é rompida), cria-se um vácuo. Isto puxa mais tinta do cartucho para dentro da cabeça de impressão. Quando a resistência se encerra, a tinta esfria, e o ciclo recomeça.⁹⁹ Uma cabeça de impressão de jato de bolha típica tem 300 ou 600 esguichos minúsculos, e todos eles podem lançar uma gotícula simultaneamente. Algumas das impressoras mais modernas que utilizam esta tecnologia conseguem aquecer e resfriar a tinta à velocidade surpreendente de 9.000 vezes por segundo.¹¹⁷

Em cabeçotes piezoelétricos, materiais cristalinos sofrem estresse mecânico sob a aplicação de um campo elétrico. Uma contração muito pequena ou a expansão desses cristais, confinada nos bocais, possibilita a redução do espaço disponível para a

tinta, aumentando a pressão e fazendo com que a ejeção de uma gota ocorra.^{118,119}

Com a vibração de um elemento elétrico, as tintas são jorradas através dos bicos ejetores. Grande parte das impressoras Epson adota este método e os cabeçotes e bicos estão acoplados na própria impressora, não no cartucho, como ocorre com modelos da Hewlett Packard e Canon. Nesta tecnologia eletromecânica não há utilização de calor. Os materiais especiais de que são feitos os "jatos" contraem-se e expandem-se quando são atravessados por uma corrente elétrica.¹¹⁷ Essa contração e expansão funcionam como um êmbolo mecânico que impele a tinta com grande rapidez e precisão para o papel. E é exatamente o fato de não ocorrer elevação de temperatura no interior da cabeça de impressão que faz com que esta metodologia seja mais indicada ao se trabalhar com soluções enzimáticas, já que a alta temperatura poderia desnaturar a enzima. Ballarin e colaboradores³ imprimiram o polímero condutor PEDOT-PSS (Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) poly(styrenesulfonate) em matriz sólida, utilizando-se de uma impressora inkjet térmica e, comparando com o método *spin coating*, não observaram diferenças significativas entre os mesmos por Voltametria Cíclica, logo isso não impede que o método Inkjet baseado em *Bubble Jet* possa ser utilizado na impressão de outros materiais, como polímeros condutores, que foi o caso do trabalho citado.

8. Imobilização de Compostos Biológicos em Matriz Sólida

8.1. Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo linear, derivado da quitina, composto de D-glucosamina (unidade desacetilada) β -(1-4)- ligada sob distribuição aleatória e de N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada).¹²⁰ A quitosana tem uma série de possíveis aplicações industriais e biomédicas.¹²¹

De acordo com a literatura, as propriedades da quitosana permitem que a mesma seja utilizada como suporte para imobilização de DNA em superfícies de eletrodos de carbono vítreo através da interação eletrostática entre o oligômero quitosana policatiônica e o DNA polianiônico, formando um complexo estável. Após uma modificação química de uma superfície de um eletrodo carbono vítreo com quitosana, os grupos amina livres (NH_3^+) de monômeros de quitosana, se ligam eletrostaticamente aos grupamentos fosfato (PO_4^-) de uma cadeia de DNA nativo ou desnaturado, que se torna imobilizada na superfície do eletrodo. Desta forma uma segunda cadeia de DNA complementar e marcada pode hibridizar com a cadeia imobilizada. A marcação da cadeia complementar, pode ser realizada através de substâncias como por exemplo ferroceno, que funciona como um mediador químico, o qual promove a transferência de elétrons.⁵⁶ Outras substâncias podem ser descritas como mediadores de reações redox, como o azul de metileno, tetratiofulvaleno, 1,4-benzoquinina, promazina, ácido carboxílico do ferroceno tornando possível detectar eletroquimicamente a reação de hibridização.¹⁹

8.2. APTES (*Aminopropiltrimetoxisilano*)

Silanização é o processo de cobertura de uma superfície através de auto-montagem (*self-assembly*) com moléculas de alcoxissilanos organofuncionais.²² Componentes minerais como mica, vidro e superfícies de óxido de metal podem ser silanizadas, pelo fato de as mesmas conterem grupos hidroxila que atacam e deslocam os grupos alcóxi silano sobre o silano, formando assim uma ligação covalente do tipo -Si-O-Si-. O objetivo da silanização é, portanto, formar vínculos em toda a interface entre componentes minerais e componentes orgânicos. Os aminosilanos são compostos que apresentam a capacidade de silanização, e, dentre esses, o APTES é um dos exemplos mais conhecidos. O APTES tem sido amplamente utilizado em biossensores de afinidade por conta da capacidade que o grupo silano tem de se ligar a substratos de silício ou vidro, a exemplo lâminas de vidro com filme de ITO (*ITO-glass*), enquanto o grupo amina pode formar ligações covalentes com grupos carboxila (que são grupos funcionais mais comumente encontrados em biomoléculas).¹²²

9. Mediadores Eletroquímicos

Mediadores eletroquímicos são compostos redox de baixo peso molecular que fazem a transferência de elétrons entre o centro redox de uma enzima e a superfície do eletrodo de trabalho. Durante o ciclo catalítico, o mediador primeiro reage com a enzima, e então transfere ou recebe elétrons a partir do eletrodo, melhorando a performance com .¹⁴

A seguir, dois de alguns mediadores eletroquímicos muito utilizados em biossensores:

9.1. TCNQ

O TCNQ (Tetracianoquinodimetano) é um composto orgânico de fórmula $(NC)_2CC_6H_4C(CN)_2$ e cor alaranjada. É um acceptor de elétrons, que é usado para preparar sais de transferência de carga. O TCNQ é preparado pela condensação de 1,4 ciclohexanodiona com malononitrilo, seguido por desidrogenação de dieno com bromo e é facilmente reduzido eletroquimicamente originando um radical ânion de cor azul.¹²³ Após o tratamento com o doador de elétrons TTF (*tetrathiafulvene*), forma o "metal orgânico" TTF-TCNQ onde o TCNQ é o acceptor de elétrons. Este sal cristaliza como um polímero unidimensional, consistindo de pilhas separadas de cátions e ânions, respectivamente doadores e aceptores.

9.2. Azul de Metileno

O azul de metileno (AM) é um corante orgânico redox fenotiazínico descoberto em 1876, que inicialmente ganhou prestígio como corante citológico e como indicador de óxido-redução. Devido às suas propriedades fotoquímicas, têm sido desenvolvidos estudos visando sua aplicação na inativação de bactérias e vírus, em células fotogalvânicas e na preparação de eletrodos quimicamente modificados.¹²⁰ A interação entre o azul de metileno e as bases de guanina presentes em um eletrodo modificado com DNA foi descrita por Yang,¹²⁴ alternando-se entre as sequências de bases de guanina e citosina nas análises de Kara.¹²⁵ A detecção da hibridização é realizada pela imersão do eletrodo modificado com DNA imobilizado de cadeia única,

de sequência de bases conhecida, na solução do polinucleotídeo a ser detectado. Após o processo de imobilização, o eletrodo é transferido para outro compartimento contendo o azul de metileno como indicador de que o eletrodo foi modificado com DNA. A eletroatividade do AM é detectada através da sua interação com as guaninas livres. A hibridização pode ser constatada por meio da variação de valores de corrente ou potencial - medida por cronopotenciometria ou voltametria (cíclica ou de varredura linear), produzida pela alteração do comportamento eletroquímico do AM frente ao DNA híbrido formado.¹²⁶

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver novas metodologias de estudo em diagnóstico a partir de biossensores enzimáticos e de DNA fazendo uso de técnicas amperométricas.

Objetivos Específicos

1. Desenvolver eletrodos pelo método *screen printing* e aplicá-los a estudos com imobilização enzimática.
2. Desenvolver um método de impressão automatizado para deposição de compostos biológicos em matrizes sólidas.
3. Realizar análises voltamétricas dos eletrodos desenvolvidos.
4. Construir um minidispositivo com célula eletroquímica incorporada destinado a aplicações com eletrodos em lâminas de ITO.
5. Utilizar um sistema de imobilização para sequências nucleotídicas específico para aplicação nas lâminas de ITO.
6. Realizar testes eletroquímicos nos aparatos desenvolvidos para o reconhecimento e diferenciação de ss e dsDNA imobilizados em matriz sólida.

ARTIGO CIENTÍFICO I

A glucose oxidase biosensor prototype based on biological inkjet printing technology

Lima, R.M.M.^{1,2}, Padilha, R.², Santos, S.², Nascimento, G.A.^{1,2}, Souza, E.V.M.^{1,2}, Lima-Filho, J.L.^{1,2,3}

1- Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol) Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego S/N Cidade Universitaria, Recife, PE- Brazil; 2- Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego S/N Cidade Universitaria, Recife, PE- Brazil; 3- Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego S/N Cidade Universitaria, Recife, PE- Brazil

Abstract

In this study, an initial prototype of an amperometric glucose biosensor, partly based on inkjet printing technology, was realized. Two electrodes were made by screen printing on a Poly Vinyl Alcohol slide. On one of them, a solution of Glucose Oxidase was deposited by a modified Epson R290 InkJet printer. The other electrode was an Ag/AgCl reference electrode. Before the printing process take place, a Scan Electron Microscopy of the print-head was made, to determine its nozzle sizes, aiming to avoid the device to clog. Cyclic voltammetry showed a linear response of glucose concentration and current peaks in a same potential range, indicating the feasibility of the biosensor prototype.

Keywords: Biosensor; Glucose; Inkjet printing; Amperometry

Resumo

Neste estudo, foi desenvolvido um protótipo inicial de um biossensor amperométrico de glicose, parcialmente baseado na tecnologia de impressão jato de tinta. Dois eletrodos foram confeccionados pelo método *screen printing* em uma fita de PVA (Polivinil Álcool). Em um deles, uma solução de glicose oxidase foi depositada por impressora a jato de tinta, modelo Epson R290, modificada para os experimentos. O outro eletrodo (referência) foi constituído de Ag / AgCl. Antes do processo de impressão foi realizada uma verificação da cabeça de impressão por Microscopia Eletrônica de Varredura, para se determinar os tamanhos dos poros de ejeção, com o objetivo de evitar o entupimento dos mesmos. A Voltametria cíclica mostrou uma resposta linear da concentração de glicose e os picos de corrente anódica em um mesmo intervalo de potencial, indicando a viabilidade do método.

Palavras-chave: Biossensor; glicose; impressão a jato de tinta; amperometria

1. Introduction:

Because of the complications caused by diabetes, a rapid determination of glucose in blood is essential in the diagnosis and control of this disease.¹ Therefore, there has been a lot of interest in the design and development of technical methods for this purpose.² The first reported biosensor in the literature was developed in 1962 by Clark and Lyons.^{3,4} They utilized the decrease in oxygen partial pressure brought about from the oxidation of glucose by the enzyme glucose oxidase (GOD). The optional use of electrochemical mediators (as TCNQ, for example) can improve the detection of hydrogen peroxide (H_2O_2) enzymatically produced at significantly reduced potentials, whereby signals from interfering species are minimized.⁵ The use of such mediators has led to a wealth of publications on biosensor systems utilizing H_2O_2 sensitive base transducers coupled to oxidase enzymes. Carbon, in different forms, has a wide potential window, it is inexpensive to manufacture, and is robust; making it a very popular electrode material.² Screen-printed carbon electrodes (SPCEs) can be mass-produced at low cost, and were employed in the fabrication of the commercially successful pen-sized, 30-s blood glucose biosensor.⁶ In addition, SPCEs have been used for the construction of sensors and biosensors for a wide variety of analytes, as already reviewed.⁷ However, the fabrication processes involved in most of these devices are quite complex and a simpler process is highly desirable.

Carbon inks are usually consisted of carbon particles, to promote electrical conductance, a polymeric binder, to provide mechanical stability, and a solvent (normally organic), to dissolve the binder. Many enzymes are denatured by organic solvents or by the elevated temperatures required in the drying process when

constructing a biosensor, making the bulk incorporation of enzymes into the ink solution a problematic procedure. Water-soluble polymers have been used to incorporate more delicate enzymes such as lactate oxidase (LOD) into water-based inks, aiming to avoid these problems.⁸ However in some cases, the use of water-soluble inks may not to be appreciated once many experiments occur under aqueous environments.

In alternative to this method, the inkjet printing deposition is attracting a lot of interest as a manufacturing tool.⁹ In fact, it allows one to deposit very small droplets (2–12 pL) on almost any surface (glass, plastic, metal, etc.), with a precision and reproducibility potentially higher than that of screen printing, due to the viscosity of the inks formulated for inkjet printing, which is lower than that of the screen printing pastes. Indeed, by this technique, resolutions higher than 1200 dpi (dots per inch), with a mean dot diameter of about 15–40 μm , may be obtained.¹⁰ Moreover, the use of an array of nozzles connected to a device-driving electronic system (i.e. the print-head) allows a very good control degree over the layout of the microdeposited pattern.¹⁰ The absence of physical contact between the print-head and the supports chosen to be printed makes it possible, under a substrate controlled thickness, to deposit materials on contact-sensitive substrates.⁹

Inkjet printing may be performed with different ink ejection technologies, of which the most used are the piezoelectric and the thermal one.

In piezoelectric print-heads, crystalline materials undergo mechanical stress upon application of an electrical field. A very small contraction or expansion of these crystals, confined into the nozzles, allows for the reduction of the space available for the ink, thus increasing the pressure and causing the ejection of a drop.^{11,12} With the

thermal technology, the ink emission is obtained thanks to a vapour bubble that is formed on the surface of a heating resistor located inside each nozzle. During the heating, the vapour bubble grows, increasing the pressure inside the nozzle and forcing an ink droplet through the orifice.¹³

Inkjet printing applications in biotechnology have been already used for the development of biosensors^{7,14}, biochips¹⁵ and DNA arrays,^{16,17} as well as for DNA synthesis,¹⁸ microdeposition of active proteins,^{19,20} free-form fabrication techniques to create cellular polymeric scaffolds^{21,22} and printing biological materials for cellular scaffolds.²³ It has to be noted that up to now, the vast majority of the published literature on inkjet printing for the deposition of organic and biological molecules has been focused on the piezoelectric technology,²⁴⁻²⁶ due to the high temperature (about 300 °C) reached inside the nozzles of thermal printers, which could induce a thermal stress on the ink, in turn damaging the biological and/or synthetic organic ink components.¹⁹ So, the piezoelectric technology is sometimes preferred because it applies no thermal load to the "ink".

In this study, a prototype of an inkjet printing amperometric glucose biosensor is proposed, aiming to evaluate the capacity of glucose oxidase to resist to the printing process, and the possibility of it to be immobilized on a screen printed carbon electrode.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Glucose oxidase (from *Aspergillus niger* 154U/mg, GOD: EC 1.1.3.4), monobasic sodium phosphate, dibasic sodium phosphate and glucose were obtained from Sigma-Aldrich. Carbon, silver and silver chloride inks were obtained from Acheson Industries.

2.2. Equipment

PGSTAT 20 Potentiostat/Galvanostat was purchased from Autolab. Stylus Photo R290 Inkjet Printer was obtained from Epson. PVA (Polyvinil Alcohol) sheets were purchased at local stores.

2.3. Methods

2.3.1. Electrodes fabrication:

A 2-electrodes system (called TIP) was designed as follows: The TIP was made with a PVA slide. On it, two tracks were screen printed (working and reference electrode) with a thickness of 1 millimeter (mm) and separated from each other by 1.2mm. Initially, each electrode received a first layer of silver, which would serve as support to a second one.

The tip was then taken to an oven at 60 ° C for 10 minutes to pre-dry the trails of silver. After removal from the oven, each of the electrodes of the TIP, the only 7 millimeters (mm) end, received a second layer over the first being: Reference electrode Layer Silver chloride (AgCl) electrode and work Layer Carbon (C). After

applied the 2nd layer, the tip is brought into the oven at 60 ° C for 30 minutes, for final drying. The resistance per mm² was no greater than 5 ohms between the probes.

2.3.2. Glucose Oxidase solution preparation

An aliquot of Glucose oxidase was dissolved in Phosphate buffer 0,02M pH 7,4 to a final concentration of 1mg/mL. Afterwards 5 mL of the so-obtained solution were filtered in a 0,22µm cellulose acetate membrane and immediately put into an empty cartridge and allocated in the printer device.

2.3.3. Glucose Oxidase activity

In the presented study the activity of Glucose Oxidase was evaluated. The dilution was done in the same buffer (PBS) at pH 7.4, The kinetics behavior was found by the method of ortho-dianisidine, with GOD (0,034mg/mL) under a Glucose concentration of 0,17mg/dL.

2.3.4. Printing the biological solution

For the printing process, an Epson Stylus Photo Inkjet printer was adapted to receive a similar inkjet cartridge filled with a so-prepared glucose oxidase solution. Before of that, the printer device had to be disassembled to have its print-head pores size analyzed, aiming to avoid a possible clogging during the ejection of the enzyme ink (GOD solution). For that, a Scanning Electron Microscopy was realized on the print-head surface (Figure 1).

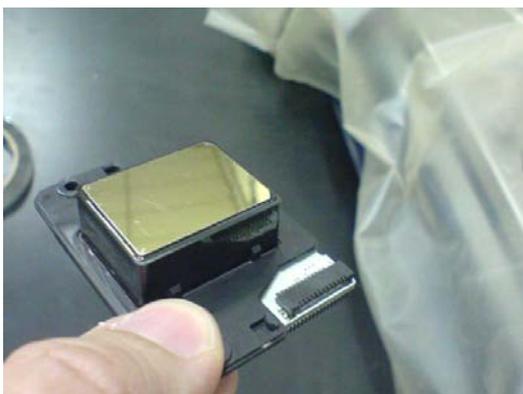


Fig. 1: Epson Stylus Photo Printhead.

Studies positioning the print head, carriage speed printer, cleaning system, resistance to heat and reproducibility of printing were made (data not shown). The positioning of the printhead were analysed in a series of tests on plain paper, photo, transparency, water resist paper, printable DVD, PVA and acrylic. The calculation of the head positioning gun was done via software, so that the biological material ejected was deposited on the carbon electrode, freshly prepared by screen printing, without contaminating the reference electrode positioned 1.2 mm laterally. Figure 2 illustrates the inkjet printing process.

For a homogeneous layer of the enzyme solution, the printing process was repeated 10 times at the same position on the carbon electrode. Before being put into the cell, the TIP was left at room temperature for 5 minutes to dry.

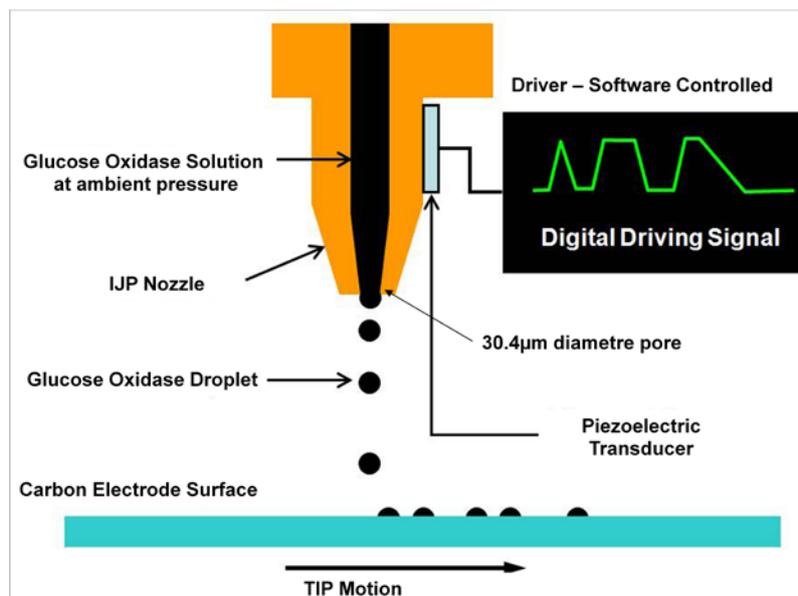


Figure 2 Scheme of inkjet printing. 1mg/mL Glucose Oxidase solution was printed on a carbon electrode surface, as shown.

2.3.5. Resistivity test

Before the test procedures, the resistivity of each electrode was checked. The average values of resistance were $0.4 \Omega/\text{cm}^2$, which is considered acceptable for the testing procedures.

2.3.6. Electrochemical measurements

The cyclic voltammetry was performed using a PGSTAT 20 Potentiostat, in a 3 mL cell containing 1mL of glucose in different concentrations (100, 217, 307, 379, 437, 485mg/dL), with the potential varying from -0,8 to 0,8V, in a scan rate= 50mV/s. The tests were made by placing the TIP with 2 electrodes (Working and Reference) in the cell containing 1,0mL of Phosphate buffer at pH 7.2. Seven tests (numbered from 1st to 7th) were performed, with glucose concentrations of 0mg/dL, 100mg/dL, 217mg/dL,

307mg/dL, 379mg/dL, 437mg/dL, 485mg/dL, respectively. The data was exported to a graphics software.

3. Results

3.1. Scanning Electron Microscopy

The analysis of the print-head shows the size and uniformity of the nozzles (Figure 3). The diameter of each nozzle was electronically determined and was found to be of approximately 30 μ m. It was very important in order to decide what kind of cellulose acetate membrane would be used to filter the glucose oxidase solution before filling it into the empty cartridges.

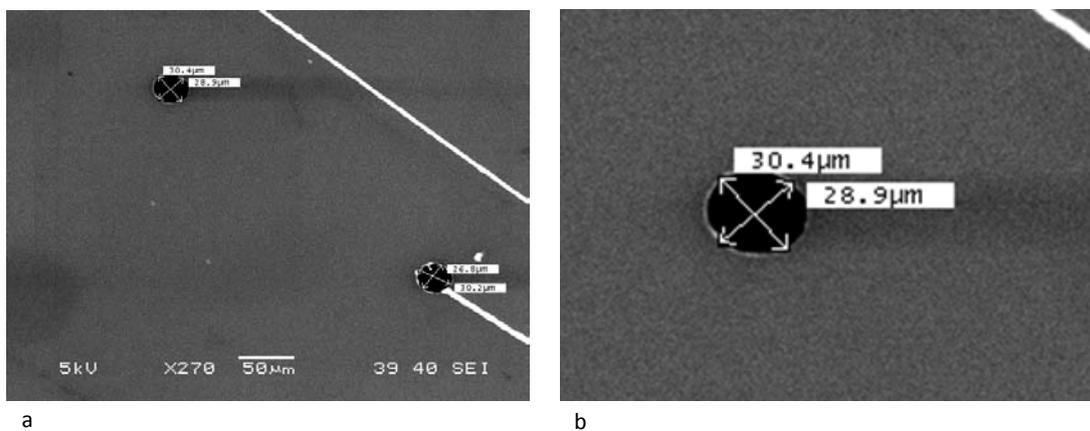


Figure 3: (a) Scanning Electron Microscopy of an Epson R290 Inkjet Printer (270x). (b) Amplificação em região de (a) via software para melhor visualização.

3.2. Glucose Oxidase activity

The results in figure 4 show the kinetics of Glucose Oxidase (0,34mg/mL) in a Glucose concentration of 0,17mg/mL.

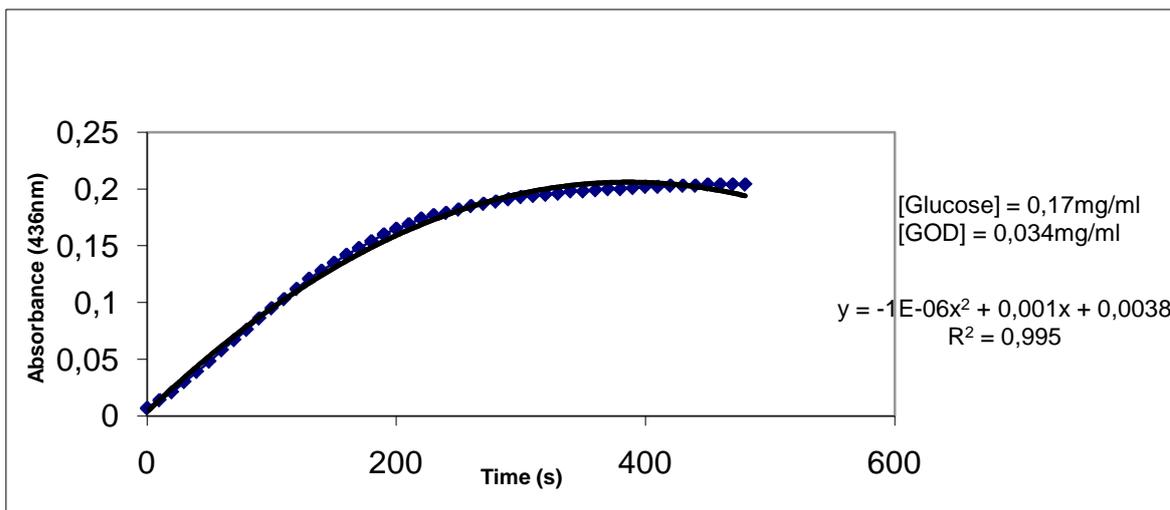


Figure 4: Kinetics study of glucose oxidase (0.034mg/mL) under glucose solution (0.17mg mL⁻¹).

3.2. Printing the biological solution

To the development of redox enzymes based biosensors, the maintenance of enzyme activity is essential. Because of that, a piezoelectric printer was chosen. Since it uses crystal vibrations (not high temperatures), the possibility of enzyme denaturing is very low, although Setti⁴ have got success by this methodology.

The results showed that the GOD activity was not lost, indicating that the printing process was not harmful to the enzyme.

3.3. Electrochemical behavior

The results showed a consistent response of current with the increasing concentrations of glucose (Figure 5). The presence of anodic current peaks from the 2nd to 7th scans, at the potential of 0.7V, indicates the Glucose oxidase was acting face to the presence of glucose, what is not observed in scan 1 (no glucose). The results obtained here demonstrate the feasibility of this new method of deposition of

biological material on solid matrix to a fast, cheaper and automated biosensor fabrication.

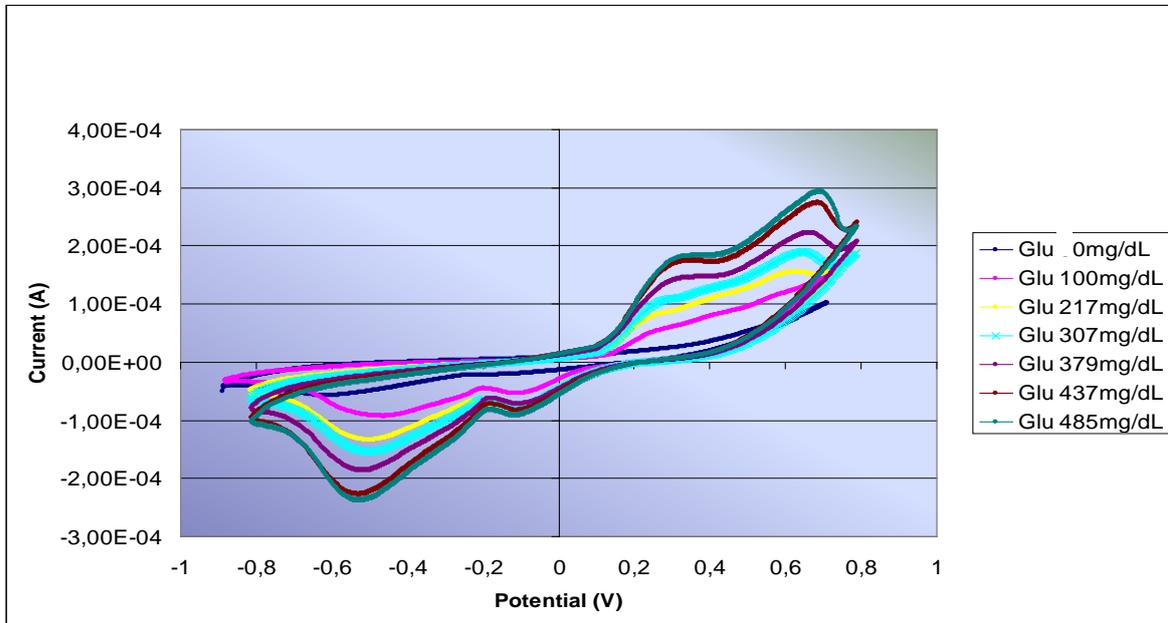


Figure 5: Cyclic voltammetry of GOD inkjet printed on a carbon electrode surface under different glucose concentrations. Scan rate=50mVs⁻¹

4. Conclusions

By the study, it could be observed a uniformity in nozzles sizes of the print-head. A diameter size around 30 μ m was sufficient to the GOD solution to pass. The voltammetry study showed a linear relation between the concentration of glucose and the peak of current found. The preliminary results of this prototype propose an initial feasibility on studying and developing inkjet printing experiments to eject GOD solution on screen-printed matrices.

5. References

1. Cosson, E. and E. Hamo-Tchatchouang. 2009. Multicentre, randomised, controlled study of the impact of continuous sub-cutaneous glucose monitoring (GlucoDay®) on glycaemic control in type 1 and type 2 diabetes patients. **Diabetes & Metabolism** 35(4): 312-318.
2. Crouch, E. and D. C. Cowell. 2005. A novel, disposable, screen-printed amperometric biosensor for glucose in serum fabricated using a water-based carbon ink. **Biosensors and Bioelectronics** 21(5): 712-718.
3. Wang, J. 2008. Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications. **Academic Press Inc.**
4. Clark, L. C., Jr. and Lyons, C. 1962. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. NY Acad. Sci.** 102: 29–45.
5. Wang, J. 2006. Analytical Electrochemistry. Third Edition. **Wiley-VCH.**
6. D.R. Matthews, E. Bown, A. Watson, R.R. Holman, J. Steemson, S. Hughs and D. Scott. 1987. Pen-sized digital 30-s blood glucose meter, **Lancet** 18536: 778–779.
7. A.L. Hart and A.P.F. Turner. 1996. The use of screen- and inkjet printing to produce amperometric enzyme electrodes for lactate, **Biosens. Bioelectron.** 11 (3): 263–270.
8. A.L. Hart; C. Matthews and W.A. Collier. 1999. Estimation of lactate in meat extracts by screen-printed sensors. **Anal. Chim. Acta.** 386 (1–2): 7–12.
9. Zheng, Q. and J. Lu. 2011. Application of inkjet printing technique for biological material delivery and antimicrobial assays. **Analytical Biochemistry** 410(2): 171-176.

10. R. Mills. 1996. Ink jet printing: past, present and future. In: Rezanka and Eschbach, Editors, **IS&T: Recent Progress in Ink Jet Technologies**, IS&T: 12-15. Springfield, VA.
11. R.W. Kenyon. 1996. Chemistry and Technology of Printing and Imaging System. **Blackie Academic & Professional**, Glasgow.
12. H.P. Le. 1998. Progress and trends in ink-jet printing technology. **J. Imaging Sci. Technol.** 42 (1): 49–62.
13. C. Ping-Hei; C. Wen-Cheng and S.H. Chang. 1997. Bubble growth and ink ejection process of a thermal-bubble-jet printhead. **Int. J. Mech. Sci.** 39 (6): 683–695.
14. J.D. Newmann, A.P.F.; Turner and G. Marrazza. 1992. Inkjet printing for the fabrication of amperometric glucose biosensors. **Anal. Chim. Acta.** 262: 13–17.
15. T. Petridou Xu; E.H. Lee; E.A. Roth; N.R. Vyavahare; J.J. Hickman and T. Boland. 2004. Construction of high-density bacterial colony arrays and patterns by the inkjet method. **Biotechnol. Bioeng.** 85 (1): 29–33.
16. L.R. Allain; M. Askari; D.L. Stokes and T. Vo-Dinh. 2001. Microarray sampling-platform fabrication using bubble-jet technology for a biochip system. **Fresenius J. Anal. Chem.** 371 (2): 146–150.
17. M. Schena; R.A. Heller; T.P. Theriault; K. Konrad; E. Lachenmeier and R.W. Davis. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. **Trend Biotechnol.** 16 (7): 301–306.
18. A.P. Blanchard; R.J. Kaiser and L.E. Hood. 1996. High-density oligonucleotide arrays. **Biosens. Bioelectron.** 11 (6/7): 687–690.

19. Setti, L. and A. Fraleoni-Morgera. 2005. "An amperometric glucose biosensor prototype fabricated by thermal inkjet printing." **Biosensors and Bioelectronics** 20(10): 2019-2026.
20. Roda, A.; Guardigli, M.; Russo, C.; Pasini, P. and Baraldini, M. 2000. Protein microdeposition using a conventional inkjet printer. **Biotechnology**. 28: 492–496.
21. Sherwood, J.K.; Riley, S.L.; Palazzolo, R.; Brown, S.C.; Monkhouse, D.C.; Coates, M.; Griffith, L.G.; Landeen, L.K. and Ratcliffe, A.. 2002. A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. **Biomaterials** 23 (24): 4739–4751.
22. Park, A.; Wu, B. and Griffith, L.G. 1998. Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(l-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion. **J. Biomater. Sci. Polym.** Ed. 9 (2): 89–110.
23. E.A. Roth; T. Xu; M. Das; C. Gregory; J.J. Hickman and T. Boland, Inkjet printing for high-throughput cell patterning. **Biomaterials** 25: 3707–3715.
24. H. Sirringhaus; T. Kawase; R.H. Friend; T. Shimoda; M. Inbasekaran; W. Wu and E.P. Woo. 2000. High-resolution inkjet printing of all-polymer transistor circuits, **Science**. 290: 2123.
25. T. Kawase; H. Sirringhaus; R.H. Friend and T. Shimoda. 2001. Inkjet printed via-hole interconnections and resistors for all-polymer transistor circuits. **Adv. Mater.** 13: 1601.
26. B. Chen; T. Cui; Y. Liu and K. Varshney. 2003. All-polymer RC filters fabricated by all-inkjet printing technique. **Solid State Electron.** 47: 841.

ARTIGO CIENTÍFICO II

Development of an ITO specific prototype device and its application for the detection of ss and dsDNA sequences

Lima, R.M.M.^{1,2}, Carneiro, M.C.^{2,3}, Nascimento, G.A.^{1,2}, Virgínia, E.^{1,2}, Santos, D.^{1,2},

Lima-Filho, J.L.^{1,2,3}

1- Molecular Prospection and Bioinformatics Group (ProspecMol, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego S/N Cidade Universitaria, Recife, PE- Brazil ; 2- Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego S/N Cidade Universitaria, Recife, PE- Brazil; 3- Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego S/N Cidade Universitaria, Recife, PE- Brazil)

Abstract

Among other techniques electrochemical methods have been recently emerged as attractive due to their simplicity, low cost, possibility for real time measurements and generally high sensitivity. In this work an ITO-glass specific prototype device was developed for the detection of specific DNA sequences transduced by Differential Pulse Voltammetry. The working electrodes were made by the immobilization of DNA sequences on a NaOH- APTES modified ITO electrode. The results demonstrated an increase in the anodic current value (0,73 μ A) when the DNA sequence was present on the electrode, differing from the bare electrode found current. The results also showed that, after specific hybridization of the so-immobilized DNA with its complementary sequence, the anodic current decreased, indicating that the hybridization process occurred at the electrode surface. The sequence used for the hybridization was a specific region from BPV, containing 27 bases. The reported findings indicate that ITO electrode could be a viable instrument of easy construction of DNA biosensors being an effective indicator of hybridization signals.

Keywords: Indium Tin Oxide (ITO), Biosensor, Electrochemical Cell, APTES

Resumo

Entre outras técnicas, os métodos eletroquímicos têm emergido recentemente como sendo atrativos devido à sua simplicidade, baixo custo, possibilidade de medição em tempo real e, geralmente, apresentarem alta sensibilidade. Neste trabalho, um protótipo dispositivo específico para lâminas de ITO foi desenvolvido para a detecção de seqüências específicas de DNA transduzidas por Voltametria de Pulso Diferencial. Os eletrodos de trabalho foram feitos pela imobilização de seqüências de DNA em um eletrodo de ITO modificado com NaOH e APTES. Os resultados demonstraram um aumento do valor corrente anódica ($0,73 \mu\text{A}$) quando a seqüência de DNA estava presente no eletrodo, diferindo da corrente encontrada nos eletrodos sem a seqüência imobilizada. Os resultados também mostraram que após a hibridização específica do DNA imobilizada com uma seqüência complementar, a corrente anódica diminuiu, indicando que o processo de hibridização ocorreu na superfície do eletrodo. A seqüência utilizada para a hibridização foi uma região específica do vírus BPV, contendo 27 bases. Os achados indicam que o eletrodo de ITO pode ser um instrumento viável e de fácil construção de biossensores de DNA, sendo um indicador eficaz dos sinais de hibridação.

Palavras-chave: óxido de índio-estanho (ITO), biossensor, célula eletroquímica, APTES

1. Introduction

The amperometric biosensors have been described as an attractive technique for the development of new diagnostic methods due to its simplicity, low cost of instrumentation, capacity of being realized in real time, high sensitivity and possibility of miniaturization.¹ The evolution from the use of leaky mercury electrodes to the use of solid electrodes extended significantly the scope of the electrochemical methods for analysis of nucleic acids. Indium tin oxide (ITO) is a known electrode material acting as an optically transparent electrode,² which has been extensively used in spectroelectrochemistry, because of its optical characteristics and potential applications.³ Moreover, ITO has many attractive attributes, including a wide potential window and high stability in physical and electrochemical properties,⁴ showing even lower roughness and homogeneous surface compared to glassy carbon electrodes or those ones made by screen-printing. There are several methods of using ITO, that may be presented, for example, as immobilized on glass slides or sheets of PET (Polyethylene terephthalate) (Sigma-Aldrich). The ideal choice of format will depend on the application the experiment requires. Xu used PET sheet coated with ITO to construct an electrode with immobilized DNA on its surface.⁵ In turn, Ballarin made use of glass slides (9mm x 27mm), coated with ITO film, for the printing of PEDOT in an area of 16mm x 9mm, thereby building their working electrode for further analysis of the conjugated electrochemical behavior of the and characterization of the obtained film.⁶ The use of PET sheets added of ITO films has some advantages, such as high flexibility and small thickness.⁷ However the surface impedance does not reach values as small as on glass slides (Sigma-aldrich). In addition, sometimes the stiffness of the

surface where the ITO is immobilized may be needed for the experiment, in which case the glass slide would be the best choice. It is known, however, that in the electrochemical analysis, one of the main parameters for monitoring the performance of voltammetric measurements is the control of the area of the electrode that is in contact with solution.² Thus the maintenance of it is of paramount importance for the results reproducibility. When choosing the glass slides, defining the area of the electrode to be used is not as simple as in the case of PET sheets, as these ones can be easily cut in the laboratory. The cutting of glass slides is often not indicated because of the possibility of damaging the ITO film to be cut, and the difficulty in the maintenance/reproduction of the working electrodes area size. The choice is often opt for buying smaller ITO-glass slides, close to the desired size, but still a little big to make possible that a region of usage can be chosen as the working electrode itself, as one of the edges of it can function as the electrical contact to the electronic system, which can increase the final cost of the electrode. Considering these difficulties, a support system was designed to be specially applied to ITO-glass slides. The apparatus, named "Sensor Holder", makes possible the distinguishing up to 8 individual working electrodes, using a single standard-size (75x25x1,1mm) ITO-glass slide, functioning as a support and a three electrodes electrochemical cell.

There are many employment opportunities for DNA modified electrodes, like the determination of carcinogen species and drugs.⁸ However such biosensors have been developed for the analysis and determination of nucleotide sequences in order to diagnose diseases such as the caused by hepatitis B virus⁹, dengue virus¹⁰ and human papillomavirus (HPV).¹¹ Many studies were already made to determine an ideal

method of immobilization and hybridization of DNA on solid electrodes, and some have appeared.¹²⁻¹⁴ Wang immobilized DNA on the surface of a carbon paste electrode using controlled electric potential application.¹⁵ Another example is the covalent coupling method (an indirect covalent attachment of DNA to the electrode surface). Herme *et al* attached fragments of DNA modified with a mercapto group by using a DNA synthesizer and, then, they immobilized DNA on a gold electrode surface through self-assembly of modified DNA with mercapto and considered this an excellent method for DNA immobilization on solid surfaces, with good bioaffinity and high power of DNA hybridization.¹⁶ This method, however, presents a low percentage of concentration on the surface of the covalent coupling. Thus, the preparation of mercapto-modified DNA electrodes by self-assembly becomes inconvenient because of the mercapto DNA-containing low yield, so this method becomes time consuming and expensive. Thus, face to these techniques, adsorption appears as a simpler and more efficient process to obtain high concentration of DNA immobilized on the electrode surface, using only small amounts of samples, besides being an easy to do, and cheap method. However, it is known that several factors, such as type of surface, structure of electrochemical cell and method of immobilization is directly related to the amplitude of the produced signal by a given immobilized redox analyte.²

On DNA electrodes, mechanisms of immobilization and hybridization can be applied and analyzed by three main ways:¹⁷ The first one occurs when a modified electrode is immersed in a solution containing native or denatured DNA, and it is linked to be adsorbed to the electrode. At the same time, the voltammetry is performed, being possible to evaluate differences in time of adsorption between ssDNA and

dsDNA, as well as its peak amplitude and saturation. It is known, however, that native DNA molecules have more difficulty in adsorption to the electrode surface than the denatured (ssDNA), as already showed by Brabec.¹⁷ This is due to the rigidity of the molecule caused by hydrogen bonds links between the two strands, making difficult the adjustment to the electrode surface. A similar mechanism occurs when comparing long strings of DNA to smaller denatured ssDNA oligos. Even without the hydrogen bonds, the extensive structure of DNA itself makes it not to be closely connected to the electrode. The mechanism is illustrated in figure 1.

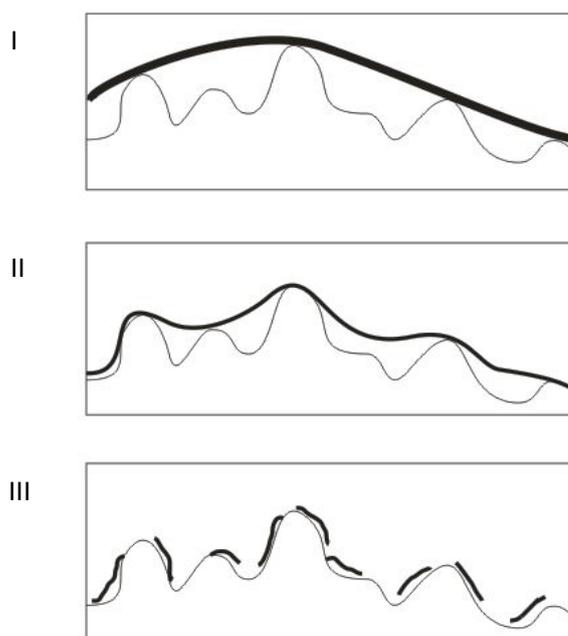


Figure 1: Adsorption of DNA on the surface of carbon electrodes (more porous). In I, native dsDNA, II, single-stranded ssDNA and III, single-stranded DNA oligos. [Based on Ref. 17]

The second form is accomplished by immobilizing a nucleotide sequence at the electrode surface. The voltammetry is performed in an electrolyte solution containing

pairable and not pairable target sequences to the treated electrode. In such cases, the voltammetry procedure is also performed with the denatured DNA in solution.

The third way to carry out studies, and what was used in this work, is when the immobilization and hybridization are performed before voltammetric analysis. Thus higher concentrations of DNA in small aliquots are applied, without loss of solution (nucleotides).

This paper proposes a prototype of a direct method of detecting nucleotide sequences using APTES silanized ITO-glass electrode slides, and performing the voltammetric analysis in a so-developed electrochemical mini-cell (Sensor Holder) as already mentioned.

2. Materials and methods

The ITO-glass slides (Indium Tin Oxide - $12\Omega/\text{m}^2$, 75x25x1mm) were obtained from Sigma-Aldrich Brazil and were used as received. Ultra-pure water DNase / RNase Free was obtained from Gibco / Invitrogen - Brazil. APTES (3-amino-propyltriethoxysilane) was obtained from Sigma-Aldrich Brazil. The auxiliary electrode (platinum wire) was purchased at local stores. Silver and Silver Chloride inks were obtained from Achenson Industries - Ontario, Canada. Cyclic Voltammetry and Differential Pulse Voltammetry analysis were performed on a PGSTAT 100 potentiostat (Metrohm / Autolab – The Netherlands). All other reagents and materials were of analytical grade.

Electrodes manufacture

For the working electrodes, glass slides coated with ITO were used. The slides were initially washed with deionized water and dried at room temperature (22 ° C) until further use. Reference electrodes (Ag / AgCl) were prepared by covering pin drivers [20mm x 1mm (id) gold-plated] firstly with a silver ink layer by dip coating. The pins were placed in an incubator at 50°C for 30 min. After their removal, they were painted again by dip coating with a layer of Silver Chloride and put back in incubator (50°C) for another 30 minutes for final drying. The conductivity of each batch of four pins was checked individually with the use of a digital multimeter. Values of electrical resistance above 6.0 Ω / 20mm were considered as the cutoff. The pins that had flaws in the paint layer of Ag / AgCl were discarded. A high strength platinum wire was used as the auxiliary electrode.

Sensor-Holder

For the use during the electrochemical processes, a support for the ITO-glass slides (the Sensor Holder) was designed and constructed. The apparatus was developed to function as a base for the ITO slides and as an incorporated electrochemical mini-cell. Moreover it was designed to prevent the cutting of the ITO-glass, which could lead to a lack of similarity along the slide with damage to the conductive film layer.

The Sensor Holder (Figure 2) was basically composed of two detachable complementary parts: the base support and the cell part. At the base (g) there is a flow equal to the thickness of the layer of ITO (e), where it fits. The cell part is composed of an acrylic plate with a central orifice (mini cell) (d). The cell part gets

stuck on the base by fitting and fixing screws (f), so the ITO-glass slide is positioned between the two parts. The orifice (mini cell) in the cell part can be positioned over any region of the ITO-glass, via manual adjustment in the horizontal and vertical axis.

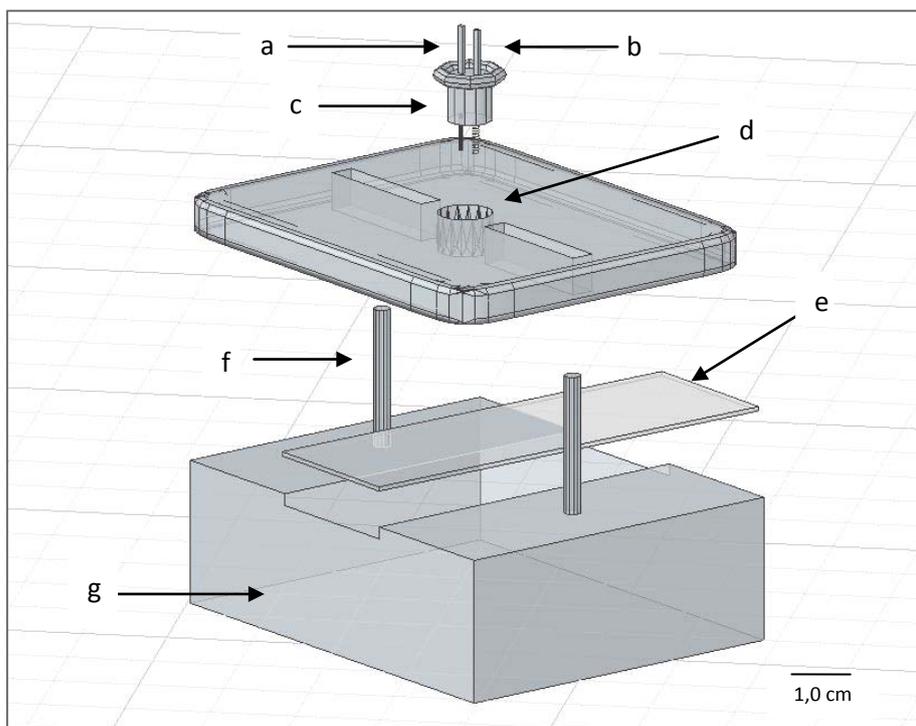


Figure 2: Scheme showing the apparatus with mini electrochemical cell (Sensor Holder). a) reference electrode, b) platinum auxiliary electrode, c) screw adjustment near the electrodes, d) mini electrochemical cell, e) working electrode (ITO-glass slide), f) screw, g) support base .

Thus, once mounted, an electrochemical mini cell is formed. And its bottom is a circular region of the ITO-glass slide, the working electrode. The mini cell (d) has a volumetric capacity of 400 μ L of solution. On an ITO-glass slide, 8 individual working electrodes can be delimited at a time (Figure 3).

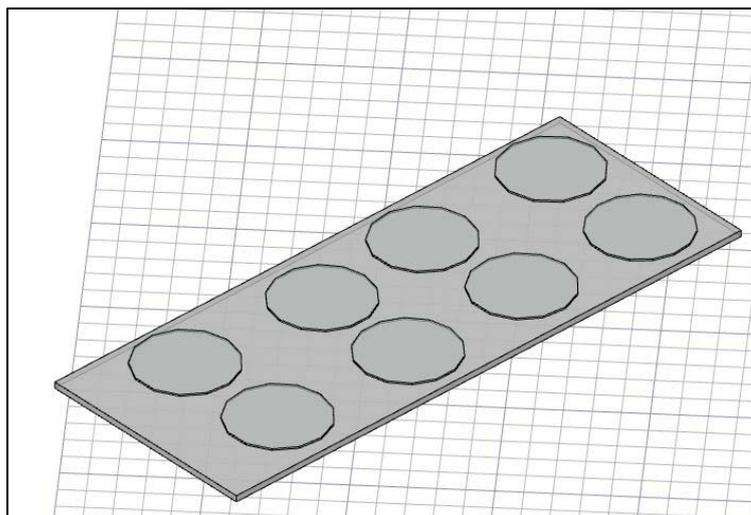


Figure 3: ITO-glass slides virtually divided into 8 individual parts. Each circular region will function as a working electrode to be used in the Sensor Holder.

To finish the description of the system, the Sensor Holder also has a screw adjustment and support (c) for 2 mini electrodes: reference (a) and auxiliary (b). This stand is fastened on the top of the cell (on it), thus the 2 electrodes remain inside the orifice, forming the electrochemical cell with three electrodes. In order to avoid inconsistencies in the results and to keep the analysis standard, the lateral distance between the electrodes is kept constant. This is possible because the holes brackets for both electrodes do not allow different settings, so that they always have the same distance apart. The distance between the auxiliary and reference electrodes from the working one (ITO) is also constant. The number of spinings when adjusting the auxiliary and reference electrodes is regulated always at the same position. However this position can be changed by the screw adjustment and support. The electrical contact to the electrodes can be done by connecting the wires of the potentiostat to the edges of a, b and e.

Modification of the working electrode (ITO)

In this experiment ITO-glass slides of low resistivity ($12\Omega/\text{m}^2$) were used as the working electrode as previously cited. Initially the slides were washed twice in 1% extran solution, rinsed in ultrapure water for 3 times (without intervals) in order to remove any impurities. Then the slides were placed in acetone for 20min, in 1% extran solution for 15min and rinsed in ultra pure water DNase, RNase free (Gibco). The electrodes were then treated with 5M NaOH for 5 hours, according to the literature.⁵ After that, they were rinsed in ultra pure water again. The slides were dried at 23 ° C and, subsequently, were covered, by dip coating, in aqueous solution of 0.2% APTES for 10 min. The slides were rinsed and left to dry at room temperature (22°C).

ssDNA immobilization

Some of the electrodes which were newly treated with APTES were then immersed for 5 minutes in acetate buffer solution, pH 5.0, 50mM, containing 1 μM of a sequence of 27 bases specific for the bovine papillomavirus (BPV Probe 5' - TGG AAA TTT TCT TTT GAA AGG TGG CTT - 3'). Thus, a DNA- modified ITO electrode was obtained.

Figure 4 shows the modification steps of the ITO electrode modified with APTES and ssDNA.

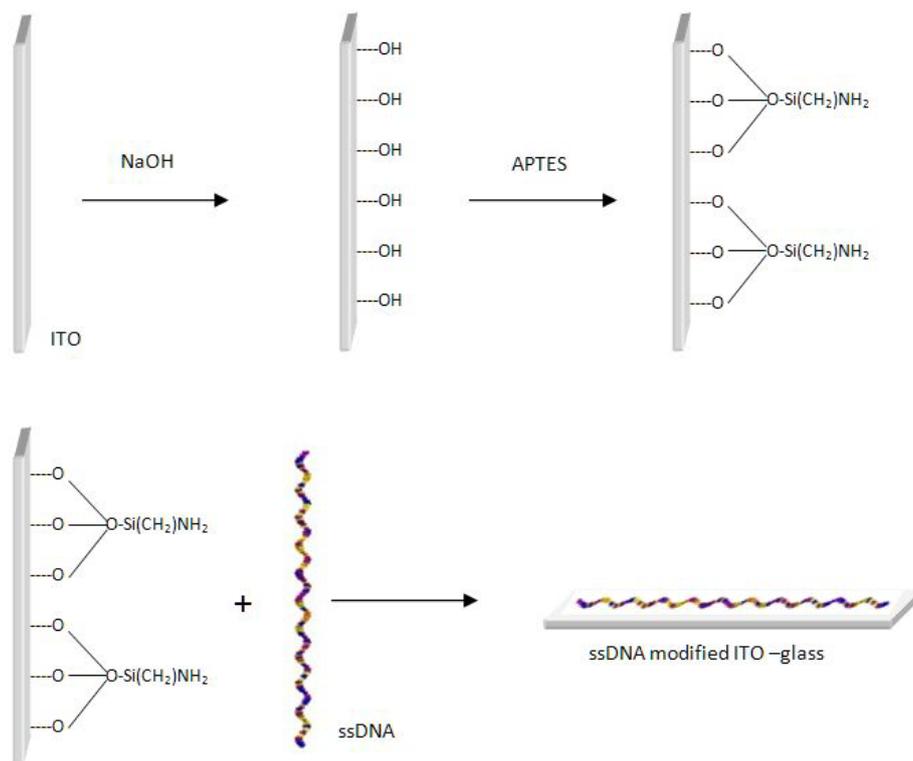


Figure 4: Stages of ITO slides modification with NaOH (5M), APTES (0.2%) and immobilization with ssDNA probes.

Hybridization

Once ready the modified working electrode with specific sequence of bases, the same could then be put in contact with a solution containing specific sequences complementary to the ones immobilized on the electrode. For that, a solution containing $1\mu\text{M}$ of complementary sequence was prepared in acetate buffer solution pH 5.0. The ITO-glass slide was covered with the hybridization solution for 10min at 56°C on a heating surface, without agitation.

Voltammetric analysis

In order to evaluate the voltammetric behavior of the species immobilized on the ITO electrode surface, individual tests of each described stage were made. Firstly, however, the stability of the so-developed mini electrochemical cell system (Sensor

Holder) was checked. After that, the adsorption of DNA on ITO slides was verified. Subsequently, the electrode was tested on its ability to distinguish between single-stranded DNA and hybridized (dsDNA):

Evaluation of the so-obtained ITO electrochemical cell (Sensor Holder)

In order to evaluate the characteristics of the system, an aliquot of 350µL of ferrocyanide solution (5mM in 0.5M KCl) was taken and added to the bucket of the Sensor Holder mini cell. A cyclic voltammetry between -0.2 and 0.8 V, 50mVs⁻¹ for 3 cycles at room temperature (22°C) was realized using a bare ITO-glass as the working electrode.

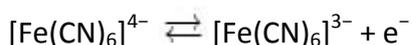
Differential Pulse Voltammetry of ssDNA and dsDNA ITO-modified electrode

ssDNA and dsDNA ITO electrodes were scanned by Differential Pulse Voltammetry from -0,2 to 1,2V at 50mV/s in Tris HCl buffer, pH 7.0, at 22°C. A region of ITO-glass was used as the working electrode. The reference (Ag/AgCl) and auxiliary (Platinum wire) electrodes were part of the already described Sensor Holder where the analysis took place.

3. Results and Discussion

Sensor Holder

Figure 5 shows the cyclic voltammogram of a bare ITO electrode under ferricyanide solution. Ferrocyanide is converted to ferricyanide with the loss of an electron, as follows:



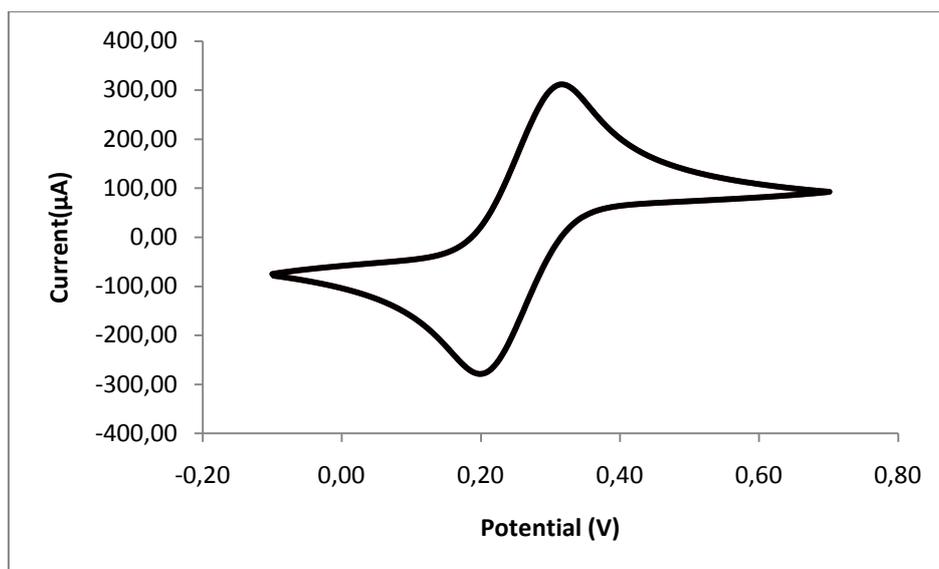
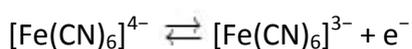


Figure 5: Cyclic voltammetry of ITO-glass electrode in a solution of 5 mM ferrocyanide in 0.5 M KCl involving transfer of an electron, for the test of the so-developed Sensor Holder system. Scan rate = 50mVs⁻¹. ITO vs. Ag / AgCl.

The voltammogram obtained in this test showed a high similarity to an ideal voltammogram for reversible systems. The values of the ratio I_{pc}/I_{pa} indicate that all the material of the reaction



was oxidized/reduced, and vice versa:

The values of $I_{pa} = 330.11$, $I_{pc} = 328.24$ makes the relation $I_{pc} / I_{pa} = 0.994$, extremely close to the desired 1. However ΔE_p ($E_{pa} - E_{pc} = 120\text{mV}$) was slightly above the ideal of 59mV, suggested by Cottrell equation. The high value of ΔE can be justified by the fact that the experiment was not performed at a temperature of 25 °, but at 22 ° C, which directly influences the electron transfer rate of the solution to the surface of the electrode and vice versa. Moreover, in order to avoid possible oxidation, both in the working electrode, as in the reference, the positioning of the reference and auxiliary electrodes against the working electrode was maintained at such a distance that would

protect them from high current flow. However, the Sensor Holder developed allows the controlled adjustment of that distance at any time. For real purpose one could consider the presented voltammogram as a quasi-reversible system, and not a reversible one, only by this fact.

The carried out cyclic voltammograms showed that the electrochemical cell (with the 3 electrodes) was still stable, even after 18 consecutive scans, that were divided into six scans every three cycles, as shown in figure 6.

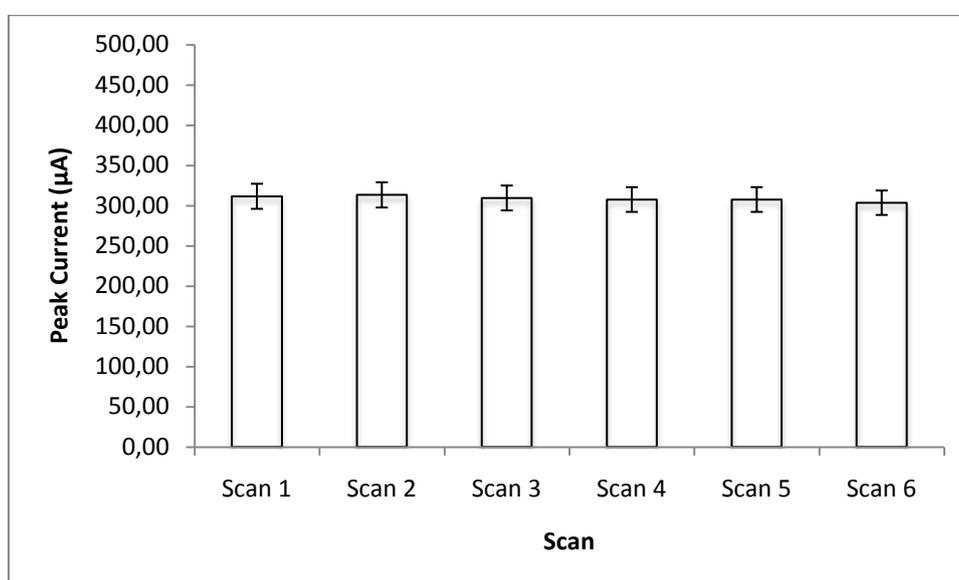


Figure 6: Analysis of peak current in a solution of 5 mM of ferrocyanide in 0.5 M KCl for 6 repetition with 3 cycles each. 50mV / s. ITO vs. Ag / AgCl.

The maintenance of peak current values could be observed along the 6 different scans, suggesting a high stability of the electrochemical cell at the applied conditions.

Once the initial verification of the Sensor Holder was finished, its use could be applied for tests with nucleotide sequences.

Modification of the working electrode (ITO)

By treating the surface of the electrode with NaOH, as already mentioned, it acquired a negative charge from OH groups on the electrode surface. After the electrode is placed in APTES solution, covalent interactions occur between the hydroxyl groups and free portions of the APTES, favoring the silanization O-Si-O and maintaining external NH₂ groups, inducing in a positive charge to the electrode surface.¹⁸ Thus, molecules of single-stranded DNA of opposite charge are likely to be adsorbed to the surface of ITO. The graph in Figure 7 shows the voltammogram of the ITO slide after silanization with APTES.

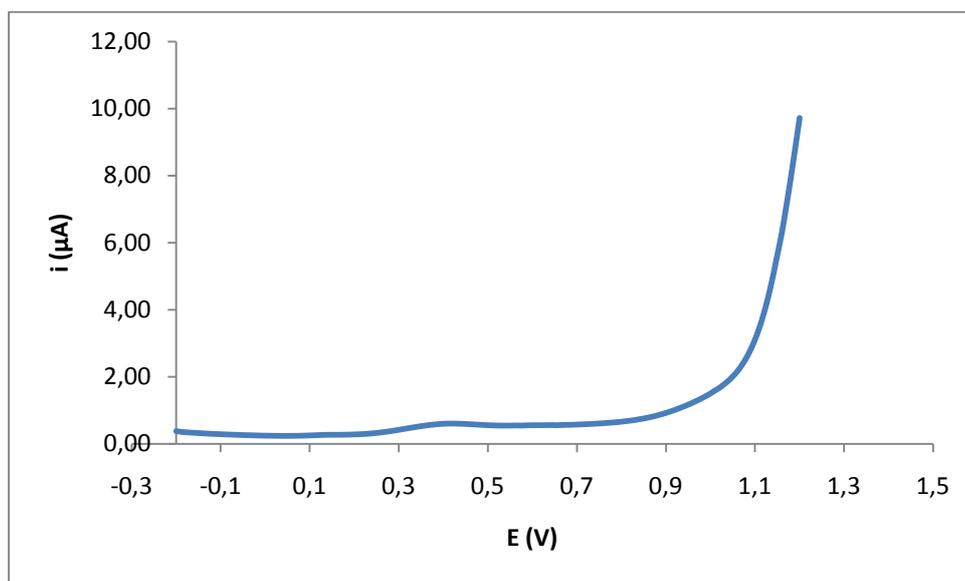


Figure 7: Differential pulse voltammetry of APTES modified ITO electrode vs Ag / AgCl . TrisHCL 20mM buffer, pH 7.0, T = 22 ° C, Scan rate = 50mVs⁻¹

The differential pulse voltammetry was chosen for being a technique, as well as quantitative, qualitative, in the discrimination of different species contained in a same reaction medium, either immobilized or in solution.² The study was done in layers of

NaOH (5M) and 0.2% APTES modified ITO electrode for 5 min. The initial treatment of ITO slide with 5 M NaOH allowed connection with the molecule of APTES (0.2%) leaving the cluster of positively charged NH_2 on the electronegative ITO surface (Figure 4), which is already described in literature as the best condition for the silanization of ITO slides with this compound.⁵ When applying a potential sweep on the working electrode, peaks of anodic current appear at $E = 0.45$ V, which is probably related to the NH_2 portion on the ITO surface (Figure 7). It is noticed also that there is no peak current characteristic for the electrode without DNA in the range between $E = 0.7$ and 1.0 V, enabling the study of purine bases in this range, since the oxidation of guanine residues occurs in approximately $E_p = 0.88$ V, and Adenine just over 1 volt (1.18 V).

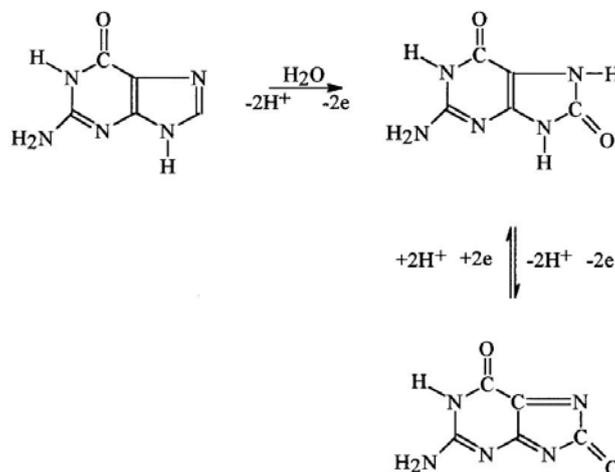


Figure 8: Mechanism of the oxidation of guanine.⁴

Therefore, the study of the oxidation of guanine was chosen. Because its low standard potential (E_p), it was not necessary to apply greater value of E , which could undermine the ITO slide.

A solution containing 1 μ M of a nucleotide sequence of bovine papilloma virus (BPV Probe 5' - TGG AAA TTT TCT TTT GAA AGG TGG CT T - 3') was immobilized on the silanized surface of the electrode, and the voltammograms were plotted on the same voltammogram performed for the ITO without DNA, as already mentioned. The mechanism of guanine oxidation is an irreversible process in its early stages, and it involves the transfer of two electrons, as shown in Figure 8, being essential for the reaction rate. So the potential scan was configured to generate pulses of a potential of 50mV, what privileges analysis for redox systems involving a pair of electrons.²

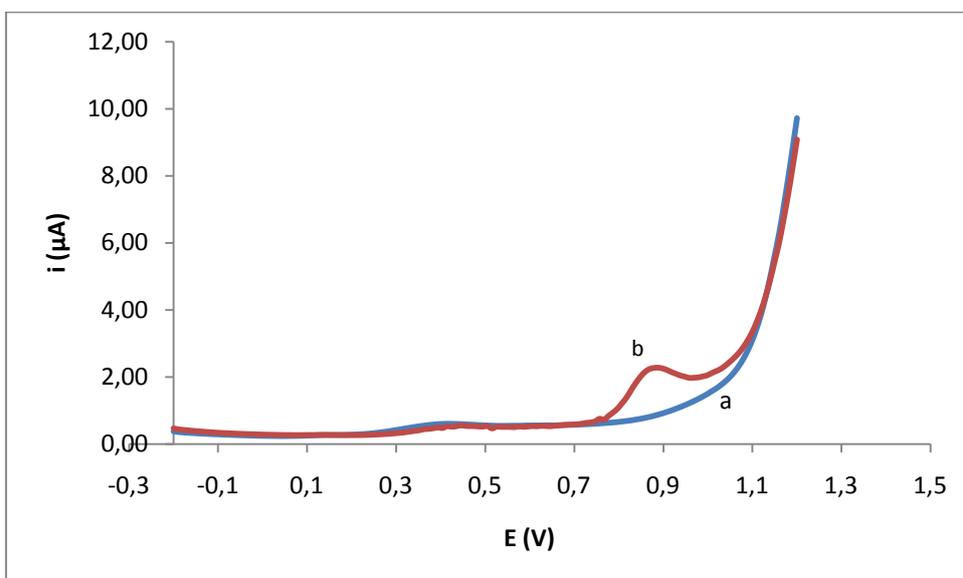


Figure 9: The differential pulse voltammetry of ITO electrode modified with APTES vs Ag / AgCl. a) no DNA, b) after adsorption with a sequence of 27 bases probe (1 μ M). TrisHCL 20mM buffer, pH 7.0, T = 22° C, Scan rate = 50mVs⁻¹.

Figure 9 shows in the voltammogram the presence of a peak current in the range between E = 0.79 V and E = 0.96, which represents the potential range of the standard potential of guanine residues, where the transfer of electrons between it and the

surface of ITO occurs, indicating that DNA was adsorbed onto the electrode. This relationship between unmodified and modified with DNA ITO was observed in 18 successive voltammograms under the same experimental conditions. Thus, by this way, it was possible to perform the hybridization tests for comparison purposes.

ssDNA immobilization

In this experiment, the application of probes relatively small in size (27 bases) and the use of ITO facilitated the adsorption of DNA to the more homogeneous and flat surface of such electrode, favoring the transfer of electrons involved in the oxidation of guanine to the working electrode surface, what could be harmed if a more irregular electrode surface (like a carbon one) was used (Figure 10).

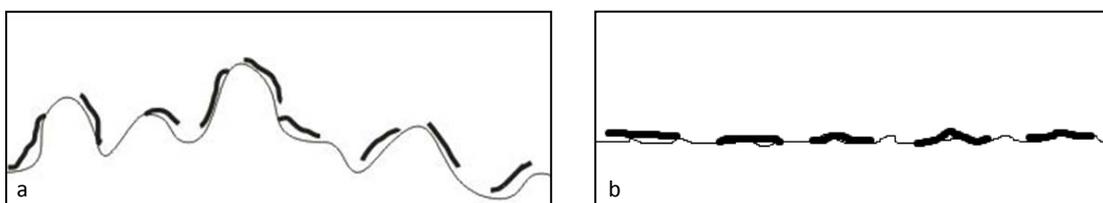


Figure 10: Adsorption of single-stranded DNA oligos on carbon electrodes (more porous) (a) and on ITO-glass electrode surface (b).

Hybridization

The differential pulse voltammetry technique allows one to obtain extremely small amounts of current, in the order of nanoamperes, since the occurrence of capacitive current peaks are compensated because of the stair form applied potentials (since a digital potentiostat was used).² Thus, after the hybridization of the complementary sequence to the immobilized ssDNA on the APTES silanized

ITO electrode, a new voltammetric analysis was performed in order to investigate the voltammetric behavior of dsDNA (Figure. 11c). The voltammograms were plotted together to others for the ITO electrode without DNA (Figure. 11a) and with ssDNA (Fig. 11b), respectively.

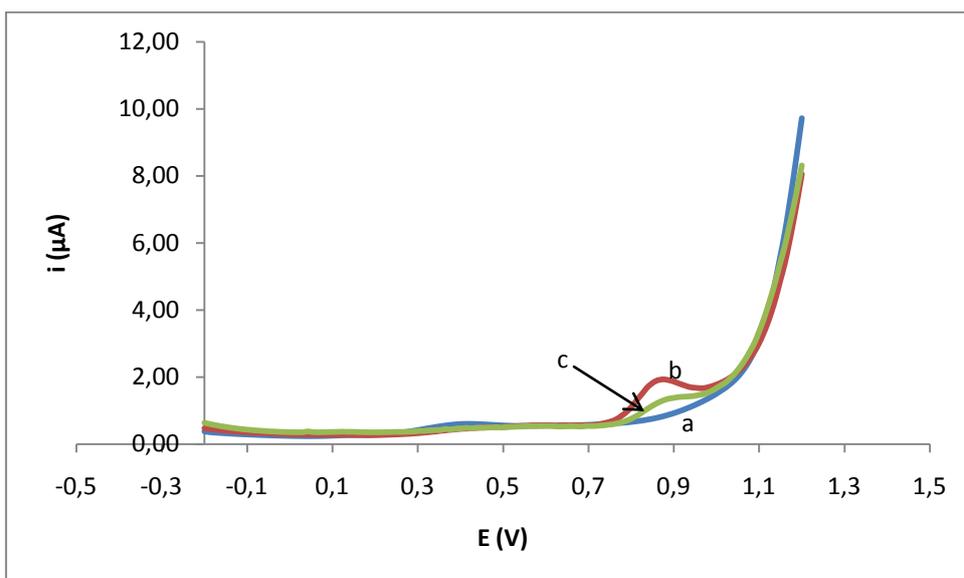


Figure 11: Differential pulse voltammetry of ITO electrode under the conditions a) without DNA, b) with immobilized ssDNA, c) after hybridization with complementary sequence (dsDNA) in TrisHCL buffer 20mM, pH 7.0, T = 22 ° C , Scan rate = 50mVs⁻¹

The approach with simplicity, reproducibility and accuracy was used to adsorb and hold a DNA molecule on the surface of mica and silanized glass.^{19,20} Xu was able to adsorb molecules of DNA on a silanized ITO surface.⁵ The hybridization signals were obtained by indirect method, using $[\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}]$ as electrochemical indicator. Similarly, Mandong detected nucleotide sequences specific for the hepatitis B virus by the indirect method, using methylene blue as a redox indicator, in a carbon paste electrode modified with chitosan.⁹ Also, using chitosan and a carbon electrode, Teles

performed experiments to detect specific sequences for the dengue virus, and since the redox signals produced by DNA are generally of low expressiveness, the author made use of ferrocene as the electrochemical indicator of the hybridization process, and obtained good results.¹⁰

Thus, it is seen that one of the difficulties reported in the study of DNA sensors is the low amplitude of the peak current generated in direct analysis. In this sense, the use of electrochemical mediators, or indirect methods is common to circumvent such problem.^{9,10} However, when making use of the so-modified ITO working electrode, due to the fact that it has a high potential window, the DNA is immobilized on a flat surface, and because of the control of the distance between the electrodes, the flow of electrons generated from the oxidation of guanine residues in DNA molecule can be directly detected and without the use of any electrochemical mediators. Thus a direct analysis of the electrochemical behavior of immobilized DNA sequence could be done. To better characterize the peak current generated in the three different cases, a baseline correction between 0.6 V and 1.2 V, was performed as shown in Figure 12.

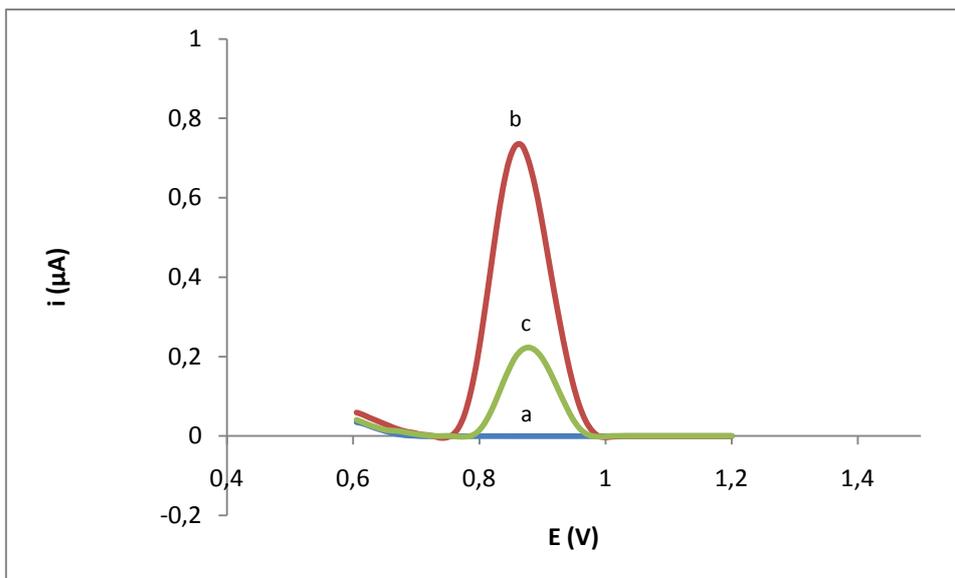


Figure 12: Baseline corection for the determination of I_{pa} in DNA-modified ITO electrode vs Ag / AgCl: a) without DNA, b) with ssDNA, $I_{pa} = 0.73 \mu A$, c) after hiobridization with complementary sequence (dsDNA) : $I_{pa} = 0,19 \mu A$. TrisHCL 20mM buffer, pH 7.0, T = 22 ° C, Scan rate = $50mVs^{-1}$

Thus, a current peak $I_{pa} = 0.73\mu A$ at $E_p = 0.85V$ was obtained. This is the characteristic oxidation potential of guanine, and the flow of electrons between it and the working electrode can be captured by the auxiliary electrode at this potential. These results differ slightly from the potential of $E_p = 0.87 V$ found by Brett²¹ in acid medium (pH 4, 5). This is surely explained by the fact that more alkaline pH values shift I_{pa} position negatively along the potential axis (E). As in this experiment, a pH of 7.0 was used, a shift of I_{pa} to the left direction occurred.

After the hybridization process, the peak current (I_{pa}) drops dramatically to a value almost four times smaller, of about $0.19 \mu A$, making clear the distinction between ssDNA and dsDNA. The low value of I_{pa} in the case of hybridized dsDNA is mainly explained by the difficulty of electron transfer between guanine and the surface of ITO.¹⁷ Even with more guanines on the electrode surface after the hybridization

process, the decrease in peak currents are mainly due to the fact that the sites of oxidation of dsDNA are protected for participating in the hydrogen bonds of the double helix, making $I_{pa} \text{ dsDNA} < I_{pa} \text{ ssDNA}$ even without the use of a mediator.

3. Conclusions

The development of new electrochemical methods for the differential diagnosis of ssDNA and dsDNA molecules is necessary for the advancement of genosensors. The creation of an application system for analysis with ITO electrodes was developed, showing good stability, ease of use and promotion of economy. The modification of ITO with NaOH and APTES was efficient for the immobilization of ssDNA molecules on the electrode surface. The interaction between specific immobilized nucleotide sequences produced current peaks, related to guanine oxidation, approximately four times smaller than in their absence, enabling the differentiation between ssDNA and dsDNA, suggesting the proposed method as a good tool for studying and developing techniques for the development of DNA biosensors.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank to CNPq and CAPES, for the financial support, and especially to all the group of professors and friends from the laboratories of biosensors and biochemistry of LIKA/UFPE, who have always contributed to the development of new projects with suggestions and material contributions.

6. References

1. Lowe, C.R. 2007. Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. **Handbook of Biosensors and Biochips**.
2. Wang, J. 2006. Analytical Electrochemistry. Third Edition. **Wiley-VCH**.
3. Heras, A. and A. Colina. 2009. Flexible optically transparent single-walled carbon nanotube electrodes for UV-Vis absorption spectroelectrochemistry. **Electrochemistry Communications** 11(2): 442-445.
4. Zhang, J. and Oyama, M. 2005. Gold nanoparticle-attached ITO as a biocompatible matrix for myoglobin immobilization: direct electrochemistry and catalysis to hydrogen peroxide. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 577, issue 2: 273-279.
5. Xu, J.; Zhu, J-J.; Huang, Q. and Chen, H-Y. 2001. A novel DNA-modified indium tin oxide electrode. **Electrochem. Commun.** 3: 665-669.
6. Ballarin, B.; Fraleoni-Morgera, A.; Frascaro, D.; Marazzita, S.; Piana, C. and Setti, L. 2004. Thermal inkjet microdeposition of PEDOT:PSS on ITO-coated glass and characterization of the obtained film. **Synthetic Materials**. v. 146. Issue 2: 201-205.
7. Heras, A. and A. Colina. 2009. Flexible optically transparent single-walled carbon nanotube electrodes for UV-Vis absorption spectroelectrochemistry. **Electrochemistry Communications** 11(2): 442-445.
8. Mauro, A. La-Scalea, Silvia H. P. Serrano and Ivano G. R. Gutz. 1998. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. *Química Nova* v.22, 3.

9. Mandong, G.; Yanqing, L.; Hongxia, G.; Wu Xiaoqin, W. and Lifang, F. 2007. Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. **Bioelectrochemistry**, 70: 245-249.
10. Teles, F.R.R.; Prazeres, D.M.F. and Lima-Filho, J.L. 2007. Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator. **Sensors**. 7: 2510-2518.
11. Wang, Y. and M. Chen. 2009. Rapid detection of human papilloma virus using a novel leaky surface acoustic wave peptide nucleic acid biosensor. **Biosensors and Bioelectronics** 24(12): 3455-3460.
12. Xu, X. and Bard, A.J. 1995. **J. Am. Chem. Soc.** 117: 2627.
13. Zhao, Y.; Pang, D.; Wang, Z.; Cheng, J. and Qi, Y. 1997. **J. Electroanal. Chem.** 431: 203.
14. Liu, S.; Ye, J.; He, P. and Fang, Y. 1996. **Anal Chim. Acta** 335: 239.
15. Wang, J.; Chicherro, M.; Rivas, G.; Cai, X.; Dontha, N.; Farias, P. and Shiraishi, H. 1996. **Anal Chem.** 68: 2251.
16. Herme, T. M. and Tarlov, M.J. 1997. **J. Am. Chem. Soc.** 119: 8916.
17. Brabec, V. **Bioelectrochem. Bioenerg.** 1081. 8: 437.
18. Tan, G. and L. Zhang. 2011. Preparation and characterization of APTES films on modification titanium by SAMs. **Thin Solid Films In Press**, Corrected Proof.
19. Michalet, X.; Ekong, R.; Fougerousse, F.; Rousseaux, S.; Schurra, Hornigold, N.; Slegtenhorst, M.V.; Wolfe, J.; Povey, S.; Beckmann, J.S. and Bensimon, A. 1997. **Science** 277: 1518.
20. A. Bensimon; A. Simon; A. Chi audel; V. Croquette; F. Heslot and D. Bensimon. 1994. **Science** 265: 2096.

21. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O. and Serrano, S. H. P. 1994. **J. Electroanal. Chem.**
366: 225.

CONCLUSÕES

Os biossensores têm emergido fortemente como métodos inovadores de diagnóstico. Como apresentado neste trabalho, o uso de eletrodos em lâminas de ITO e equipamentos para impressão automatizada apresentam bons resultados em experimentação laboratorial para utilização no desenvolvimento de biossensores. A aplicação das metodologias aqui apresentadas sugere a obtenção de resultados mais estáveis com economia de tempo e baixo custo.

PERSPECTIVAS

Os métodos apresentados neste trabalho demonstraram-se bastante otimistas para o estudo em biossensores.

Muitas são as dificuldades nos estudos eletroquímicos aplicados a análises biológicas e a manutenção da estabilidade operacional é de grande importância.

O uso do sistema de impressão Inkjet pode fazer com que o controle do material depositado em eletrodos de superfícies sólidas seja eletronicamente controlado, evitando-se desperdícios de material e obtendo-se maior regularidade operacional.

A utilização de lâminas de ITO leva a uma maior reprodutibilidade das análises voltamétricas quando comparadas às realizadas em eletrodos convencionais de carbono. O aparato Sensor Holder, especificamente desenvolvido para a leitura eletroquímica com lâminas de ITO, delimita eletrodos de trabalho de um mesmo tamanho, o que leva a uma maior reprodutibilidade dos ensaios. Além disso, o uso da mini célula eletroquímica permite a utilização de pequenas amostras, diminuindo os custos.

As etapas iniciais apresentaram resultados promissores. A continuidade do projeto é de suma importância para a conclusão do sistema final. Este será a junção dos dois métodos descritos. Ter-se-á, assim, a produção de um biossensor em lâmina de vidro, por meio de impressão automatizada de 8 amostras individuais, que será lido

na mini célula eletroquímica, desenvolvida pelo próprio LIKA, e passível de patenteamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Diamond, D. 1998.1 Principles of chemical and biological sensors. **John Wiley & Sons, Inc.** New York, USA. P.3-166.
2. Albareda-Sirvent et al. 2000 M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci and S. Alegret, Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review, **Sens. Actuator B.** 69: 153–163.
3. Turner, A. P. F., Karube, I., and Wilson, G. S. 1987. Biosensors: Fundamentals and Applications. **Oxford University Press**, Oxford.
4. Camman, K.; Lemke, U.; Rohen, A.; Sander, J.; Wilken, H.; Winter, B. 1991. Chemical sensors and biosensors – principles ad applications. **Angewandle Chemie.** International Edition in English. 30: 516-539.
5. Clark, L. C., Jr. and Lyons, C. 1962. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Ann. NY Acad. Sci.** 102: 29–45.
6. Updike, S. J. and Hicks, J. P. 1967. The enzyme electrode. **Nature.** 214: 986–988.
7. Lowe, C.R. 2007. Overview of Biosensor and Bioarray Technologies. **Handbook of Biosensors and Biochips.**
8. Velasco-Garcia, M. N. and Mottram, T. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. **Biosystem Bioengineering.** 84: 1-12.

9. Szuminsky, N. J.; Jordan, J.; Pottgen, P. A.; Talbott, J. L. 1992. Method and Apparatus for Amperometric Diagnostic Analysis. **United States Patent**, n. 5,108, 564.
10. Rosatto, S. S. 2000. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
11. Su, L., W. Jia, et al. 2011. Microbial biosensors: A review. **Biosensors and Bioelectronics** 26(5): 1788-1799.
12. Liley, M., Gizeli, E. and Lowe, C.R (eds). 2002. Optical Transducers, in Biomolecular Sensors, **London**: 123-175
13. Wink, Th. 1999. Surface Plasmon Resonance Spectrometry Applied to Quantative Analytical Chemistry. **PhD thesis**. University of Utrecht, The Netherlands.
14. Araújo, R.F.F. 2006. Aplicação de Polímeros como Matrizes no Desenvolvimento de Biossensores e na Purificação de Proteínas. **Tese de doutorado**.
15. Kumar, A. 2000. Biosensors Based on Piezoelectric Crystal Detectors: Theory and Application. **Jom-e, The Minerals, Metals & Materials Society**.
16. Madhally, S. V. 2010. Principles of Biomedical Engineering. **Engineering in Medicine and Biology**.
17. Referência: <http://sensortransducer.blogspot.com/2010/11/piezoelectric-biosensor.html>. Acessado em 08/12/10.

18. Pang, D.W. and Abruna, H.D. 1998. Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules, **Anal. Chem.** 70: 3162–3169.
19. Thorp, H.H. 1998. Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation, **Trends Biotechnol.** 16: 117–121.
20. Wang, J. 2006. **Analytical Electrochemistry**. Third Edition, Wiley-VCH.
21. Bockris, J.O.; Reddy, A.K.N. 2002. **Modern Electrochemistry 1. Ionics**. Second Edition.
22. Zoski, C. G. 2007. Handbook of Electrochemistry. **Elsevier**, The Netherlands.
23. Guimard, N. K. and N. Gomez. 2007. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science** 32(8-9): 876-921.
24. Okafor, C.; Grooms, D.; Alocilja, E. and Bolin, S. 2008. Fabrication of a Novel Conductometric Biosensor for Detecting *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* **Antibodies. Sensors.** 8: 6015-6025.
25. Hoa, D.T.; Kumar, T.N.S.; Puneekar, N.S.; Srinivasa, R.S.; Lal, R., Contractor, A.Q. 1992. Biosensor based on conducting polymers. **Anal. Chem.** 64: 2645-2646.
26. Sergeyeva, T.A.; Lavrik, N.V.; Piletsky, S.A.; Rachkov, A.E. and Elskaya, A.V. 1996. Polyaniline labelbased conductometric sensor for IgG detection. **Sensor Actuat. B-Chem.** 34: 283-288.
27. Imisides, M.D., John, R., Wallace, G.G. 1996. Microsensors based on conducting polymers. **Chemtech.** 26: 19-25.

28. Syed, A.A.; Dinesan, M.K. 1991. Polyaniline - A novel polymeric material - review. **Talanta**. 38: 815-837.
29. Shulga, A.A.; Soldatkin, A.P.; Elskaya, A.V.; Dzyadevich, S.V.; Patskovsky, S.V.; Strikha, V.I. 1994. Thin-film conductometric biosensors for glucose and urea determination. **Biosens. Bioelectron**. 9: 217-223.
30. Chouteau, C.; Dzyadevych, S.; Durrieu, C.; Chovelon, J.M. 2005. A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. **Biosens. Bioelectron**. 21: 273-281.
31. Muhammad-Tahir, Z.; Alocilja, E.C. 2003. Fabrication of a disposable biosensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection. **IEEE Sens. J.** 3: 345-351.
32. Pal, S.; Alocilja, E.C.; Downes, F.P. 2007. Nanowire labeled direct-charge transfer biosensor for detecting *Bacillus* species. **Biosens. Bioelectron**. 22: 2329-2336.
33. Muhammad-Tahir, Z.; Alocilja, E.C.; Grooms, D.L. 2005. Rapid detection of bovine viral diarrhoea virus as surrogate of bioterrorism agents. **IEEE Sens. J.** 5: 757-762.
34. Eggins, B.R. 1996. Biosensors, an introduction. **John Wiley & Sons**. England.
35. Guilbault, G.G. 1977. Enzyme Electrodes in Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins. T.M.S. Chang (ed), **Plenum Press**, New York. 163-176.

36. Koryta, J.; Dvůrák, J. and Kavan, L. 1993. Principles of Electrochemistry – Second Edition. **John Wiley & Sons**.
37. Perez, V. H.; Silva, G. S.; Gomes, F. M.; de Castro, H. F. 2007. **Biochem. Eng. J.** 34, 13.
38. Bard, A.J., Faulkner, L. R. 2001. Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications, Second Edition. **John Wiley & Sons, Inc.**
39. Hass, m. j.; Cichowicz, D. J.; Bailey, D. G. 1992. **Lipidis.** 27(8): 571-576.
40. Pulse Voltammetric Techniques. Disponível em: http://www.basinc.com/mans/EC_epsilon/Techniques/Pulse/pulse.html.
41. Aleixo, L. M. 2005. Voltametria: conceitos e técnicas. **ChemKeys**. Universidade Estadual de Campinas. Curso de Química.
42. Wang, J. 2008. Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications. **Academic Press Inc.**
43. Wolfbeis, O. S. 2000 *Anal. Chem.* 72: 81.
44. Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y.; 2000. **Biosens. Bioelectron.** 15: 273.
45. Janata, J.; Josowictz, M.; Vanýsek, P.; DeVaney, D. M.; 1998. **Anal. Chem.** 70: 179R.
46. Newman, J.D. and Turner, A.P.F. 2005. Home blood biosensors: a commercial perspective. **Bios. Bioelec.** 20: 2435-53.

47. Zou, Y.; Xiang, C.; Sun, L.-X.; Xu, F. 2008. Glucose biosensor based on electro deposition of platinum nanoparticles onto CNRs and immobilizing enzyme with chitosan–SiO₂ sol gel, **Biosens. Bioelectron.** 23: 1010–1016.
48. Riccardi, C.S.; Costa, P.I. and Yamanaka, H. 2002. Imunossensor amperométrico. **Química Nova.** 25: 316-320.
49. Huei-Cing Lin and Wen-Chi Tsai. 2003. Piezoelectric next term crystal previous term immunosensor next term for the detection of staphylococcal enterotoxin B
50. Riccardi, C. dos S.; Costa, I. P.; Yamanaka, H. 2001. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova.** 25: 2. São Paulo.
51. Yang, M.; McGovern, M.E. and Thompson, M. 1997. **Anal. Chim. Acta** 346: 259.
52. Righetti, P.G. and Gelfi, C. 1997. **Electrophoresis** 18: 1709.
53. Millan, K.M. and Mikkeisen, S.R. 1993. **Anal. Chem.** 65: 2317.
54. Palecek, E. 1996. **Electroanalysis** 8: 7.
55. Mikkelsen, S.R. 1996. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection, **Electroanalysis** 8: 15–19.
56. Teles, F.R.R.; Prazeres, D.M.F. and Lima-Filho, J.L. 2007. Electrochemical Detection of a Dengue-related Oligonucleotide Sequence Using Ferrocenium as a Hybridization Indicator. **Sensors.** 7: 2510-2518

57. Olejnik, J.; Olejnik, E.K.; Rotschild, K.J. 1998. Photocleavable aminotag phosphoramidites for 5'-termini DNA/RNA labeling. **Nucleic Acids Res.** 26: 3572-3576.
58. Girotti, S.; Ferri, E.; Ghini, S.; Musiani, M.; Zerbini, M.L.; Gibellini, D.; Gentilomi, G. 1991. Direct quantitative chemiluminescent assays for the detection of viral DNA. **Anal. Chim. Acta.** 255: 387-394.
59. Livache, T.; Fouque, B.; Roget, A.; Marchand, J.; Bidan, G.; Teoule, R.; Mathis, G. 1998. Polypyrrole DNA chip on a silicon device: example of hepatitis C virus genotyping. **Anal. Biochem.** 255: 188-194.
60. Xu, D.K.; Ma, L.R.; Liu, Y.Q.; Jing, Z.H. 1999. Development of chemiluminescent biosensing of nucleic acids based on oligonucleotide-immobilized gold surfaces. **Analyst.** 124: 533-536.
61. Mandenius, C.F.; Chollet, A.; Mecklenburg, M.; Lundström, I.; Mosbach, K. 1989. Optical surface methods for detection of nucleic acid binding. **Anal. Letters.** 22: 2961-2973.
62. Vo-Dinh, T.; Houck, K.; Stokes, D.L. 1994. Surface-enhanced Raman gene probes. **Anal. Chem.** 66: 3379-3383.
63. Su, X.; Li, S.F.Y.; Liu, W.; Kwang, J. 2000. Piezoelectric quartz crystal based screening test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs. **Analyst** 125: 725-730.

64. Su, X.; Li, S.F.Y. 2001. Serological determination of *Helicobacter pylori* infection using sandwiched and enzymatically amplified piezoelectric biosensor. **Anal. Chim. Acta.** 429: 27-36.
65. Aizawa, H.; Kurosawa, S.; Tanaka, M.; Yoshimoto, M.; Miyake, J.; Tanaka, H. 2001. Rapid diagnosis of *Treponema pallidum* in serum using latex piezoelectric immunoassay. **Anal. Chim. Acta.** 437: 167-169.
66. Zhang, H.; Tan, H.; Wang, R.; Wei, W.; Yao, S. 1998. Immobilization of DNA on silver surface of bulk acoustic wave sensor and its application to the study of UV-C damage. **Anal. Chim. Acta.** 374: 31-38.
67. Su, H.; Kallury, K.M.R.; Thompson, M.; Roach, A. 1994. Interfacial nucleic acid hybridization studied by random primer ³²P labeling and liquid-phase acoustic network analysis. **Anal. Chem.** 66: 769-777.
68. Li, F.; Han, X.; Liu, S. 2010. Development of an electrochemical DNA biosensor with a high sensitivity of fM by dendritic gold nanostructure modified electrode. **Biosensors and Bioelectronics.**
69. Yang, R.; Jin, J.; Chen, Y.; Shao, N.; Kang, H.; Xiao, Z.; Tang, Z.; Wu, Y.; Zhu, Z. and Tan, W. 2008. **J. Am. Chem. Soc.** 130: 8351–8358.
70. Duan, X.; Li, Z.; He, F. and Wang, S. 2007. **J. Am. Chem. Soc.** 129: 4154–4155.
71. Kim, D.; Kerman, K.; Saito, M.; Sathuluri, R.R.; Endo, T.; Yamamura, S.; Kwon Y. and Tamiya, E. 2007. **Anal. Chem.** 79: 1855–1864.

72. Patolsky, F.; Lichtenstein, A. and Willner, I. 2000 **J. Am. Chem. Soc.** 122: 418–419.
73. Drummond, T.G.; Hill, M.G. and Barton, J.K., 2003. **Nat. Biotechnol.** 21: 1192–1199.
74. Liu, G.; Wan, Y.; Gau, V.; Zhang, J.; Wang, L.; Song, S. and Fan, C. 2008. **J. Am. Chem. Soc.** 130: 6820–6825.
75. Zhang, S.; Wu, Z.; Shen, G.; and Yu, R. 2009 **Biosens. Bioelectron.** 24: 3201–3207.
76. Zhang, Y.; Wang, Y.; Wang, H.; Jiang, J.; Shen, G.; Yu, R. and Li, J. 2009. **Anal. Chem.** 81: 1982–1987.
77. Li, H.; Sun, Z.; Zhong, W.; Hao, N.; Xu, D. and Chen, H.-Y. 2010. **Anal. Chem.** 82: 5477–5483
78. Munde, M.; Ismail, M.A.; Arafa, R.; Peixoto, P.; Collar, C.J.; Liu, Y.; Hu, L.; David-Cordonnier, M.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Boykin, D.W. and Wilson, W.D. 2007. **J. Am. Chem. Soc.** 129: 13732–13743.
79. Gorodetsky, A.A.; Buzzeo, M.C. and Barton, J.K. 2008. **Bioconjug. Chem.** 19: 2285–2296.
80. Kalcher, K.; Kauffmann, J.M.; Wang, J.; Svancara, I.; Vytras, K.; Neuhold, C.; Yang, Z. 1995. **Electroanalysis** 7: 5.
81. Mullor, S.G.; Sánchez-Cabezudo, M.; Ordieres, A.J.M.; Ruiz, B.L. 1996. **Talanta** 43: 779.

82. Kubota, L.T. e Pereira, A.C. 2004. Otimização da Preparação de Eletrodo de Pasta de Carbono Contendo Riboflavina Imobilizada em Suporte Inorgânico. **Química Nova**.
83. Debeda-Hickel, H.; Lucat, C.; Menil, F. 2005. Influence of the Densification Parameters on screen-printed Component Properties. **Journal of the European Ceramic Society**. v. 25, n. 12: 2115-2119.
84. Dollen, P.V.; Barnett, S.; A Study of Screen Printed Ytria-Stabilized Zirconia Layers for Solid Oxide Fuel Cells. 2005. **Journal of the American Ceramic Society** v. 88, n. 12: 3361-3368.
85. Brunetti, B.; Ugo, P.; Moretto, L.M.; Martin, C.R. 2000. Electrochemistry of phenothiazine and methylviologen biosensor electron-transfer mediators at nanoelectrode ensembles. **J. Electroanal. Chem.** v. 491: 166-174.
86. Hart, J. P. 1997. Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses **Trends Anal. Chem.** v. 16, n. 2: 89-103, 1997.
87. Stradiotto, N. R.; Yamanaka, H.; Zaroni, M. V. B. 2003. Electrochemical Sensors: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.**,v. 14, n. 2, p.159-173.
88. Siqueira, L.P. 2009. Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico para Triglicerídeos. **Dissertação de mestrado**.

89. Kafi, A. K.; Lee, D. Y.; Park, S. H.; Kwon, Y. S. 2006. DNA as a support for glucose oxidase immobilization at Prussian blue-modified glassy carbon electrode in biosensor preparation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* v.6, n.11: 3539–3542, 2006.
90. Radomska, A.; Bodenzak, E.; Satanis, G.; Koncki, R. 2004. Creatinine biosensor based on ammonium ion selective electrode and its application in flow-injection analysis. *Talanta.* v.64, n.3: 603-608.
91. D'auria, S.; Gryczyynski, Z.; Gryczyynski, I.; Rossi, M.; Lakowicz, J. R. 2000. A protein biosensor for lactate. *Anal. Biochem.* 283: 83–88.
92. Barhoumi, H.;Maaref, A.; Rammah, M.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Mousty, C.; Cosnier, S.; Perez, E.; Rico-Lattes, E. 2005. Insulator semiconductor structures coated with biodegradable latexes as encapsulation matrix for urease. *Biosens. Bioelectron.* v.20, n.11:2318–2323.
93. Rao, V. K.; Sharma, M. K.; Pandey, P. Sekhar, K. 2006. Comparasion of different carbon ink basead screen-printed electrode towards amperometric immunosensing. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* v. 22, n. 11: p. 1135-1143.
94. Singh, S.; Singhal, R.; Malhotra, B. D. 2007. Immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol-gel films for application to cholesterol biosensor. *Anal. Chim. Acta.* 582: 335–343.
95. Nascimento, V.B., Angnes, L. 1998. Eletrodos Fabricados por Silk Screen. Revisão. *Química Nova*, 21(5).

96. Forevision Instruments. Figura. Lâminas de ITO em substrato de vidro.
Disponível em: <http://www.indiamart.com/company/2570094/products.html>.
97. Xu, J.; Zhu, J-J.; Huang, Q.; Chen, H-Y. 2001. A novel DNA-modified indium tin oxide electrode. **Electrochem. Commun.** 3: 665-669.
98. Ballarin, B.; Fraleoni-Morgera, A.; Frascaro, D.; Marazzita, S.; Piana, C.; Setti, L. 2004. Thermal inkjet microdeposition of PEDOT:PSS on ITO-coated glass and characterization of the obtained film. **Synthetic Materials**. v. 146. Issue 2: 201-205.
99. Ballarin, B. and A. Fraleoni-Morgera. 2004. Thermal inkjet microdeposition of PEDOT:PSS on ITO-coated glass and characterization of the obtained film. **Synthetic Metals** 146(2): 201-205.
100. Weill, A.; Kelly, M.J. and Weisbuch, C. 1986. The physics and fabrication of microstructures and microdevices. **Springer Verlag Berlin**, Heidelberg, New York, p 51.
101. Jenekhe, S.A.; Bowden, M.J.; Turner SR. 1987. Polymers for high technology. **ACS Symposium Series**, Washington, DC, p 346.
102. Tolan, M. 1999. X-ray scattering from soft matter thin films, Materials science and basic research, **Springer tracts on modern physics**. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
103. Gutmann, J.S. 2000. **PhD thesis**. GKSS Forschungszentrum.

104. Yimsiri, P.; Mackley, M.R. 2006. Spin and dip coating of light-emitting polymer solutions: Matching experiment with modelling. **Chemical Engineering Science**, v. 61, Issue 11.
105. Dirk, W.; Schubert, Thomas Dunkel. 2003. Spin coating from a molecular point of view: its concentration regimes, influence of molar mass and distribution; **Materials Research Innovations** v. 7: 314.
106. Stange, T.G.; Mathew, R.; Evans, D.F. and Hendrickson, W.A. 1992. **Langmuir**. 8: 920.
107. Gu, J.; Bullwinkel M.D. and Campbell GA. 1996. **Polym Eng Sci**. 36: 1019.
108. Schubert, D.W. 1997. **Poly Bull**. 38: 177.
109. Dunkel, T. 2000. **Diploma thesis**. GKSS Forschungszentrum & FH Aachen.
110. Brinker, C.J. and Hurd, A.J. 1994. Fundamentals of sol-gel dip-previous termcoating. **Journal de Physique III**. 4.
111. Gibson, M.; Frejlich, J. and Machorro, R. 1985. Dip-previous termcoating method for fabricating thin photoresist films, **Thin Solid Films** 128.
112. Gao, C.; Lee, Y.C.; Chao, J. and Russak, M. 1995. Dip- coating of ultra-thin liquid lubricant and its control for thin-film magnetic hard disks, **IEEE Transactions on Magnetism**. 31.
113. Brasjen, B. J.; A. W. van Cuijk. 2010 "Dip-coating of chemically patterned surfaces. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification** In Press, Corrected Proof.

114. Mills, R. 1996. Ink jet printing: past, present and future. In: Rezanka and Eschbach, Editors, **IS&T: Recent Progress in Ink Jet Technologies**, IS&T, Springfield, VA. 12–15.
115. Jung, J.-Y.; Kang, Y.T. 2010. Development of a new simulation model of spin coating process and its application to optimize the 450 mm wafer coating process. **International Journal of Heat and Mass Transfer**. 53(9-10): 1712-1717.
116. How Stuff Works, 2010. Disponível em: <http://www.howstuffworks.com>.
117. Wijshoff, H. 2010. The dynamics of the piezo inkjet printhead operation. **Physics Reports**. 491(4-5): 77-177.
118. Kenyon, R.W. 1996. Chemistry and Technology of Printing and Imaging System. **Blackie Academic & Professional**, Glasgow.
119. Le, H.P. 1998. Progress and trends in ink-jet printing technology. **J. Imaging Sci. Technol.** 42 (1): 49–62.
120. Santos, C.M.L. 2008. Desenvolvimento de um biossensor de DNA para detecção do Papilomavírus Humano, usando técnica de impressão. **Dissertação de mestrado**.
121. Pillai, C. K. S.; W. 2009. Paul. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science** 34(7): 641-678.

122. Cass, T. and Ligler, F. S. 1998. Immobilized biomolecules in analysis: A practical approach, **Oxford University Press**, New York.
123. Substituted Quinodimethans. I. Preparation and Chemistry of 7,7,8,8-Tetracyanoquinodimethan. 1962. **J. Am. Chem. Soc.** v. 84: 3370-3374.
124. Yang, W.; Ozsoz, M.; Hibbert, D. B.; Gooding, J. J. 2002. Evidence for the direct interaction between methylene blue and guanine bases using DNAmmodified carbon paste electrodes. **Electroanalysis**. 14, n.18: 1299-1302.
125. Kara, P.; Kerman, K.; Ozkan, D.; Meric, B.; Erdem, A.; Ozkan, Z.; Ozsoz, M. 2002. Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA. **Electrochemistry communications**. 4: 705-709.
126. Mandong, G., Yanqing, L., Hongxia, G., Wu Xiaoqin, W., Lifang, F. 2007. Electrochemical detection of short sequences related to the hepatitis B virus using MB on chitosan-modified CPE. **Bioelectrochemistry**. 70: 245-249.

ANEXO

Norma Revista (Biosensors and Bioelectronics)

Aims and Scope

Biosensors & Bioelectronics is the principal international journal devoted to research, design,

development and application of biosensors and bioelectronics. It is an interdisciplinary journal serving professionals with an interest in the exploitation of biological materials and designs in novel diagnostic and electronic devices including sensors, DNA chips, electronic noses, lab-on-a-chip and μ -TAS.

Biosensors are defined as analytical devices incorporating a biological material (e.g. tissue, microorganisms, organelles, cell receptors, enzymes, antibodies, nucleic acids, natural products etc.), a biologically derived material (e.g. recombinant antibodies, engineered proteins, aptamers etc) or a biomimic (e.g. synthetic receptors, biomimetic catalysts, combinatorial ligands, imprinted polymers etc) intimately associated with or integrated within a physicochemical transducer or transducing microsystem, which may be optical, electrochemical, thermometric, piezoelectric, magnetic or micromechanical. Biosensors usually yield a digital electronic signal which is proportional to the concentration of a specific analyte or group of analytes. While the signal may in principle be continuous, devices can be configured to yield single measurements to meet specific market requirements. Examples of Biosensors include immunosensors, enzyme-based biosensors, organism and whole cell-based biosensors.

They have been applied to a wide variety of analytical problems including uses in medicine, biomedical research, drug discovery, the environment, food, process industries, security and defence. The design and study of molecular and supramolecular structures with molecular biorecognition and biomimetic properties for use in analytical devices is also included within the scope of the journal. Here the focus is on the complementary intersection between molecular recognition, nanotechnology, molecular imprinting and supramolecular chemistry to improve the analytical performance and robustness of devices.

The emerging field of Bioelectronics seeks to exploit biology in conjunction with electronics in a wider context encompassing, for example, biological fuel cells, bionics and biomaterials for information processing, information storage, electronic components and actuators. A key aspect is the interface between biological materials and micro- and nano-electronics.

While endeavouring to maintain coherence in the scope of the journal, the editors will accept reviews and papers of obvious relevance to the community, which describe important new concepts, underpin understanding of the field or provide important insights into the practical application, manufacture and commercialisation of biosensors and bioelectronics.

Types of papers

Full papers should describe original research work not previously published, and should be complete descriptions of full investigations comprising around 5000 words and with up to 6 figures and/or tables.

Short Communications should be concise but complete descriptions of original limited investigations comprising around 3000 words with up to 3 figures and/or tables.

Review Articles should comprehensively cover a subject of current interest, comprise around 8000 words and be extensively referenced. Illustrations and summary tables are encouraged. Contributions may be submitted or invited.

Exceptions to these criteria may be permitted if you discuss your requirements in advance with an Editor.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see

<http://www.elsevier.com/publishingethics> and

<http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with Directive 86/609/EEC for animal experiments <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/s23000.htm>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with

the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and

credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this

choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Language

Papers will be published in English. Authors' manuscripts must be consistent in style, spelling and syntax.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts

source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Please submit your article via <http://www.elsevier.com/locate/bios>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables

and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Essential title page information

Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid

abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent

address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

The abstract is the part of your paper which will be read by the largest number of scientists so it plays a crucial role. The abstract is a condensation of the information (facts) in the paper and should be brief (150 - 250 words), specific and self-contained including the methods of the research and the principal results. The abstract should not include trivial experimental details, references, figures or equations.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

1.Introduction

This section should state the objectives of the work and provide an adequate background. It should also describe briefly the work presented in the paper. Avoid a detailed literature survey or a summary of the results.

2. Material and methods

It should provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

3.Results

Results should be clear and concise.

4.Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. A combined Results and Discussion section is often appropriate. The Results and Discussion should deal with the interpretation of the results in the light of previously published findings.

5.Conclusions

It should be kept short and must be fully supported by the results reported. The Conclusions section should include the major conclusions, the limitations of the work and the future work.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.

Avoid

abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article

was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

The abstract is the part of your paper which will be read by the largest number of scientists so it plays a crucial role. The abstract is a condensation of the information (facts) in the paper; it is not a description of the contents of the paper. The abstract should present as much as possible of the qualitative and quantitative information

contained in the paper yet it should be brief (150 – 250 words), specific and self-contained.

The abstract may include the following:

1. The context for the work.
2. The purpose or objectives of the work (what was the research question or problem and why it is important).
3. Theoretical or experimental methods used.
4. Results (qualitative and quantitative).
5. Conclusions and their limitations (what was the meaning of the results).
6. Safety information concerning dangerous compounds or procedures if relevant. If the paper reports a new instrument or method then the abstract should include a description of its advantages and disadvantages compared to other established techniques. The abstract should not include trivial experimental details, references, figures or equations.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: <http://www.iupac.org> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you

submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used. The preferred positions for all figures should be indicated in the text.

Tables

Please note that a full paper should contain no more than 6 single figures/tables/schemes. A short communication should contain no more than 3 single figures/tables/schemes.

Tables should be typed in double spacing on separate pages and provided with a suitable heading. Tables should be clearly referred to in the text using Arabic numerals. Considerable thought should be given to layout so that the significance of the results can be easily grasped. Each table should have a title which makes the general meaning understandable without reference to the text. Vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be sufficiently explanatory, and presented in a way consistent with the column width. Columns of figures multiplied by the same power of ten should not be presented as such. The power of ten should be indicated in the column heading, e.g.:

10⁴[NaCl]/mol l⁻¹

4.2

3.5

0.26

rather than

[NaCl]/mol l⁻¹

4.2 x 10⁻⁴

3.5 x 10⁻⁴

2.6 x 10⁻⁵

In order to demonstrate the repeatability/reproducibility of the method, Authors are asked to include relative standard deviations (RSD) or the coefficient of variations (CV) in tables.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference Style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995).
Kramer et al.

(2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to

publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge)

and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal Physics Letters B):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please

visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.