

Construção de um genossensor amperométrico para detecção não marcada de RNA de HCV: Avaliação preliminar.

Paulo R. Brasil de O. Marques (PG)*, Hideko Yamanaka (PQ), Carla dos Santos Riccardi (PQ).

paulobra@posgrad.iq.unesp.br

Departamento de Química Analítica, UNESP-Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara.

Palavras Chave: Genossensores, eletrodos de ouro, Hepatite C.

Introdução

Um genossensor é um biossensor modificado com DNA como elemento de reconhecimento, sendo utilizado em eletroanalítica como forte candidato a investigações e diagnósticos genéticos¹. A construção de um genossensor eletroquímico envolve três passos, sendo: imobilização do DNA, hibridização e investigação eletroanalítica². Os eletrodos de ouro têm monitorado o sinal da oxidação direta da guanina em potenciais próximos de + 0,7 V (vs Ag/AgCl) após períodos de pré-polarização do eletrodo³. O presente trabalho objetivou estudos iniciais de caracterização da modificação do eletrodo de trabalho (ouro) modificado com oligonucleotídeos de genótipo do tipo 1 do vírus da hepatite C. Utilizou-se os eletrodos de Ag/AgCl e Pt, como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente. Para detecção de sinal eletroanalítico foi utilizada a técnica da voltametria de pulso diferencial. Após pré-tratamento da superfície, a modificação do eletrodo de trabalho consistiu da formação de uma monocamada auto-organizada de ácido mercaptopropiônico (MPA), seguido de acoplamento de estreptavidina, bloqueio da superfície não modificada com soro albumina bovina e posterior ligação com sonda de oligonucleotídeo, biotinilada na extremidade 5' do DNA de fita simples. Todas as etapas de modificação foram monitoradas.

Resultados e Discussão

Foram avaliados os efeitos de cinco tampões biológicos como sinal de base. O tampão citrato-fosfato foi selecionado devido ao deslocamento da região de formação dos óxidos para potenciais mais positivos. Em baixos valores de pH, a transferência elétrica aumenta nas monocamadas de MPA em ouro e valores mais elevados podem oferecer repulsão para espécies em solução, por isto o pH = 6,0 foi escolhido.

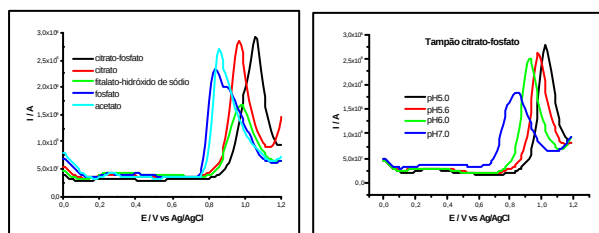


Figura 1 Estudo de efeito de diferentes tampões biológicos.

Um pico em valores de potencial próximos de + 0,7 V foi evidenciado, quando o eletrodo modificado foi avaliado frente ao tampão citrato-fosfato pH 6,0 indicando a oxidação dos resíduos de guanina do material genético que compõe o eletrodo modificado. Como o processo de oxidação desta base nitrogenada é irreversível, um decréscimo no sinal é observado para as medidas subseqüentes, devido à inativação da superfície do eletrodo pela forte adsorção dos produtos de oxidação do material genético imobilizado.

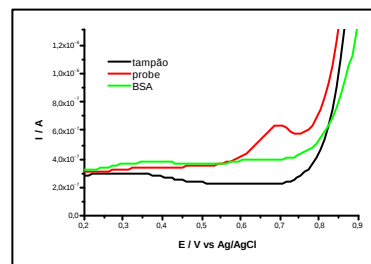


Figura 2 Polarografia de pulso diferencial: tampão citrato-fosfato pH 6,0 (-); eletrodo modificado e bloqueado (-); probe de HCV.

Foram investigadas as etapas de modificação do eletrodo, indicando que nenhuma delas apresentou sinal interferente na região do potencial trabalhada.

Conclusões

A metodologia de imobilização foi satisfatória para a orientação da fita simples de DNA no eletrodo de trabalho. Verificou-se um pico característico de oxidação da guanina em potencial + 0,7 V, sem o uso de mediadores ou marcadores eletroquímicos, bem como sem etapa de pré-polarização, processos estes apresentados na literatura. Estudos futuros em termos de repetitividade de sinal eletroanalítico e confirmação de processos de hibridização via amostras amplificadas estão sendo avaliados visando o aprimoramento do genossensor, que ainda se apresenta em etapas iniciais de construção.

Agradecimentos

CNPq.

¹ Wang, J. *Anal Chim Acta*. 2002, 469 63.

²Pividori, M. I., Merkoc, A., Alegret, I. S. Biosensors & Bioelectronics. **2000**, 15 291.

³Kagan, K., Yasutaka, M., Yuzuru T., Eiichi T. Electrochemistry Communications. **2003**. 5887.