



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO

DANIELE ALCOFORADO COSTA

**UTILIZAÇÃO DE SONDAS DE PNA E LNA EM BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Parnaíba - PI
2020

DANIELE ALCOFORADO COSTA

**UTILIZAÇÃO DE SONDAS DE PNA E LNA EM BIOCENSORES
ELETROQUÍMICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Universidade Federal do Delta do Parnaíba
- UFDPAr, como requisito obrigatório para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Giovanny Rebouças
Pinto

**Parnaíba - PI
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

C837u Costa, Daniele Alcoforado

Utilização de sondas de PNA e LNA em biossensores eletroquímicos:
uma revisão sistemática da literatura [recurso eletrônico] / Daniele
Alcoforado Costa. – 2020.

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharel em Biomedicina) - Universidade Federal do Delta do
Parnaíba, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto.

1. Biossensores Eletroquímicos. 2. PNA. 3. LNA. I. Título.

CDD: 572.8

DANIELE ALCOFORADO COSTA

**UTILIZAÇÃO DE SONDAS DE PNA E LNA EM BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Delta do Parnaíba - UFDPAr, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

APROVADA EM: 1º / 10 / 2020

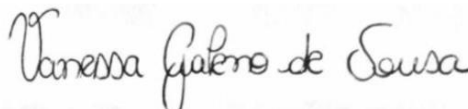
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Giovanny Rebouças Pinto
Presidente



Alice Silva Mendes
Membro



Vanessa Galeno de Sousa
Membro

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Francisco das Chagas e Maria Amélia, por todo o amor e o cuidado dedicados a mim incondicionalmente. Gratidão por tudo que representam para mim, por me inspirarem a perseverar e vencer os obstáculos.

Ao meu irmão, Italo Alcoforado, pelos conselhos, apoio e incentivo. Ao meu namorado, John Kevid, por ser meu parceiro de vida e por toda a ajuda que me deu neste trabalho e em diversos momentos desta difícil jornada.

Ao professor, Giovanny Rebouças, por toda sua dedicação e disponibilidade como orientador, por todo o suporte e por tantos conhecimentos transmitidos. Aos demais professores por todos os ensinamentos e por terem sido peça fundamental para minha formação.

Aos colegas da Biomedicina por todas as experiências compartilhadas, pelo companheirismo nos momentos difíceis e pelos laços de amizade que formei durante esses anos e que levarei para a vida toda. Aos amigos e familiares, por estarem sempre presentes em minha vida, aconselhando e torcendo por minhas conquistas.

Sem cada um de vocês, eu não teria vivenciado todas as experiências e os aprendizados que pude adquirir ao longo dessa caminhada, que me moldaram e que me ajudaram a chegar à conclusão de mais essa etapa. A todos meu muito obrigada!

RESUMO

Os biossensores eletroquímicos de DNA representam um grande avanço frente aos métodos tradicionais de detecção de biomoléculas. São sensíveis, específicos, práticos e fornecem respostas rápidas. As moléculas de PNA e LNA vêm sendo empregadas nos biossensores principalmente devido sua alta afinidade de hibridização com sequências alvo complementares, demonstrando propriedades superiores às de ácidos nucleicos naturais. Este trabalho objetiva analisar a literatura científica a fim de reunir estudos que empregam sondas PNA e LNA como componentes em biossensores eletroquímicos, avaliando as diferentes abordagens utilizadas e o papel que essas moléculas desempenham na eficiência desses dispositivos. Para isso, foi realizada pesquisa bibliográfica computadorizada utilizando-se a base de dados Pubmed, no recorte temporal de 2015 a 2020. A busca resultou em um total de 44 estudos. Após a filtragem, restaram 28 artigos que compõem esta revisão. Os estudos selecionados demonstraram como as sondas de PNA e LNA podem ser úteis para melhorar a sensibilidade, especificidade e estabilidade dos biossensores para o diagnóstico de doenças, a detecção de patógenos e de biomarcadores, além de aplicações também no monitoramento ambiental e na segurança alimentar. As diferentes estratégias de construção da sonda e dos eletrodos aliadas às escolhas dos métodos de amplificação serviram para explorar de forma mais eficaz as propriedades do PNA e LNA.

Palavras-chave: biossensores eletroquímicos; PNA; LNA

ABSTRACT

Electrochemical DNA biosensors represent a major advance compared to traditional methods of detecting biomolecules. They are sensitive, specific, practical and provide quick answers. The PNA and LNA molecules have been used in biosensors mainly due to their high affinity of hybridization with complementary target sequences, demonstrating properties superior to those of natural nucleic acids. This review aims to analyze the scientific literature in order to gather studies that address the use of modified oligonucleotides PNA and LNA as components of electrochemical biosensors, analyzing their construction strategies and the implications of using PNA and LNA for their performance. For this, computerized bibliographic research was performed using the Pubmed database, in the time frame from 2015 to 2020. The search resulted in a total of 44 studies. After filtering, 28 articles remain in this review. The selected studies demonstrated how the PNA and LNA probes can be useful to improve the sensitivity, specificity and stability of the biosensors for the diagnosis of diseases, the detection of pathogens and biomarkers, in addition to applications also in environmental monitoring and food safety. The different strategies of construction of the probe and electrodes combined with the choice of amplification methods served to explore more effectively the properties of PNA and LNA.

Keywords: electrochemical biosensors; PNA; LNA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Configuração de um biossensor.....	14
Figura 2 – Configuração de um biossensor eletroquímico de DNA.....	16
Figura 3 – Estrutura molecular de um nucleotídeo de DNA.....	17
Figura 4 – Modelos moleculares de A, B e Z-DNA	18
Figura 5 – Comparação entre PNA e DNA.....	21
Figura 6 – Estrutura dos monômeros de LNA.....	22
Figura 7 – Hibridização entre LNA e DNA.....	23
Figura 8 – Fluxograma para identificação, elegibilidade e análise dos estudos incluídos nesta revisão.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Biossensores eletroquímicos baseados em sondas de PNA ou LNA.....24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

acpcPNA	PyrrolidinyI PNA (ácido nucleico do peptídeo pirrolidinil)
Ag/PtNCs	Ag/Pt bimetallic nanoclusters (Nanoclusters bimetálicos Ag / Pt)
AQ-PNA	Anthraquinone-labeled pyrrolidinyI peptide nucleic acid (ácido nucleico do peptídeo pirrolidinil marcado com antraquinona)
ATRP	atom transfer radical polymerization (polimerização de radical de transferência de átomo)
AgNPs	Silver nanoparticles (nanopartículas de prata)
AuNPs	Gold nanoparticles (nanopartículas de ouro)
CNTs	Carbon Nanotubes (nanotubos de carbono)
ctDNA	Circulating tumor DNA (DNA tumoral circulante)
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
dsDNA	double-stranded DNA (DNA dupla fita)
eATRP	electrochemical atom transfer radical polymerization (polimerização radical de transferência de átomo mediada eletroquimicamente)
FET	field-effect transistor (Transistor de efeito de campo)
GNA	Glycol nucleic acid (ácido glicolnucleico)
G-PANI	graphene-polyaniline (Grafeno-polianilina)
HBV	Hepatitis B virus (vírus da hepatite B)
HCR	Hybridization chain reaction (reação de hibridização em cadeia)
HCV	Hepatitis C virus (vírus da hepatite C)
HPV	human papillomavirus (papilomavírus humano)
ITO	indium tin oxide (óxido de índio e estanho)
LNA	Locked nucleic acid (ácido nucleico bloqueado)
LOD	Limit of detection (limite de detecção)
LOQ	Limit of quantitation (limite de quantificação)
LSDR	(LNA)-assisted strand displacement reaction (reação de deslocamento de fita assistida por LNA)

MNBs	magnetic beads (esferas magnéticas)
ncDNA	normal circulating DNA (DNA circulante normal)
PAD	paper-based analytical device (dispositivo analítico de papel)
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PLL	poly-L-lysine (poli-L-lisina)
PNA	Peptide nucleic acid (ácido nucleico peptídico)
RAFT	reversible addition fragmentation chain transfer (Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação)
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribocucleico)
SI-eATRP	surface- initiated electrochemically mediated atom-transfer radical polymerization (polimerização radical de transferência de átomo mediada por eletroquimicamente iniciada por superfície)
SI-RAFT	surface-initiated reversible addition–fragmentation chain transfer (Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação iniciada pela superfície)
SNP	Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)
SNV	single-nucleotide variant (variante de nucleotídeo único)
ssDNA	Single-stranded DNA (DNA fita simples)
ssLNA	single-stranded LNA (LNA fita simples)
SWCNT-SPEs	Single Walled Carbon Nanotubes – Screen Printed Electrodes (nanotubos de carbono de parede única - eletrodos impressos em tela)
SWV	voltametria de onda quadrada (square wave voltammetry)
T _m	Melting temperature (Temperatura de melting / temperatura de fusão)
TMSDR	toehold mediate strand displacement reaction (reação de deslocamento de fita mediada por toehold)
TNA	Threose nucleic acid (ácido treonucleico)
WSSV	White spot syndrome vírus (vírus da síndrome da mancha branca)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA.....	14
2.2 ÁCIDOS NUCLEICOS.....	17
2.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS MODIFICADOS.....	19
2.4 PNA.....	20
2.5 LNA.....	22
3. METODOLOGIA.....	24
4. RESULTADOS.....	24
5. DISCUSSÃO.....	29
6. CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Desde a descoberta das propriedades eletroquímicas dos ácidos nucleicos no final da década de 1950, houve grande progresso no desenvolvimento de biossensores de ácido desoxirribonucleico (DNA) (TRNKOVA et al., 2005). São dispositivos que vêm ganhando interesse em diversos campos da genética e biologia molecular, devido as suas vantagens para a detecção principalmente de sequências específicas de ácidos nucleicos, fornecendo resultados mais sensíveis e específicos que os métodos convencionais, além de constituírem um meio mais barato, rápido e de fácil operação (WANG, 1998; CALIL; SILVA, 2011).

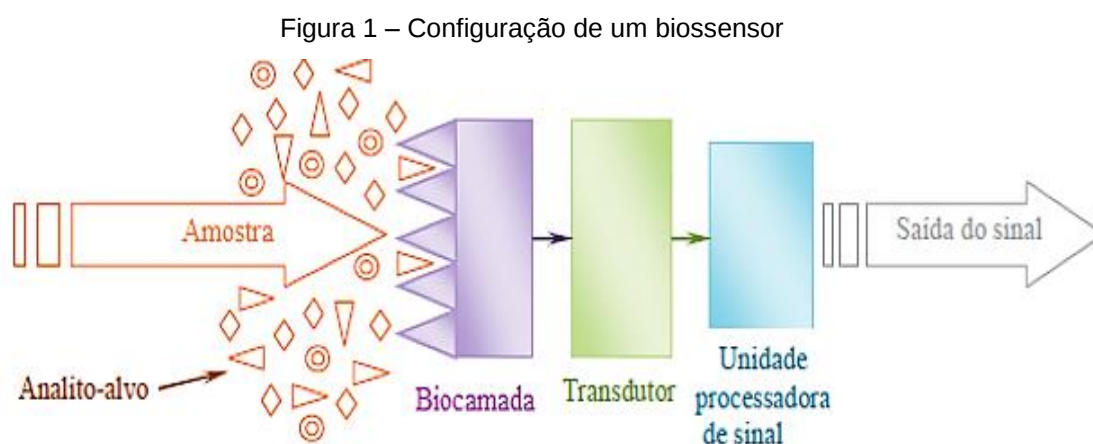
Esses biossensores utilizam as cadeias polinucleotídicas (principalmente de DNA) como bioreceptores para o analito alvo, que seria sua sequência complementar, formando um híbrido. A partir dessa interação, o dispositivo detecta a presença e a concentração do alvo em questão (KERMAN; KOBAYASHI; TAMIYA, 2004). Entretanto ainda há certas limitações em seu uso, relacionadas às propriedades dos materiais utilizados para sua montagem e dos ácidos nucleicos, que impossibilitam resultados mais precisos e confiáveis. Para superar esses problemas, foram incorporadas as cadeias modificadas de nucleotídeos como sondas que possuem propriedades superiores às dos ácidos nucleicos naturais, duas delas merecem destaque – ácido nucleico peptídico (PNA) e ácido nucleico bloqueado (LNA) – pela sua grande capacidade de reconhecimento e afinidade às sequências complementares (GUPTA; MISHRA; PURI, 2017; HAGEDORN et al., 2018).

Este trabalho objetiva analisar a literatura científica a fim de reunir estudos que empregam sondas PNA e LNA como componentes em biossensores eletroquímicos, avaliando as diferentes abordagens utilizadas e o papel que essas moléculas desempenham na eficiência desses dispositivos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS DE DNA

Um biossensor trata-se de um dispositivo analítico que utiliza um elemento biológico para detecção da presença e da concentração de um analito-alvo, por meio de sua interação com um transdutor que percebe a reação e emite um sinal a processado (WANG, 2000). Possui uma biocamada de reconhecimento molecular contendo um tipo de bioreceptor imobilizado, sendo essa diretamente conectada a um transdutor, responsável pela captação do sinal físico-químico gerado pelo reconhecimento do analito na biocamada e posterior detecção na unidade formadora de sinal (Figura 1) (PATHAK; KATIYAR; GIRI, 2007; MOREIRA et al., 2010).



Fonte: adaptado de CALIL; SILVA (2011)

O analito pode estar contido em uma amostra fluídica ou sólida e é colocada em contato com os bioreceptores (MOREIRA et al., 2010). Esses podem ser de diversos tipos – enzimas, micro-organismos, organelas, células, anticorpos, receptores celulares, ácidos nucleicos – dependendo da finalidade (NAKAMURA; KARUBE, 2003; LEE, 2008).

O biossensor de DNA se utiliza de sondas de DNA ou outros tipos de ácidos nucleicos. O contato entre esses componentes gera uma resposta físico-química no transdutor, este pode ser de diversos tipos, tais como, eletroquímico, óptico, piezoelétrico e calorimétrico. Ele age como uma interface convertendo esse estímulo em um sinal – podendo ser, por exemplo, variação de calor, índice de refração,

resistência, capacitância, entre outras – que é recebido por um processador, que informa ao usuário se o analito foi detectado e sua concentração na amostra (MEHRVAR et al., 2000; MOREIRA et al., 2010).

Tradicionalmente, são realizadas técnicas de detecção de oligonucleotídeos que são de alto custo, complexidade operacional e requerem equipamentos e maior tempo para sua realização. Os mais comuns são reação em cadeia da polimerase (PCR), procedimentos de microarray de DNA baseados na marcação de fluorescência de ácidos nucleicos (AOKI; TORIMURA; NAKAZATO, 2019), Northern blotting (VÁLÓCZI et al., 2004), microfluídica (CUI et al., 2017), dentre outros.

O biossensor de DNA representa um grande avanço frente a esses métodos, pois além de ser altamente sensível e específico, fornece respostas de maneira rápida e prática (WANG, 1998; CALIL; SILVA, 2011). Isso permite, por exemplo, a detecção de um micro-organismo com muito mais facilidade (HEJAZI; POURNAGHI-AZAR; AHOUR, 2010), organismos geneticamente modificados (HE et al., 2017) ou ainda genes relacionados a uma doença ou neoplasia (CHEN et al., 2017).

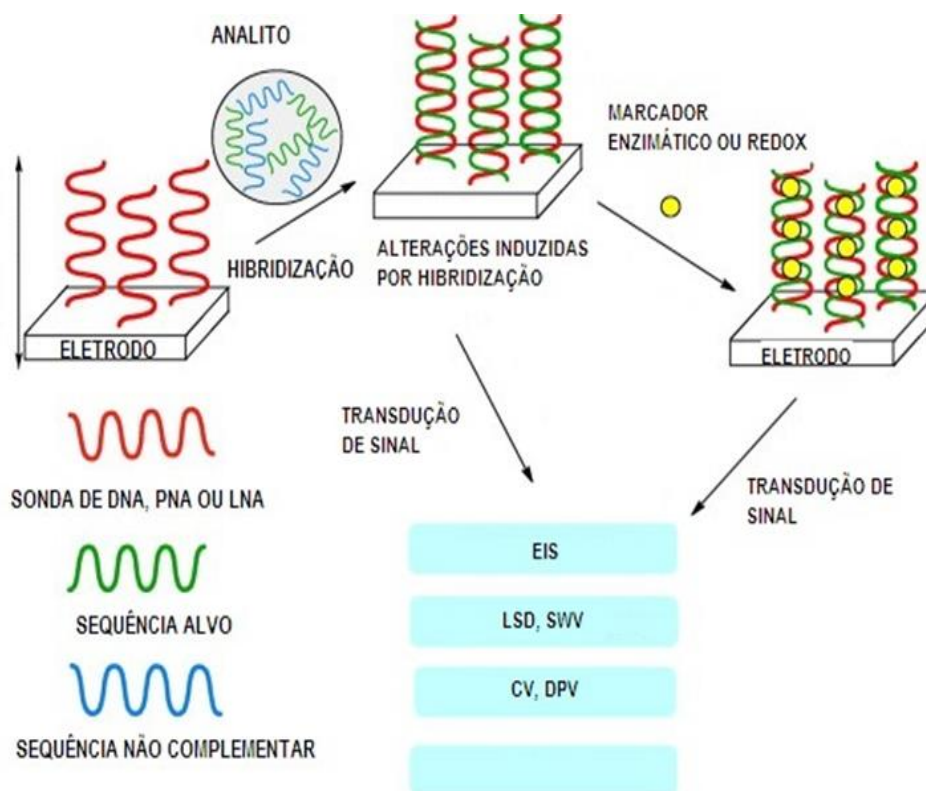
Para o funcionamento do biossensor, geralmente imobiliza-se uma molécula de DNA de fita simples (ssDNA), na superfície de um eletrodo com indicador eletroquímico, para que essa hibridize com a cadeia complementar (alvo) presente em determinada amostra – podendo esta conter também sequências não complementares (SALEH AHAMMAD; LEE; RAHMAN, 2009; MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012). O sucesso do biossensor de DNA em ser capaz de reconhecer sequências específicas ou pequenas alterações reside nas ligações específicas entre os pares de bases, sendo importante, por isso, a escolha de uma sonda ideal para o reconhecimento desejado (WANG, 1999).

Entre os tipos de biossensores de DNA, os eletroquímicos têm sido os mais desenvolvidos pelos pesquisadores devido à maior facilidade de imobilização da sonda (LIU et al., 2012) alta sensibilidade, simplicidade, baixo custo, tempo de resposta rápida, instrumentação simples e miniaturização (HE; XU; FANG, 2005). Além disso, os eletroquímicos combinam a alta sensibilidade das técnicas eletroanalíticas com a alta seletividade dos processos de reconhecimento molecular (GOODING, 2002). Entretanto ainda há certas limitações, como a falta de estabilidade a longo prazo, processo de preparação complexo (SUN et al., 2019), problemas de transferência de elétrons e de detecção de mutações de ponto (BRIONES; MORENO, 2012; SOHRABI et al., 2016) e ainda interferências

indesejáveis nas medições (MONOŠÍK; STREĎANSKÝ; ŠTURDÍK, 2012). Para isso, vem sendo cada vez mais utilizado como sonda de captura os análogos de ácidos nucleicos, que prometem cumprir essa função com maior desempenho (KARKARE; BHATNAGAR, 2006).

As moléculas de PNA e LNA possuem alta afinidade de hibridização com sequências alvo complementares, facilidade de modificação estrutural e resistência ao processamento enzimático (FORTUNATI et al., 2019). Suas propriedades podem aprimorar sensibilidade, especificidade e estabilidade dos biossensores (BRIONES; MORENO, 2012). Para a medição eletroquímica, geralmente o eletrodo modificado com sonda é imerso na solução que contém o alvo. A detecção se dá através dos sinais de corrente alterados de certos indicadores eletroativos seja diretamente da sonda/alvo ou por meio de marcadores enzimáticos ou redox (que se ligam preferencialmente ao complexo formado). Entre as técnicas utilizadas para leitura do sinal eletroquímico, são comumente aplicadas a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), Voltametria cíclica (CV) e Voltametria de pulso diferencial (DPV) (Figura 2) (LIU et al., 2012).

Figura 2 – Configuração de um biossensor eletroquímico de DNA

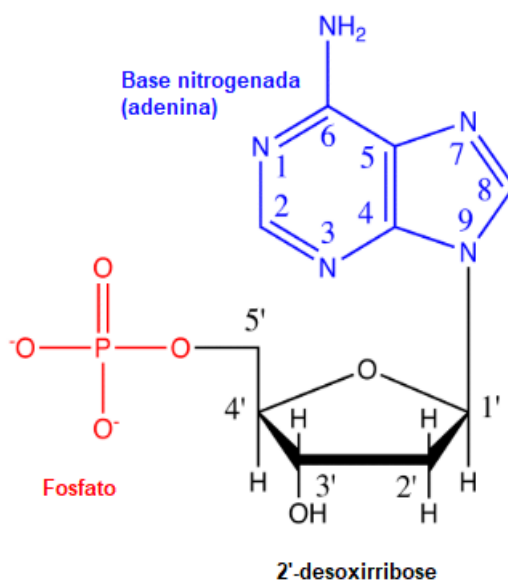


Fonte: adaptado de LIU et al. (2012)

2.2 ÁCIDOS NUCLEICOS

Os ácidos nucleicos, descobertos por Miescher em 1868, são polímeros responsáveis por armazenar a informação gênica no interior das células. São formados por unidades repetidas de nucleotídeos, que, por sua vez, têm em sua estrutura um grupo fosfato uma base nitrogenada e uma pentose (desoxirribose no caso do DNA) (Figura 3). Existem dois tipos principais de ácidos nucleicos na natureza: DNA e ácido ribonucleico (RNA) (KHEDKAR et al., 2015; PRAY, 2000).

Figura 3 – Estrutura molecular de um nucleotídeo de DNA



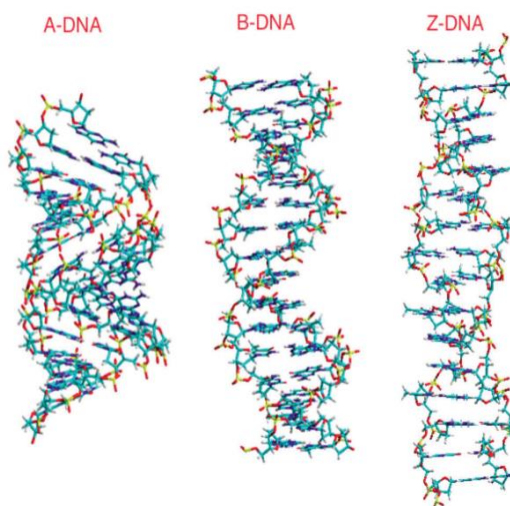
Fonte: adaptado de TRABUCO (2014)

A estrutura do DNA foi descrita pela primeira vez, em 1953, por James D. Watson e Francis Crick (KLUG, 2004). Estrutura-se em duas cadeias helicoidais em forma de dupla hélice, dispostas em torno de um eixo em comum, orientadas antiparalelamente e cada uma com uma separação de 3,4nm e um raio de 1,0nm (GHOSH; BANSAL, 2003; KHEDKAR et al., 2015). Suas duas ssDNA se ligam entre por meio do emparelhamento entre suas bases nitrogenadas, aos pares para formação da fita dupla (dsDNA) (CHARGAFF et al., 1951).

A complementaridade entre as ssDNA, a especificidade dessa ligação e a reversibilidade da formação de pontes de hidrogênio entre as bases nitrogenadas são propriedades que vêm sendo cada vez mais exploradas, visto que elas implicam não apenas na capacidade de replicação das fitas, como também na de síntese de cadeias simples para posterior sequenciamento e manipulação dessas moléculas. A nova perspectiva dada à genética frente o conhecimento de suas bases fundamentais, é o que ainda hoje permite os avanços na compreensão da área e ainda mais, nas últimas décadas, com o advento de químicas eficientes tem se tornado possível a síntese artificial de sequências dos ácidos nucleicos para diversas aplicações (NIELSEN; EGHOLM, 1999; SINDEN, 2012).

O DNA geralmente se apresenta na conformação do tipo B (B-DNA), o seu padrão molecular mais presente nas células (GHOSH; BANSAL, 2003). Porém, o DNA tem a capacidade de modificar sua geometria conforme as condições do meio, levando a formação diferentes tipos (sendo A-DNA, B-DNA e Z-DNA as mais conhecidas) de estruturas com diferentes funções biológicas (Figura 4) (USSERY, 2002).

Figura 4 – Modelos moleculares de A, B e Z-DNA



Fonte: adaptado de WOOD (2016)

Quando duas cadeias polinucleotídicas de DNA ou RNA estão ligadas entre si, formam estruturas de duplex que podem ser classificadas sobretudo nos tipos A ou B, originadas por conformações C3'-endo (tipo N) e C2'-endo (tipo S), respectivamente. A estabilidade dessas estruturas depende das ligações de

hidrogênio entre os pares de bases, bem como de interações hidrofóbicas e eletrostáticas que podem interferir ao longo do emparelhamento (ISHIGE; ITOGA; MATSUSHITA, 2018).

A conformação do tipo A é observada em duplex de RNA-RNA e possui o espaçamento entre pares de bases menor (0,26 nm) do que no tipo B (0,34 nm), presente, por sua vez, em duplex DNA-DNA. Devido a essa menor distância, o tipo A pode apresentar maior força de ligação no emparelhamento de bases, conferindo, por exemplo, uma maior afinidade ao duplex de RNA-RNA do que ao DNA-DNA (LESNIK; FREIER, 1995; NEIDLE, 2008; ISHIGE; ITOGA; MATSUSHITA, 2018).

2.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS MODIFICADOS

Oligonucleotídeos são polímeros (DNA ou RNA) relativamente pequenos (12-25 mer), podendo ser de ocorrência natural – como os microRNAs nos organismos – ou artificialmente sintetizados. Desde que se desenvolveram metodologias para a produção de oligonucleotídeos sintéticos, houve crescente demanda por estas moléculas e atualmente quase não existe campo na biologia que não explore seu potencial. São importantes ferramentas para a biologia molecular, sendo utilizados, por exemplo, como *primers* na PCR, em microarranjos, hibridização *in situ*, agentes terapêuticos e biossensores. (JOLLY; ESTRELA; LADOMERY, 2016). Consistem em moléculas análogas a ácidos nucleicos, sendo estruturalmente semelhantes aos de ocorrência natural, porém com modificações que conferem a elas propriedades superiores (LIU et al., 2012).

Inicialmente foi investigado o potencial dos oligonucleotídeos como forma de controle da expressão gênica (ZAMECNIK; STEPHENSON, 1978). Desde então, o desenvolvimento de oligonucleotídeos modificados e análogos de ácidos nucleicos continuaram cada vez mais sendo explorado também como ferramentas bioanalíticas, para diagnóstico, genômica e terapêutica (NIELSEN; EGHOLM, 1999; ØRUM; WOLTER; KONGSBAK, 2003). Suas propriedades de hibridização e reconhecimento da fita complementar tornam essas estruturas biomiméticas superiores aos ácidos nucleicos naturais, permitindo, por exemplo, detecção mais rigorosa de mutações de ponto (SNPs) a partir de concentrações cada vez menores de amostra (KONGSBAK, 2003). Muitas das modificações realizadas para a síntese de oligonucleotídeos auxiliam a superar limitações de especificidade, afinidade,

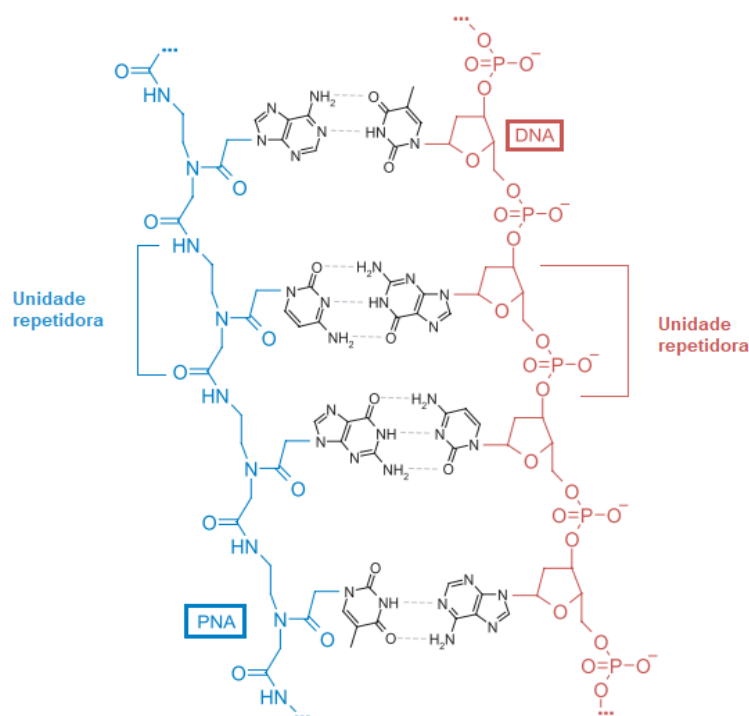
biodisponibilidade, propriedades termodinâmicas e resistência a nucleases (BELL; MICKLEFIELD, 2009; JOLLY; ESTRELA; LADOMERY, 2016).

As modificações geralmente acontecem pela incorporação de substitutos artificiais nas regiões das bases nitrogenadas, no anel da pentose ou nas ligações fosfodiéster (BELL; MICKLEFIELD, 2009). Alguns dos ácidos nucleicos artificiais são: PNA, LNA, ácido nucleico glicol (GNA) e ácido nucleico da terose (TNA) (KARKARE; BHATNAGAR, 2006). Dentre eles, o PNA e LNA se destacam por sua grande capacidade de reconhecimento e afinidade com as suas fitas complementares (BONIFAZI et al., 2015).

2.4 PNA

A molécula de PNA foi desenvolvida por Nielsen e colaboradores, em 1991. Foi originalmente projetada para reconhecimento de dsDNA via emparelhamento da base de Hoogsteen. Isso porque uma cadeia neutra (peptídeo) teria melhor desempenho para formação de uma molécula de tripla hélice. (NIELSEN; EGHOLM, 1999). É necessário conhecer a estrutura do PNA para entender suas propriedades de reconhecimento e hibridização ao DNA. Caracteriza-se como uma molécula acíclica e neutra, diferenciando-se do DNA estruturalmente por não conter pentose ou grupo fosfato. Ao invés disso, sua cadeia é formada por unidades repetidas de N-(2-aminoetil)-glicina que polimerizam por meio de ligações amida e se conectam às bases nitrogenadas por ligações metileno-carbonil conectadas a amina central da cadeia (Figura 5). O N terminal se encontra na primeira posição (esquerda) e o C terminal na direita. Apesar das diferenças na composição, a molécula de PNA possui propriedades iguais ao DNA, sendo em algumas aplicações até mesmo superiores (NIELSEN et al., 1991).

Figura 5 – Comparação entre PNA e DNA



Fonte: adaptado de WANG et al. (2004)

As propriedades físico-químicas da molécula de PNA são únicas e lhes permite vantagens como ligações mais fortes, estáveis e específicas a alvos complementares (DNA, RNA ou PNA). A ligação mais forte entre as cadeias é possível devido a neutralidade desse análogo, o que permite a falta de repulsão entre a fita de DNA e PNA e que, por sua vez, torna a hibridação PNA/DNA insensível a alterações de pH e com maior resistência à força iônica (BONIFAZI et al., 2015). Outro efeito da natureza não carregada dessa molécula é termoestabilidade conferida ao duplexes que ela forma, independente da concentração de sal na solução (ORUM et al., 1995; WANG, 1998). Em concentrações moderadas, por exemplo, as estabilidades térmicas se apresentam da seguinte forma em ordem crescente: DNA/DNA < PNA/DNA < PNA/RNA < PNA/PNA (BRIONES; MORENO, 2012).

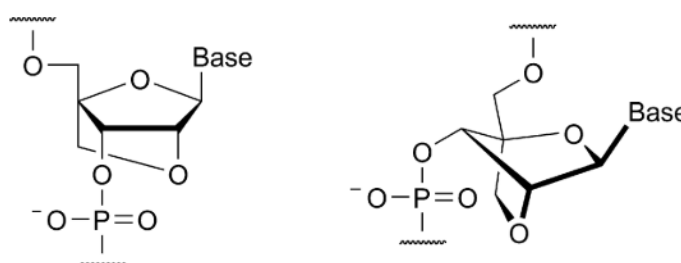
Em média, a temperatura de fusão (T_m) de um duplex de PNA/DNA é 1°C mais alta de duplex de DNA/DNA por par de base. Ele também é notavelmente mais afetado pela presença de maus pareamentos ou mutações de ponto do que a formação DNA/DNA. Uma incompatibilidade de única base resulta em uma redução de 15°C para o primeiro e 11°C para o segundo. Dessa forma, o PNA apresenta

maior afinidade pela molécula de ácido nucleico natural complementar do que a outra molécula natural equivalente, que é de carga negativa. Além disso, essa cadeia peptidomimética é mais estável, devido a insensibilidade à degradação enzimática por nucleases ou proteases. São também resistentes a ácidos fortes e bases fracas (DEMIDOV et al., 1994).

2.5 LNA

O LNA foi inicialmente descrito por Singh et al. 1998, como um análogo de RNA, encaixando-se na geometria duplex tipo A. É um ácido nucleico bicíclico, cujos nucleotídeos contêm uma unidade de metileno ligando o átomo de 2'-oxigênio ao 4'-carbono, o que bloqueia a pentose em uma conformação C'3-endo (tipo N) (Figura 6). Isso resulta em redução da flexibilidade conformacional da ribose e aumenta a organização do esqueleto de fosfato (BRAASCH; COREY, 2001; KARKARE; BHATNAGAR, 2006).

Figura 6 – Estrutura dos monômeros de LNA



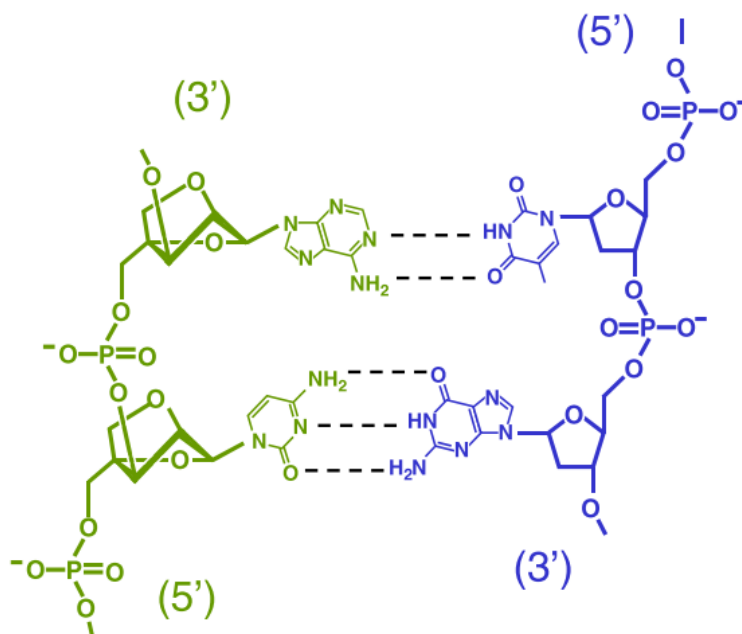
Fonte: adaptado de WENGEL et al. (2010)

Os oligonucleotídeos de LNA podem ser utilizados como substratos para uma variedade de enzimas como as que são utilizadas para PCR. Além disso, destacam-se como agentes terapêuticos, devido à sua estabilidade contra nucleases e como substratos da RNase H (ØRUM; WOLTER; KONGSBAK, 2003).

O LNA tem reconhecimento específico de alta afinidade, ideal para formação de duplex de DNA/LNA ou RNA/LNA. A hibridização de LNA com alvos de DNA ou RNA possui elevada termoestabilidade (Figura 7), demonstrado por significantes aumentos nos pontos de fusão por monômero de LNA introduzidos (valores de

ΔT_m): $\Delta T_m = +1 - +8^\circ\text{C}$ em relação DNA e $\Delta T_m = +2 - +10^\circ\text{C}$ com RNA (KURRECK, 2002; PETERSEN; WENGEL, 2003).

Figura 7 – Hibridização entre LNA (em verde) e DNA (em azul)



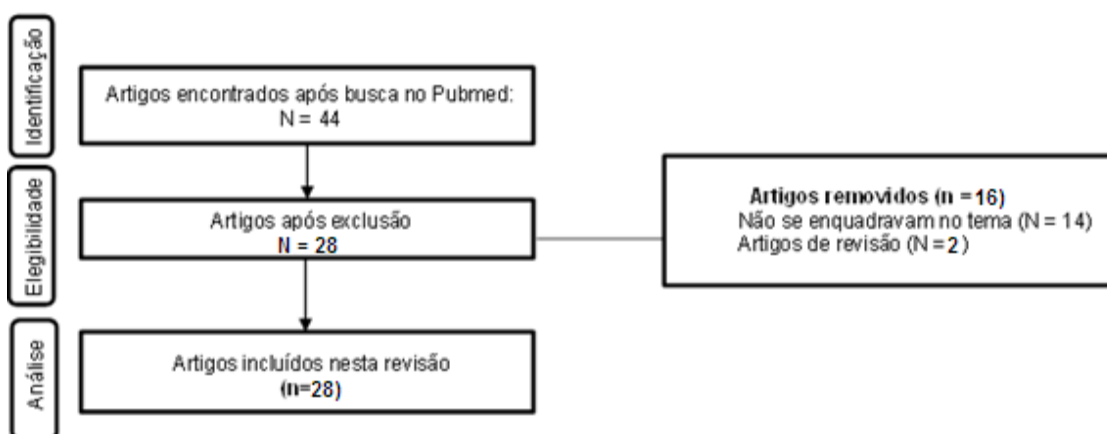
Fonte: adaptado de BRIONES; MORENO (2012)

Porém, devido à força de ligação nos duplex LNA/LNA, é importante a aplicação desses oligonucleotídeos sem segmentos autocomplementares ou ainda que eles sejam misturados com os ácidos nucleicos naturais para polimerizar oligonucleotídeos quiméricos – contendo segmentos de DNA ou RNA (KARKARE; BHATNAGAR, 2006). Tanto o aumento de T_m por nucleotídeo quanto a melhor discriminação de incompatibilidade por nucleotídeo LNA são alcançadas por oligômeros curtos, geralmente menores que 10 bases. Algumas de suas principais propriedades que tornam esses oligonucleotídeos ótimas ferramentas de bioanálise são: sua baixa toxicidade, resistência a nucleases e capacidade de formação de tríplex (BEGLEY, 2007; BRAASCH; COREY, 2001; VESTER; WENGEL, 2004).

3. METODOLOGIA

Foi realizada pesquisa bibliográfica computadorizada utilizando-se a base de dados Pubmed. A busca se deu por artigos publicados no recorte temporal de 2015 a 2020, com a utilização de descritores específicos: “*peptide nucleic acid*”, “*locked nucleic acid*” e “*eletrochemical biosensor*” combinados entre si por meio de descritores booleanos, AND e OR. A busca resultou em um total de 44 publicações. Inicialmente, os artigos foram selecionados para elegibilidade com base em seu título e resumo, sendo considerados aqueles que utilizavam os oligonucleotídeos modificados em questão como sondas para detecção em biossensores eletroquímicos. Foram excluídos os estudos que não respondiam ao objetivo do trabalho e artigos de revisão. Os critérios de inclusão foram artigos em suas versões completas e sem restrição de idioma (figura 8).

Figura 8 – Fluxograma para identificação, elegibilidade e análise dos estudos incluídos nesta revisão



Fonte: autoria própria

4. RESULTADOS

Dos 44 artigos encontrados na busca, 28 deles foram selecionados para compor esta revisão. Os resultados dos estudos foram examinados e comparados para atender ao objetivo da presente revisão, ou seja, avaliar como a utilização de sondas PNA e LNA vem sendo empregadas em biossensores eletroquímicos, bem como as vantagens que trazem ao desempenho dessas ferramentas (Tabela 1).

Tabela 1 – Biossensores eletroquímicos baseados em sondas de PNA ou LNA

Referência	Descrição do biossensor	Objetivo	Metodologia da sonda	Sensibilidade
(QIAN et al., 2015)	Aptasensor isotérmico, label free com montagem em gancho, HCR e metalização de DNA <i>in situ</i>	Deteção de trombina humana	PNA (MB2) imobilizada por ligação Au-S formando duplex com sonda de DNA (MB1)	Relação linear = 1.0×10^{-16} - 1.0×10^{-11} M LOD = 37 aM
(KONGPETH et al., 2016)	Biossensor livre de amplificação	Deteção de DNA do WSSV	AQ-PNA imobilizada por meio de quitosana	Relação linear = 0,35 - 50 nM LOD = 0,13 nM
(JOLLY et al., 2016)	Biossensor com detecção de modo duplo de detecção e amplificação por AuNPs	Deteção de miR-141, supressor tumoral, envolvido no câncer de próstata	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 1 fM - 100 nM LOD = 0.37 fM
(TEENGAM et al., 2017)	Biossensor com eletrodo modificado de G-PANI	Deteção de sequência de 14 nucleotídeos do HPV tipo 16	AQ-PNA com aminoácido em seu terminal C para adsorção eletrostática	Relação linear = 10 - 200 nM LOD = 2.3 nM
(KAISTI et al., 2017)	Sensor em tempo real, sem lavagem e <i>label free</i>	Deteção de DNA de fita simples não marcado	PNA acoplada ao portão do FET	Não relatado
(ZHANG et al., 2018b)	Biossensor ratiométrico baseado em <i>bipetal DNA walkers</i> e TMSDR	Deteção de miR-21, biomarcador de câncer de mama, de pulmão de e leucemia linfocítica crônica	Sonda de captura L-Cp marcada com LNA	Relação linear = 0,1 – 100 Fm LOD = 67 aM
(ZHANG et al., 2018a)	Biossensor eletroquímico	Deteção de 16S Rdn da <i>Escherichia coli</i>	PNA imobilizado em uma rede de eletrodos nanogap	Relação linear = 10 fM - 1 nM LOD = 5 fM
(ZHU; TRAVAS-SEJDIC, 2018)	Biossensor eletroquímico	Avaliação dos duplexes de DNA e PNA quanto a: efeitos de carga e bloqueio superficial, densidade das sondas e cinética de hibridização	Sondas de DNA e PNA imobilizadas na superfície de filmes poli (Py-co-PAA)	LOD = 7,8 pM

(CAI et al., 2018)	Biossensor com plataforma de biomarcador duplo e estratégia de amplificação dupla	Detecção de ctDNA do gene <i>PIK3CA</i> com base em dois biomarcadores: mutação genética e alteração de metilação	Sondas de PNA correspondentes a E542K e E545K do gene <i>PIK3CA</i> contendo uma incompatibilidade, imobilizadas na plataforma formando o conjugado PNA-AuNPs	Relação linear = 50-10000 fM LOD = 10 fM
(WU et al., 2020)	Biossensor <i>label free</i> com amplificação por meio do triplex-Ag/PtNCs	Detecção de SNV associado a β -talassemia	Sonda de DNA em forma de X com 4 fitas simples. Fita S1 anexada ao eletrodo por ligação Au-S. S4 possui domínio <i>toehold</i> modificado com LNA parcialmente complementar ao alvo	Relação linear = 1.0 fM -10.0 nM LOD = 0,8 fM
(TEENGAM et al., 2018)	Sensor PAD <i>label free</i>	Detecção de oligonucleotídeo sintético de 15 bases de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	acpcPNA imobilizado em papel de celulose	Relação linear = 2 nM - 200 nM LOD = 1,24 nM LOQ = 3,69 nM
(HU et al., 2018b)	Biossensor com base na substituição da fita de dsDNA por PNA e na SI-eATRP	Detecção de dsDNA	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 1,0 fM - 1,0 nM LOD = 0,47 fM
(BALA; GÓRSKI, 2018)	Biossensor eletroquímico	Determinação de Hg^{2+} em amostras ambientais de água	Fitas simples de PNA de politimina imobilizadas em eletrodo de ouro	Relação linear = 5 - 500 nmol·L ⁻¹ LOD = 4.5 nmol·L ⁻¹
(HU et al., 2018a)	Biossensor com amplificação por SI-eATRP	Detecção de T-DNA	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 10 aM - 10 pM LOD 3.2 aM
(KANGKAMANO et al., 2018)	Biossensor <i>label free</i>	miRNA-21, biomarcador expresso na maioria dos cânceres	AcpcPNA imobilizada no eletrodo PPY/AgNF/Au	Relação linear = 0.20 fM - 1.0 nM LOD = 0.20 fM
(EL-SAID; CHOI, 2019)	Biossensor eletroquímico	Detecção precoce de HCV em regiões não traduzidas	PNA-SH com uma sequência específica de bases nucleicas para monitorar o RNA do HCV	LOD = 101,5 IU/ml

(SUN et al., 2019)	Biossensor com AgNPs e amplificação por ATRP	Detecção de T-DNA	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 1pM – 10 aM LOD = 4,725 aM
(FORTUNATI et al., 2019)	Genossensor amperométrico sem amplificação e sem tratamento amostral	Detecção de DNA não amplificado extraído de soja geneticamente modificada	Sondas de PNA covalentemente ligadas à superfície de (SWCNT-SPEs)	LOD = 64 pM LOQ = 215 pM
(AOKI; TORIMURA; NAKAZATO, 2019)	Sensor chip de matriz de microeletrodos de 384 canais	Detecção simultânea de múltiplos oligonucleotídeos biomarcadores: RNAs mensageiros para genes responsivos ao estrogênio e microRNAs para biomarcadores de câncer de pulmão	4 tipos de sondas PNAs de 20 mer (PNA_1, PNA_4, PNA_5 e PNA_6) imobilizadas em eletrodos para os oito blocos do chip, separados por um filme hidrofóbico	LOD = $7,33 \times 10^{-8}$ M Relação linear = 10 nM - 1 μ M
(LIU et al., 2019)	Biossensor com dupla amplificação combinando deposição de AgNPs e SI-RAFT iniciada termicamente	Detecção de t-DNA	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 10 – 106 aM LOD = 5,58 aM
(HU et al., 2019)	Biossensor com amplificação por eRAFT	Detecção de t-DNA	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 10 aM - 10 pM LOD = 4.1 aM
(LUO et al., 2020)	Biossensor ratiométrico de sinal duplo sem amplificação	Detecção miR-21, importante biomarcador de câncer	Duas sondas modificadas por LNA na superfície do eletrodo (PLLY/GCE) por ligação amido: DNA Y1 (MB-Y1) e DNA Y2 (Fc Y2).	Relação linear = 10 fM - 70 fM LOD = 2,3 fM
(TANG et al., 2020)	Biossensor com amplificação por G-quadruplex / círculo rolante iniciada por	Detecção de mR-21	P1 modificada com LNA fixada em MNBs e hibridizada com a sonda funcional	Relação linear = 10 fM - 10nM LOD = 2.75 fM

TMSDR		P2.		
(MANSOURI et al., 2020)	Biossensor eletroquímico	Detecção de adulteração em preparações de língua bovina consumível	ssLNA tiolado imobilizado na superfície de ouro	Relação linear = 148 pM - 0.74µM LOQ = 148 pM
(ZHENG et al., 2020)	Biossensor eletroquímico com amplificação por ATRP	Detecção de t-DNA	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 0.1 fM - 10 pM LOD = 25 aM
(ZHAO et al., 2020)	Biossensor que utiliza polissacarídeo e eATRP	Detecção de CYFRA 21-1 (DNA tumoral)	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear = 100 aM - 100 pM LOD = 9.04 aM
(MOVILLI et al., 2020)	Sensor com eletrodos em micropilares de silício	Avaliação do controle da densidade de sondas e do tamanho da superfície	Sonda azido-PNA	Aumento de 1 ordem de magnitude
(MOCCIA et al., 2020)	Biossensor PAD	Detecção de miRNA-492, biomarcador de adenocarcinoma ductal pancreático	PNA tiolado no terminal 5' imobilizado por ligação Au-S	Relação linear até 100 nM LOD = 6 nM

SIGLAS: acpcPNA (PNA pirrolidinil), Ag/PtNCs (Nanoclusters bimetálicos Ag/Pt), AQ-PNA (ácido nucleico de peptídeo pirrolidinil marcado com antraquinona), ATRP (polimerização de radical de transferência de átomo), AgNPs (nanopartículas de prata), AuNPs (nanopartículas de ouro), dsDNA (DNA dupla fita), Eatrp (polimerização radical de transferência de átomo mediada eletroquimicamente), FET (transistor de efeito de campo), G-PANI (grafeno-polianilina), HCR (reação de hibridização em cadeia), HCV (vírus da hepatite C), HPV (papilomavírus humano), LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação), MNBs (esferas magnéticas), ncDNA (DNA circulante normal), PAD (dispositivo analítico de papel), SI-eATRP (polimerização radical de transferência de átomo mediada por eletroquimicamente iniciada por superfície), SI-RAFT (Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação iniciada pela superfície), SNV (variante de nucleotídeo único), ssLNA (LNA fita simples), SWCNT-SPEs (nanotubos de carbono de parede única - eletrodos impressos em tela), TMSDR (reação de deslocamento de fita mediada por toehold), WSSV (vírus da síndrome da mancha branca).

5. DISCUSSÃO

Os biossensores eletroquímicos são atualmente o padrão ouro para diversas aplicações da vida diária (MOVILLI et al., 2020) e analisando-se os que são relatados por este trabalho, pode-se observar que estão sendo desenvolvidos em uma ampla gama de aplicações, para a detecção de biomarcadores associados ao câncer (LUO et al., 2020; MOCCIA et al., 2020), a identificação de patógenos (KONGPETH et al., 2016; TEENGAM et al., 2017), de genes específicos (MOVILLI et al., 2020; WU et al., 2020) e ainda para o monitoramento ambiental e segurança alimentar (MANSOURI et al., 2020).

O bom desempenho alcançado por cada um deles só foi possível não apenas a escolha da sonda receptora a ser utilizada, mas graças à combinação de estratégias diversas para a seleção de um substrato adequado ao eletrodo, a engenharia da sonda, a forma de hibridização com o analito alvo, o princípio de detecção e amplificação de sinal. Os pesquisadores introduziram as mais variadas formas de construção, também na tentativa de melhorar capacidade detecção. Enzimas, moléculas eletroquimicamente ativas e nanomateriais são introduzidos como marcadores para amplificação de sinal. Muitos apostam também em um método *label free*, que dispensa o uso desses marcadores, evitando operações complicadas e adsorção inespecífica (WU et al., 2020). É importante que a estratégia de amplificação consiga gerar um sinal mensurável de forma simples, sem comprometer o desempenho nem o custo-benefício do biossensor (HU et al., 2018b).

A modificação de sonda por LNA pode aprimorar a estabilidade e eficiência da reação de deslocamento da fita assistida por LNA (LSDR), devido ao aumento da T_m do duplex e melhora a capacidade de diferenciação da incompatibilidade de bases, como demonstrado por Luo et al. (2020). Nesse estudo, duas sondas ligadas (ligação amido) à superfície do eletrodo PLLY/GCE (rica em locais para ligação carboxil) formavam uma estrutura de LNA em forma de “Y” que conferia uma fixação mais estável na interface do eletrodo. A LSDR fez com que a sonda Fc-Y2 se ligasse com o miR-21 alvo, dissociando-se de MB-Y1 que se dobrava em estrutura de gancho. A combinação da aplicação de LNA com a leitura ratiométrica de sinal duplo tornou o desempenho analítico menos suscetível ao estado da superfície do eletrodo, à densidade de empacotamento da sonda, ao ambiente e a fatores

artificiais. Assim como no estudo anterior, o desenvolvido por Zhang et al. (2018) também objetivou a detecção de miR-21 exossômico. Na sua presença, moléculas de DNA moviam-se ao longo das trilhas de DNA, gerando uma cascata de sinal amplificada. Esse DNA *walker* hibridizava com L-Cp (sonda marcada com LNA para maior capacidade discriminativa) formando um duplex. O miR-21 também se uniu à L-Cp através da reação de deslocamento de fita mediada por toehold (TMSDR), liberando o DNA *walker*. O mecanismo de sinal duplo propostos em ambos os estudos ajudaram na estabilidade e precisão dos resultados, visto que métodos eletroquímicos de sinal único estão mais sujeitos a sinal falso-positivo / negativo.

Outro estudo para detecção de miR-21 possuía uma sonda P1 (modificada por LNA) fixada em esferas magnéticas e hibridizada com a sonda funcional P2. O LNA modificado P1 então capturava mR-21, liberando P2 via TMSDR. Uma extremidade de P2 gerava sequências substanciais ricas em G via DNA Phi29 polimerase, enquanto a outra hibridizava com ssDNA para ancorar os produtos indicadores de sinal que produziram um sinal eletroquímico mensurável (TANG et al., 2020). No estudo de Qian et al. (2015) na presença de trombina, foi formado o complexo trombina/MB1. Devido ao duplex MB1/MB2 ser mais estável com modificação com PNA em MB2, MB1/MB2 se formava levando a liberação da trombina alvo. Assim, esta participava novamente do processo e cada cópia de alvo desencadeava vários processos de montagem entre MB1 e MB2, permitindo maior deposição de nanopartículas de prata (AgNPs) na superfície do eletrodo.

Existe ainda um sistem PNA, chamado pirrolidinil PNA (acpcPNA), que tem alta estabilidade em baixa força iônica e poderosa discriminação de incompatibilidade de acpcPNA em relação ao RNA incompatível em comparação com o outro PNA relacionado ou outros análogos de DNA. Isso foi demonstrado por um biossensor de miRNA-21 eletroquímico *label free* desenvolvido com base em um eletrodo modificado de acpcPNA / polipirrol (PPy) / nanoforma de prata (AgNF). A AgNF foi eletrodepositada como indicador redox por CV em um eletrodo de ouro funcionalizado com uma camada eletropolimerizada de PPy (polímero condutor) para imobilizar as sondas de PNA. Juntamente com a camada revestida de PPy (rica em grupos amina), AgNF também contribuiu para a disponibilidade de uma grande área de superfície efetiva. Assim, a imobilização das sondas acpcPNA pode ser realizada de forma eficaz. A hibridização entre as sondas acpcPNA e o alvo no eletrodo aumentou o isolamento da superfície e o bloqueio a transferência de

elétrons, reduzindo a corrente redox. Por isso, a sensibilidade foi melhor em concentrações mais altas de PNA. (KANGKAMANO et al., 2018).

No estudo de Zhu e Travas-Sejdic (2018) foi utilizado pirrol funcionalizado com ácido carboxílico (ácido 3-pirrolilacrílico (PAA)) para facilitar a fixação das sondas, preparação rápida do filme e detecção eletroquímica *label free*. As sondas de PNA utilizadas foram imobilizadas covalentemente com ligação amino no eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com poli (Py-co-PAA). A utilização do PNA mudou o limite de detecção (LOD) da faixa de nM para a faixa de pM (sendo 7,8 pM para PNA e 2,9 nM para DNA). De forma semelhante, a faixa dinâmica do sensor PNA se mostrou significativamente mais ampla - de faixas picomolares a micromolares, enquanto no sensor baseado em DNA variou de altas concentrações nanomolares a baixas micromolares.

A neutralidade do PNA proporciona uma impedância inicial mais baixa do filme do sensor (KANGKAMANO et al., 2018), tornando o sensor mais suscetível à presença de cargas trazidas pelo alvo de DNA carregado (SUN et al., 2019). Isso resulta na mudança significativa da curva de calibração mesmo para concentrações baixas de DNA alvo. Quando o PNA é usado como sonda, há menos impedimento eletrostático para a aproximação do DNA alvo, resultando em maior eficiência de hibridização. Isso explica a maior sensibilidade e menor LOD alcançados no estudo (ZHU; TRAVAS-SEJDIC, 2018). É também devido à neutralidade do PNA, que a cinética de hibridização do duplex PNA/DNA se torna mais rápida do que a do DNA/DNA. No estudo, essa diferença foi de 1,7 vezes e o pico elétrico máximo foi de 52% e 49%, respectivamente, em 10 min de incubação (ZHU; TRAVAS-SEJDIC, 2018).

As sondas de PNA tiveram suas propriedades de reconhecimento molecular combinadas com estratégias de polimerização radical de transferência de átomo mediada eletroquimicamente (eATRP). Para esse processo, diferentes moléculas podem ser utilizadas para se aderir ao duplex, como AgNPs (SUN et al., 2019) e ácido hialurônico (ZHAO et al., 2020), que atuam como marcadores da formação do duplex, causando uma melhoria substancial da sensibilidade de detecção (HU et al., 2019).

Foi relatado um método eletroquímico para a detecção de dsDNA com base na substituição da fita de dsDNA por PNA e o crescimento *in situ* de polímeros eletroativos através da polimerização radical de transferência de átomo mediada por

eletroquimicamente iniciada por superfície (SI-eATRP). A hibridização com dsDNA, levou à formação de uma alta densidade de heteroduplexes de PNA/DNA na superfície do eletrodo para a subsequente fixação de iniciadores de ATRP por meio da ligação fosfato-Zr⁴⁺-carboxilato (HU et al., 2018b). O estudo de Liu *et al.* (2019) tem o mesmo princípio de imobilização da sonda e detecção. Neste caso, as cadeias de polímero resultantes do processo de transferência reversível de cadeia por adição-fragmentação iniciada pela superfície (SI-RAFT) foram envolvidas por AgNPs. Isso causa uma amplificação significativa do sinal eletroquímico.

A combinação do emprego de sondas que aprimoram a afinidade do biossensor com essas estratégias de polimerização levam a uma amplificação significativa do sinal eletroquímico e melhoraram muito a sensibilidade de detecção. Conforme é possível observar na tabela esses estudos apresentaram os LODs mais baixos, em nível attomolar, bem como ampla linearidade entre o crescimento sinal eletroquímico e aumento da concentração de alvo no eletrodo (HU et al., 2018a, 2019; LIU et al., 2019; SUN et al., 2019; ZHAO et al., 2020; ZHENG et al., 2020).

Uma sonda em formato de X composta de quatro fitas ssDNA foi construída em Wu *et al.* (2020). Uma das fitas, S1, foi anexada na superfície de GE através da ligação Au-S e outra, S4 (modificada com LNA), era complementar ao DNA alvo, a variante de nucleotídeo único (SNV) de β -talassemia. Na presença do SNV, ocorreu sua hibridização com o LNA (S4) e a reação TMSDR subsequente, resultando em dissociação da sonda X em duas partes. Um dos complexos resultantes hibridizou parcialmente com nanoclusters bimetálicos Ag/Pt (triplex-Ag/PtNCs), levando ao aumento significativo do sinal de corrente.

No estudo de El-Said e Choi (2019), PNA foi usado como sonda para hibridizar com o RNA do vírus da hepatite C (HCV) em regiões não traduzidas. A presença de nanopartículas de ouro (AuNPs) na superfície do substrato de óxido de índio e estanho (ITO) aumentou a condutividade e auxiliou a imobilização direta do PNA-SH no substrato. De modo semelhante, Cai *et al.* (2018) desenvolveram uma plataforma de detecção utilizando AuNPs e apoferritina de fosfato de chumbo (LPA) para analisar o DNA circulante tumoral (ctDNA) do gene *PIK3CA*. As AuNPs serviram como nanotransportadores para imobilizar mais sondas de PNA formando o conjugado PNA-AuNPs, captando mais ctDNA e aumentando assim o sinal de detecção eletroquímica. Além disso, a apoferritina de fosfato de chumbo ligada ao anticorpo anti-5-mC (LPA-anti-5-mC) melhorou a seletividade e amplificou ainda

mais o sinal. Na presença de ctDNA, o sistema sanduíche PNA-AuNPs / ctDNA / LPA-anti-5-mC construído em Eletrodos Impressos em Tela (SPEs) gerou sinal eletroquímico com a liberação de íons de chumbo. As correntes voltamétricas dependem da concentração do PNA, do tempo de incubação do PNA e de reconhecimento do ctDNA pelo LPA-anti-5-mC (CAI et al., 2018). O complexo PNA-AuNPs atingiu uma melhor dispersão e estabilidade, devido às repulsões intermoleculares entre as estruturas fosfodiéster de PNA carregadas negativamente.

Essa formação de nanocompósitos à base de metal observada se baseia na alta afinidade da base de citosina com cátion metálico. Evita interferências sinal-ruído, exibindo uma abordagem eficaz para aumentar o sinal eletroquímico por metalização modelada por DNA (WU et al., 2020). Além da utilização de metais aliados à sonda como recurso para geração e amplificação de sinal, eles podem também ser incorporados como alvos de detecção e a aplicação de oligonucleotídeos modificados pode ajudar a contornar os problemas de estabilidade e respostas inespecíficas que limitam esse tipo de aplicação devido às características dos ácidos nucleicos naturais. O PNA foi, por exemplo, utilizado para determinação de íons Hg^{+2} em amostras ambientais. Nesse estudo, as sondas foram construídas apenas com bases de timina, que interagem com os íons. A força desta interação foi aumentada pela coordenação de Hg^{2+} por porções de peptídeo da cadeia de PNA. Para gerar o sinal de corrente, foi utilizado o marcador redox sal de sódio do ácido antraquinona-2-sulfônico (AQMS-Na). As mudanças de sinal de corrente foram duas vezes maiores utilizando receptor de PNA do que de DNA (BALA; GÓRSKI, 2018).

Movilli *et al.* (2020) avaliaram o controle da densidade da sonda na superfície do eletrodo como fator que influencia a sensibilidade. Sondas de azido-PNA foram estruturadas em micropilares de sílico revestidos em ouro funcionalizados com poli-L-lisina (PLL) modificada para detecção do gene *KRAS* 16 (DNA tumoral). Essa combinação melhorou a eficiência de hibridização em densidades elevadas pela supressão da repulsão eletrostática. A redução da distância entre os pilares (pitch) também foi importante para aumentar a área de detecção. A forma em que as matrizes de micropilar foram estruturadas permitiu aumento da superfície eletroquimicamente ativa até 1 ordem de magnitude em comparação com substratos planos, podendo acomodar mais sondas de PNA e, conseqüentemente, aumentando a resposta gerada (MOVILLI et al., 2020).

Além da maior flexibilidade, o PNA também é mais facilmente modificável para incluir grupos funcionais que auxiliam na sua imobilização em SPEs. No genossensor desenvolvido por Fortunari *et al.* (2019), nanotubos de carbono de parede única (SWCNTs) foram ligados covalentemente às sondas de PNA através de funções carboxílicas. Assim, a eficiência de reconhecimento do PNA foi combinada com o desempenho dos SWCNTs para a amplificação da leitura. As sondas eram duas: CP PNA (captura) e SP PNA (sinalização). Esta última contendo um aminoácido de carga positiva para aumentar atração com o DNA (carga negativa) conseguiu invadir a estrutura de dsDNA. A sequência de CP hibridizou com uma porção 20 mer de DNA alvo, enquanto SP PNA marcado com biotina se ligou a outra porção, formando um híbrido sanduíche. A intensidade do sinal gerado foi relacionada com a concentração de complexo CP/alvo/SP formado (FORTUNATI *et al.*, 2019).

Ao contrário dos sensores eletroquímicos de PNA anteriores, em que a sonda era fixada ao eletrodo, Teengam *et al.* (2018) desenvolveram uma estratégia onde a sonda de acpcPNA foi imobilizada covalentemente em dispositivo analítico de papel eletroquímico (ePAD) de celulose parcialmente oxidado por alquilação redutiva para detecção de *Mycobacterium tuberculosis*. A quantificação do DNA foi realizada monitorando a mudança na resistência à transferência de carga usando EIS antes e depois da formação do híbrido acpcPNA-DNA. Em um trabalho anterior, Teengam *et al.* (2017) também utilizaram um biossensor baseado em papel com acpcPNA marcado com antraquinona (AQ-PNA) e grafeno-polianilina (G-PANI) para detecção do papilomavírus humano (HPV). A sonda AQ-PNA continha um aminoácido carregado negativamente no terminal N e no terminal C para imobilização na superfície do eletrodo por meio de atração eletrostática. A detecção foi determinada pela diminuição do sinal da corrente após a adição do DNA alvo por voltametria de onda quadrada (SWV). Isso acontece devido à rigidez dos duplexes PNA-DNA, dificultando a acessibilidade da transferência de elétrons do marcador AQ para a superfície do eletrodo (TEENGAM *et al.*, 2017).

Outro biossensor de papel foi desenvolvido para a detecção de miRNA-492. A adoção de sondas PNA, em combinação com uma arquitetura *signal on* para o mecanismo de detecção, permitiu evitar problemas relacionados à estabilidade e ao efeito do pH, que muitas vezes acontecem quando DNA ou RNA são adotados como sondas. O mediador redox (carregado positivamente), $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$, se acumulou no

eletrodo de trabalho por causa da atração eletrostática pelo duplex PNA/miRNA-492 (carregado negativamente). A T_m do duplex PNA/miRNA-492 foi de 92 °C, enquanto a T_m do duplex nativo RNA/miRNA-492, foi medida em 59,2 °C e 78,4 °C, indicando a maior afinidade e estabilidade atingida pela utilização de PNA. Para adaptar a orientação do PNA, a superfície do eletrodo de trabalho foi modificada com AuNPs para fornecer pontos de ancoragem e controlar o PNA através da cauda de tiol. Para a formação de um duplex mais estável, a sonda de PNA foi projetada para ser totalmente complementar com orientação antiparalela (MOCCIA et al., 2020).

Podem também ser desenvolvidas plataformas livres de imobilização, como no estudo de Kongpeth *et al.* (2016), que utilizaram AQ-PNA como sonda em um SPE foi desenvolvida e a quitosana para interação eletrostática com o híbrido formado. Já no estudo de Aoki, Torimura e Nakazato (2019) foram utilizadas várias sondas de PNA complementares aos alvos (mRNAs de genes responsivos ao estrogênio e miRNA biomarcador para câncer de pulmão) para detecção simultânea de múltiplas sequências em um único chip sensor de 384 canais. A detecção foi baseada na arquitetura de comutação liga/desliga em eletrodo à base de Au/Cr. A hibridização do DNA_1 alvo com a sonda PNA_1 causou uma carga superficial negativa no eletrodo e, concomitantemente, induziu a repulsão eletrostática entre o marcador $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ carregado negativamente e a superfície carregada negativamente, inibindo a reação redox do marcador na superfície do eletrodo (AOKI; TORIMURA; NAKAZATO, 2019)

Outro estudo desenvolveu um método de detecção de *Escherichia coli* baseado em biossensor eletroquímico usando rDNA 16S como biomarcador alvo. O eletrodo de rede *nanogap* AuNPs-PNA foi montado na célula de detecção para transdução de sinal por meio da interconexão de AuNps feita pelas sondas de PNA tiolado no substrato do eletrodo. Na presença de fragmentos de rDNA 16S, a sonda de captura PNA hibridizou com o terminal 5' dos fragmentos e a sonda de detecção modificada com peroxidase de rábano hibridizou com uma sequência de reconhecimento de nove nucleotídeos em seu 3' terminal. Esse processo catalisou a polimerização da anilina ao longo da cadeia alvo oferecendo uma resposta condutimétrica do sensor construído. Devido à carga neutra das sondas PNA, os monômeros de anilina protonados foram distribuídos ao longo da superfície do biomarcador alvo por meio de interações eletrostáticas. A sonda de PNA com tiol em ambas as extremidades conectou as AuNPs adjacentes e funcionou como molécula

de ponte. Foi possível assim atingir maior área de superfície e maior capacidade de captura para o alvo. (ZHANG et al., 2018a).

É importante notar que existem diversos fatores relacionados à sonda que foram estudados e otimizados para que os resultados alcançados fossem obtidos. Para evitar reações inespecíficas nas respostas eletroquímicas, as camadas receptoras são bloqueadas por diferentes formas. A utilização de 6-mercaptop-1-hexanol (MCH), por exemplo, permite remover cadeias simples de PNA fracamente adsorvidas no eletrodo (BALA; GÓRSKI, 2018). O pH, tempo de polimerização (ZHENG et al., 2020), de incubação da sonda e sua concentração no eletrodo também foram considerados importantes para a performance do biossensor (MANSOURI et al., 2020). O controle da concentração da sonda é importante para evitar o excesso de analito alvo sobre a superfície de detecção (KONGPETH et al., 2016; MOVILLI et al., 2020). As interações não específicas com sequências incompatíveis, mesmo que poucas bases, podem ser reduzidas otimizando a temperatura de incubação (JOLLY et al., 2016). É importante também definir o local ideal de modificação da sonda e de quantidade de nucleotídeos para melhorar sua capacidade discriminativa (LUO et al., 2020), bem como o tempo de imobilização da sonda (MOCCIA et al., 2020).

Os estudos apresentados apresentam uma alta estabilidade em seus dispositivos. Vale destacar que o biossensor de Cai *et al.* (2018) demonstrou alta estabilidade, com 80% do sinal eletroquímico após 1 mês de armazenamento. Além disso, em relação à seletividade foram realizados testes com diferentes tipos de alvos: sequências de incompatibilidade de base única, de duas bases ou três, alvos totalmente não complementares e soluções controle em branco. Em todos os biossensores, foi possível perceber uma diferença significativa na resposta do sinal eletroquímico gerado pela hibridização com o alvo correto daqueles em que havia mau emparelhamento ou ausência do alvo (branco ou sequência diferente). É importante destacar que em alguns casos, existiram limitações de detecção específica, principalmente para os casos de incompatibilidades de base única.

A exemplo disso, no estudo de Jolly *et al.* (2016), que utilizou a combinação de PNA e AuNPs para detecção de miR-145, apesar das medições com 2 incompatibilidades e com RNA não complementar mostrarem mudança de sinal desprezível, foi observada uma mudança notável para 1 de incompatibilidade na sequência (100 nM) nas leituras de capacitância e SWV. Atribuiu-se esse fato à

posição da incompatibilidade ser no meio da sequência, visto que é a posição mais estável no híbrido. No entanto, a mudança de sinal observada ainda foi 50% menor do que a observada com o alvo complementar miR-145 (100 nM).

Da mesma forma, em Kongpeth *et al.* (2016), o sinal de resposta foi observado tanto com DNA complementar como em um dos tipos de DNA incompatível testados (DsmA11) carregando uma única base incompatível na extremidade 3' da fita. A T_m da hibridização com seu DNA complementar foi de 82,7°C. O valor de T_m do AQ-PNA diminuiu em mais de 20 °C quando hibridizado com DNA de base única incompatível (60,5 °C). Além disso, em soluções que continham tanto DNA complementar como o não complementar, uma resposta nítida ainda podia ser observada mesmo com DNA não complementar em concentração 100 vezes maior que a do DNA complementar. O biossensor também foi capaz de detectar alvos longos e duplexes (com 19pb), sem presença de sinal para dsDNA contendo uma base incompatível (dsDsmC19), confirmando assim a alta especificidade da sonda de PNA. As diferenças de T_m causadas pelas sondas modificadas é o que Cai *et al.* (2018) afirmam torná-las ideais, evitando interferências inespecíficas na plataforma do sensor em condições termicamente controladas.

Para avaliar o nível de sensibilidade, os biossensores foram submetidos a uma série de soluções com concentrações diferentes de molécula alvo e as respostas eletroquímicas para cada uma delas foi registrada, sendo seus limites de detecção e relação linear entre o logaritmo de concentração do alvo e os sinais elétricos captados apresentados na tabela 1. Os estudos demonstraram também o potencial de aplicação na prática, alcançando excelentes resultados com amostras biológicas reais (HU *et al.*, 2018a; MOCCIA *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2020) e em amostras amplificadas por PCR (AOKI; TORIMURA; NAKAZATO, 2019; TEENGAM *et al.*, 2017).

Na detecção de íons Hg^{2+} , a resposta registrada para alguns dos íons metálicos testados também apresentou aumento da corrente, porém foi três vezes menor do que de Hg^{2+} e para outros houve decréscimo do sinal. A presença de Hg^{2+} bloqueia o acesso de íons interferentes à camada receptora e a resposta do sensor para íons diferentes não é observada em soluções “mix” contendo vários íons. Os resultados indicam claramente que mesmo na presença de íons interferentes, o sensor proposto é altamente seletivo para Hg^{2+} (BALA; GÓRSKI, 2018). Para a

detecção de trombina também se observou que mesmo na presença de até 100 vezes mais de proteínas não alvo na amostra não houve aumento significativo em comparação com o teste em branco (QIAN et al., 2015).

No caso do estudo de El-Said e Choi (2019) demonstrou alta seletividade para o vírus HCV, tendo uma resposta bem mais significativa do que para o vírus da hepatite B (HBV). Da mesma forma, a detecção do HPV foi altamente seletiva frente outros tipos de HPV de alto risco (tipos 18, 31 e 33) (TEENGAM et al., 2017). No estudo de Wu et al. (2020), mesmo em amostras semelhantes às reais contendo o SNV da β -talassemia em baixas concentrações foi possível obter uma resposta diferencial, sendo esta 15 vezes maior do que para o DNA sem a mutação. A detecção do vírus WSSV também se mostrou altamente seletiva frente às respostas emitidas pelo sensor para outros vírus de camarão, chegando a capacidade de detecção de até 10 cópias de DNA WSSV na amostra (KONGPETH et al., 2016).

Essa capacidade de detectar patógenos mesmo em baixas concentrações e de forma rápida representa uma promessa de revolução às análises clínicas, visto que os métodos sorológicos para detecção de infecções são muito susceptíveis a falsos-negativos (EL-SAID; CHOI, 2019) e microbiológicos podem levar dias, enquanto nos biossensores os resultados são gerados em poucas horas (KAISTI et al., 2017; ZHANG et al., 2018a). Além disso, em relação às sequências de nucleotídeos, como microRNAs e ctDNAs, associadas à doenças os LODs baixos alcançados são importantes, pois muitas vezes esses alvos de detecção estão em níveis baixíssimos nas amostras de soro/plasma (KANGKAMANO et al., 2018).

É possível perceber ainda um potencial para monitoramento de pacientes com câncer, visto que em um dos estudos quando os pacientes eram submetidos a tratamentos benéficos, conforme havia diminuição do tamanho do tumor ou redução da dor, uma diminuição da concentração de ctDNA também foi detectada pelo biossensor. Enquanto que com tratamento ineficaz, os níveis de ctDNA tenderam a permanecer inalterados ou mesmo aumentados no dispositivo (CAI et al., 2018)

6. CONCLUSÃO

Os diferentes tipos de biossensores eletroquímicos baseados em PNA e LNA aqui relatados demonstraram ser ferramentas promissoras para as análises biomédicas e ambientais. A utilização desses tipos de sonda tem o potencial de

contribuir para o desenvolvimento de dispositivos simples e de baixo custo, que forneçam respostas rápidas e de alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Vale ressaltar a importância dessas vantagens para o diagnóstico precoce de diversos tipos de cânceres e infecções que dependem dos métodos tradicionais que são demorados, dependentes de uma estrutura sofisticada com equipamentos e diversas etapas operacionais. Pode trazer respostas rápidas e precoces (quando os níveis de biomarcadores muitas vezes são extremamente baixos) e monitoramento do câncer e de infecções. Podem ainda ser aplicados para a detecção simultânea de várias sequências alvo. Espera-se que novos estudos dos desempenhos de sondas PNA e LNA em biossensores distintos forneçam informações adicionais sobre suas limitações e formas de otimização de suas etapas, definindo, por exemplo, as estratégias *label free* e de amplificação de sinal mais eficazes e simples de serem aplicadas.

REFERÊNCIAS

AOKI, Hiroshi; TORIMURA, Masaki; NAKAZATO, Tetsuya. 384-Channel electrochemical sensor array chips based on hybridization-triggered switching for simultaneous oligonucleotide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 136, n. February, p. 76–83, 2019. DOI: 10.1016/j.bios.2019.04.047. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.04.047>>.

BALA, Agnieszka; GÓRSKI, Łukasz. Peptide nucleic acid as a selective recognition element for electrochemical determination of Hg²⁺. **Bioelectrochemistry**, [S. l.], v. 119, p. 189–195, 2018. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.09.008. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.09.008>>.

BEGLEY, Tadhg P. **Wiley Encyclopedia of Chemical Biology**. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1002/9780470048672.

BELL, Neil M.; MICKLEFIELD, Jason. Chemical modification of oligonucleotides for therapeutic, bioanalytical and other applications. **ChemBioChem**, [S. l.], v. 10, n. 17, p. 2691–2703, 2009. DOI: 10.1002/cbic.200900341.

BONIFAZI, Davide; CARLONI, Laure-elie; CORVAGLIA, Valentina; DELFORGE, Arnaud; BONIFAZI, Davide; CARLONI, Laure-elie; CORVAGLIA, Valentina; DELFORGE, Arnaud. Peptide nucleic acids in materials science. **Peptide nucleic acids in materials science**. [S. l.], v. 0968, n. November, 2015. DOI: 10.4161/adna.21941.

BRAASCH, Dwaine A.; COREY, David R. Locked nucleic acid (LNA): Fine-tuning the recognition of DNA and RNA. **Chemistry and Biology**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–7, 2001. DOI: 10.1016/S1074-5521(00)00058-2.

BRIONES, Carlos; MORENO, Miguel. Applications of peptide nucleic acids (PNAs) and locked nucleic acids (LNAs) in biosensor development. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 402, n. 10, p. 3071–3089, 2012. DOI: 10.1007/s00216-012-5742-z.

CAI, Chunyan; GUO, Zhenzhong; CAO, Yiping; ZHANG, Weiying; CHEN, Yong. A dual biomarker detection platform for quantitating circulating tumor dna (Ctdna). **Nanotheranostics**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 12–20, 2018. DOI: 10.7150/ntno.22419.

CALIL, Simone Saad; SILVA, Paulo Roberto Queiroz. Biosensors: structure, function and applicability. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu PUC-GO**, [S. l.], p. 1–20, 2011. Disponível em: <[http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf)><[http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE SAAD CALIL PAULO ROBERTO QUEIROZ.pdf](http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf)>.

CHARGAFF, E.; LIPSHITZ, R.; GREEN, C.; HODES, M. E. The composition of the deoxyribonucleic acid of salmon sperm. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], 1951.

CHEN, Dong Liang et al. Long non-coding RNA UICLM promotes colorectal cancer liver metastasis by acting as a ceRNA for microRNA-215 to regulate ZEB2 expression. **Theranostics**, [S. l.], 2017. DOI: 10.7150/thno.20942.

CUI, Miao; FENG, Hui; GUO, Dameng; WANG, Dong; ZHENG, Bo. A droplet-based microfluidic platform for kinetics-based detection of single nucleotide variation at room temperature with large discrimination factors. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], 2017. DOI: 10.1016/j.snb.2017.07.009.

DEMIDOV, Vadim V.; POTAMAN, Vladimir N.; FRANK-KAMENETSKIL, M. D.; EGHOLM, Michael; BUCHARD, Ole; SÖNNICHSEN, Søren H.; NIELSEN, Peter E. Stability of peptide nucleic acids in human serum and cellular extracts. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], 1994. DOI: 10.1016/0006-2952(94)90171-6.

EL-SAID, Waleed A.; CHOI, Jeong woo. High selective spectroelectrochemical biosensor for HCV-RNA detection based on a specific peptide nucleic acid. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], v. 217, p. 288–293, 2019. DOI: 10.1016/j.saa.2019.03.115. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.115>>.

FORTUNATI, Simone; ROZZI, Andrea; CURTI, Federica; GIANNETTO, Marco; CORRADINI, Roberto; CARERI, Maria. Novel amperometric genosensor based on peptide nucleic acid (PNA) probes immobilized on carbon nanotubes-screen printed electrodes for the determination of trace levels of non-amplified DNA in genetically modified (GM) soy. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 129, n. November 2018, p. 7–14, 2019. DOI: 10.1016/j.bios.2019.01.020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.020>>.

GHOSH, Anirban; BANSAL, Manju. A glossary of DNA structures from A to Z. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 620–626, 2003. DOI: 10.1107/S0907444903003251.

GOODING, J. Justin. Electrochemical DNA Hybridization Biosensors. **Electroanalysis**, [S. l.], v. 14, n. 17, p. 1149–1156. ST- Electrochemical DNA Hybridization, 2002.

GUPTA, Anjali; MISHRA, Anuradha; PURI, Nidhi. Peptide nucleic acids: Advanced tools for biomedical applications. **Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 259, p. 148–159, 2017. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2017.07.026. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.026>>.

HAGEDORN, Peter H. et al. Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. **Drug Discovery Today**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 101–114, 2018. DOI: 10.1016/j.drudis.2017.09.018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.018>>.

HE, Chenmeng; TANG, Yali; WANG, Sai; LIU, Jiahui; CHEN, Ying; DONG, Yiyang; SU, Haijia; TAN, Tianwei. An Electrochemical DNA Biosensor Based on Au-

reduced Graphene Oxide Nanocomposite for Transgenic Event Bt63 Detection. **Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, [S. l.], 2017. DOI: 10.2116/analsci.33.1155.

HE, Pingang; XU, Ying; FANG, Yuzhi. A review: Electrochemical DNA biosensors for sequence recognition. **Analytical Letters**, [S. l.], v. 38, n. 15, p. 2597–2623, 2005. DOI: 10.1080/00032710500369794.

HEJAZI, M. S.; POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F. Electrochemical detection of short sequences of hepatitis C 3a virus using a peptide nucleic acid-assembled gold electrode. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], 2010. DOI: 10.1016/j.ab.2009.11.019.

HU, Qiong; HAN, Dongxue; GAN, Shiyu; BAO, Yu; NIU, Li. Surface-Initiated-Reversible-Addition-Fragmentation-Chain-Transfer Polymerization for Electrochemical DNA Biosensing. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 90, n. 20, p. 12207–12213, 2018 a. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03416.

HU, Qiong; KONG, Jinming; HAN, Dongxue; NIU, Li; ZHANG, Xueji. Electrochemical DNA Biosensing via Electrochemically Controlled Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer Polymerization. **ACS Sensors**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 235–241, 2019. DOI: 10.1021/acssensors.8b01357.

HU, Qiong; WANG, Qiangwei; KONG, Jinming; LI, Lianzhi; ZHANG, Xueji. Electrochemically mediated in situ growth of electroactive polymers for highly sensitive detection of double-stranded DNA without sequence-preference. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 101, p. 1–6, 2018 b. DOI: 10.1016/j.bios.2017.09.045. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.045>>.

ISHIGE, Takayuki; ITOGA, Sakae; MATSUSHITA, Kazuyuki. **Locked Nucleic Acid Technology for Highly Sensitive Detection of Somatic Mutations in Cancer**. 1. ed., [s.l.] : Elsevier Inc., 2018. leitura incompleta 15/10/19. v. 83 DOI: 10.1016/bs.acc.2017.10.002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.acc.2017.10.002>>.

JOLLY, Pawan; BATISTUTI, Marina R.; MIODEK, Anna; ZHURAUSKI, Pavel; MULATO, Marcelo; LINDSAY, Mark A.; ESTRELA, Pedro. Highly sensitive dual mode electrochemical platform for microRNA detection. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. August, p. 1–9, 2016. DOI: 10.1038/srep36719. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep36719>>.

JOLLY, Pawan; ESTRELA, Pedro; LADOMERY, Michael. Oligonucleotide-based systems: DNA, microRNAs, DNA/RNA aptamers. **Essays in Biochemistry**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 27–35, 2016. DOI: 10.1042/EBC20150004.

KAISTI, Matti; KERKO, Anssi; AARIKKA, Eero; SAVIRANTA, Petri; BOEVA, Zhanna; SOUKKA, Tero; LEHMUSVUORI, Ari. Real-Time wash-free detection of unlabeled PNA-DNA hybridization using discrete FET sensor. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-16028-7. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-16028-7>>.

KANGKAMANO, Tawatchai; NUMNUAM, Apon; LIMBUT, Warakorn; KANATHARANA, Proespichaya; VILAIVAN, Tirayut; THAVARUNGKUL, Panote. Pyrrolidinyl PNA polypyrrole/silver nanofoam electrode as a novel label-free electrochemical miRNA-21 biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 102, p. 217–225, 2018. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.024>>.

KARKARE, Mini-review Shantanu; BHATNAGAR, Deepak. Promising nucleic acid analogs and mimics : characteristic features and applications of PNA , LNA , and morpholino. [S. l.], p. 575–586, 2006. DOI: 10.1007/s00253-006-0434-2.

KERMAN, Kagan; KOBAYASHI, Masaaki; TAMIYA, Eiichi. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. [S. l.], v. 1, 2004. DOI: 10.1088/0957-0233/15/2/R01.

KHEDKAR, G. D.; PRAKASH, B.; KHEDKAR, C. D.; CHOPADE, B. A. **Nucleic Acids**. 1. ed., [s.l.] : Elsevier Ltd., 2015. DOI: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00487-6. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00487-6>>.

KLUG, Aaron. The discovery of the DNA double helix. **Journal of Molecular Biology**, [S. l.], v. 335, n. 1, p. 3–26, 2004. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.11.015.

KONGPETH, Jutatip; JAMPASA, Sakda; CHAUMPLUK, Piyasak; CHAILAPAKUL, Orawon; VILAIVAN, Tirayut. Immobilization-free electrochemical DNA detection with anthraquinone-labeled pyrrolidiny peptide nucleic acid probe. **Talanta**, [S. l.], v. 146, p. 318–325, 2016. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.08.059. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.059>>.

KURRECK, J. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, [S. l.], 2002. DOI: 10.1093/nar/30.9.1911.

LEE, Thomas Ming Hung. **Over-the-counter biosensors: Past, present, and future**. **Sensors** 2008. DOI: 10.3390/s8095535.

LESNIK, Elena A.; FREIER, Susan M. Relative Thermodynamic Stability of DNA, RNA, and DNA:RNA Hybrid Duplexes: Relationship with Base Composition and Structure. **Biochemistry**, [S. l.], 1995. DOI: 10.1021/bi00034a013.

LIU, Ailin; WANG, Kun; WENG, Shaohuang; LEI, Yun; LIN, Liqing; CHEN, Wei; LIN, Xinhua; CHEN, Yuanzhong. **Development of electrochemical DNA biosensors**. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry** 2012. DOI: 10.1016/j.trac.2012.03.008.

LIU, Bang; SUN, Haobo; LI, Lianzhi; ZHANG, Jian; KONG, Jinming; ZHANG, Xueji. A dual signal amplification strategy combining thermally initiated SI-RAFT polymerization and DNA-templated silver nanoparticles for electrochemical determination of DNA. **Mikrochimica acta**, [S. l.], v. 187, n. 1, p. 35, 2019. DOI: 10.1007/s00604-019-3912-9.

LUO, Lipei et al. A ratiometric electrochemical DNA biosensor for detection of exosomal MicroRNA. **Talanta**, [S. l.], v. 207, n. April 2019, p. 120298, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120298. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120298>>.

MANSOURI, Maryam; KHALILZADEH, Balal; BARZEGARI, Aboufazel; SHOEIBI, Shahram; ISILDAK, Selim; BARGAHI, Nasrin; OMIDI, Yadollah; DASTMALCHI, Siavoush; RASHIDI, Mohammad Reza. Design a highly specific sequence for electrochemical evaluation of meat adulteration in cooked sausages. **Biosensors & bioelectronics**, [S. l.], v. 150, p. 111916, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111916. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111916>>.

MEHRVAR, M.; BIS, C.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; LUONG, J. H. **Fiber-optic biosensors - Trends and advances. Analytical Sciences** 2000. DOI: 10.2116/analsci.16.677.

MOCCIA, Maria; CARATELLI, Veronica; CINTI, Stefano; PEDE, Biagio; AVITABILE, Concetta; SAVIANO, Michele; IMBRIANI, Anna Lisa; MOSCONE, Danila; ARDUINI, Fabiana. Paper-based electrochemical peptide nucleic acid (PNA) biosensor for detection of miRNA-492: a pancreatic ductal adenocarcinoma biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 165, p. 112371, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112371. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112371>>.

MONOŠÍK, Rastislav; STREĎANSKÝ, Miroslav; ŠTURDÍK, Ernest. Biosensors - classification, characterization and new trends. **Acta Chimica Slovaca**, [S. l.], 2012. DOI: 10.2478/v10188-012-0017-z.

MOREIRA, C. S.; LIMA, Antonio M. N.; NEFF, H.; NETO, Arlindo G. Barreto; LOUREIRO, Fernanda C. C. L. Biosensores: tecnologia e Aplicações. **Universidade Federal da Paraíba**, [S. l.], p. 1–18, 2010. Disponível em: <<http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/biotecnologia/biosensores.pdf>>.

MOVILLI, Jacopo; KOLKMAN, Ruben W.; ROZZI, Andrea; CORRADINI, Roberto; SEGERINK, Loes I.; HUSKENS, Jurriaan. Increasing the Sensitivity of Electrochemical DNA Detection by a Micropillar-Structured Biosensing Surface. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, [S. l.], v. 36, n. 16, p. 4272–4279, 2020. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c00144.

NAKAMURA, Hideaki; KARUBE, Isao. **Current research activity in biosensors. Analytical and Bioanalytical Chemistry** 2003. DOI: 10.1007/s00216-003-1947-5.

NEIDLE, Stephen. DNA Structure as Observed in Fibers and Crystals. In: **Principles of Nucleic Acid Structure**. [s.l.: s.n.]. DOI: 10.1016/b978-012369507-9.50004-2.

NIELSEN, P. E.; EGHOLM, M. An introduction to peptide nucleic acid. **Current issues in molecular biology**, [S. l.], v. 1, n. 1–2, p. 89–104, 1999.

NIELSEN, Peter E.; EGHOLM, Michael; BERG, Rolf H.; BUCHARDT, Ole. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. **Science**, [S. l.], 1991. DOI: 10.1126/science.1962210.

ORUM, H.; NIELSEN, P. E.; JORGENSEN, M.; LARSSON, C.; STANLEY, C.; KOCH, T. Sequence-specific purification of nucleic acids by PNA-controlled hybrid selection. **BioTechniques**, [S. l.], 1995.

ØRUM, Henrik; WOLTER, Andreas; KONGSBAK, Lars. Locked nucleic acids (LNA) and medical applications. **Letters in Peptide Science**, [S. l.], v. 10, n. 3–4, p. 325–334, 2003. DOI: 10.1007/BF02484567.

PATHAK, Priya; KATIYAR, V. K.; GIRI, Shibashish. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **Cancer Research**, [S. l.], 2007. DOI: 10.2240/azojono0116.

PETERSEN, Michael; WENGEL, Jesper. LNA: A versatile tool for therapeutics and genomics. **Trends in Biotechnology**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 74–81, 2003. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)00038-0.

PRAY, L. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. **Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers**, [S. l.], 2000. DOI: 10.1016/j.scienta.2016.11.038.

QIAN, Yong; GAO, Fenglei; DU, Lili; ZHANG, Yu; TANG, Daoquan; YANG, Dongzhi. A novel label-free and enzyme-free electrochemical aptasensor based on DNA in situ metallization. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 74, p. 483–490, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2015.06.078. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.078>>.

SALEH AHAMMAD, A. J.; LEE, Jae Joon; RAHMAN, Md Aminur. **Electrochemical sensors based on carbon nanotubes**. **Sensors** 2009. DOI: 10.3390/s90402289.

SINDEN, Richard R. DNA Structure and Function. **DNA Structure and Function**, [S. l.], v. 282, p. 1–398, 2012. DOI: 10.1016/C2009-0-02451-9.

SOHRABI, Nasrin; VALIZADEH, Alireza; FARKHANI, Samad Mussa; AKBARZADEH, Abolfazl. Basics of DNA biosensors and cancer diagnosis. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, [S. l.], v. 44, n. 2, p. 654–663, 2016. DOI: 10.3109/21691401.2014.976707. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/21691401.2014.976707>>.

SUN, Haobo; KONG, Jinming; WANG, Qiangwei; LIU, Qianrui; ZHANG, Xueji. Dual Signal Amplification by eATRP and DNA-Templated Silver Nanoparticles for Ultrasensitive Electrochemical Detection of Nucleic Acids. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [S. l.], v. 11, n. 31, p. 27568–27573, 2019. DOI: 10.1021/acsami.9b08037.

TANG, Xiaoqi; WANG, Yang; ZHOU, Lin; ZHANG, Wenqing; YANG, Sha; YU, Lianyu; ZHAO, Shuang; CHANG, Kai; CHEN, Ming. Strand displacement-triggered G-quadruplex/rolling circle amplification strategy for the ultra-sensitive electrochemical sensing of exosomal microRNAs. **Microchimica Acta**, [S. l.], v. 187, n. 3, 2020. DOI: 10.1007/s00604-020-4143-9.

TEENGAM, Prinjaporn; SIANGPROH, Weena; TUANTRANONT, Adisorn;

HENRY, Charles S.; VILAIVAN, Tirayut; CHAILAPAKUL, Orawon. Electrochemical paper-based peptide nucleic acid biosensor for detecting human papillomavirus. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 952, p. 32–40, 2017. DOI: 10.1016/j.aca.2016.11.071. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2016.11.071>>.

TEENGAM, Prinjaporn; SIANGPROH, Weena; TUANTRANONT, Adisorn; VILAIVAN, Tirayut; CHAILAPAKUL, Orawon; HENRY, Charles S. Electrochemical impedance-based DNA sensor using pyrrolidiny peptide nucleic acids for tuberculosis detection. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1044, p. 102–109, 2018. DOI: 10.1016/j.aca.2018.07.045. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.07.045>>.

TRABUCO, Leonardo; VILLA, Elizabeth. **Case Study : DNA**. [s.l: s.n.].

TRNKOVA, Libuse; JELEN, Frantisek; PETRLOVA, Jitka; ADAM, Vojtech; POTESIL, David; KIZEK, Rene. Elimination voltammetry with linear scan as a new detection method for DNA sensors. **Sensors**, [S. l.], v. 5, n. 6–10, p. 448–464, 2005. DOI: 10.3390/s5060448.

USSERY, David W. DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. **Encyclopedia of Life Sciences**, [S. l.], n. 1998, 2002. DOI: 10.1038/npg.els.0003122.

VÁLÓCZI, Anna; HORNYIK, Csaba; VARGA, Nóra; BURGYÁN, József; KAUPPINEN, Sakari; HAVELDA, Zoltán. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. **Nucleic acids research**, [S. l.], 2004. DOI: 10.1093/nar/gnh171.

VESTER, Birte; WENGEL, Jesper. LNA (Locked Nucleic Acid): High-affinity targeting of complementary RNA and DNA. **Biochemistry**, [S. l.], v. 43, n. 42, p. 13233–13241, 2004. DOI: 10.1021/bi0485732.

WANG, Gan; XU, Xiaoxin S. Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation. **Cell Research**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 111–116, 2004. DOI: 10.1038/sj.cr.7290209.

WANG, Joseph. DNA biosensors based on peptide nucleic acid (PNA) recognition layers. A review. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 13, n. 7–8, p. 757–762, 1998. DOI: 10.1016/S0956-5663(98)00039-6.

WANG, Joseph. PNA Biosensors for Nucleic Acid Detection. [S. l.], v. 1, p. 117–122, 1999.

WOOD, Bayden R. The importance of hydration and DNA conformation in interpreting infrared spectra of cells and tissues. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], v. 45, n. 7, p. 1980–1998, 2016. DOI: 10.1039/c5cs00511f. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5CS00511F>>.

WU, Fang; LIN, Qian; WANG, Liangliang; ZOU, Yulian; CHEN, Mei; XIA, Yaokun; LAN, Jianming; CHEN, Jinghua. A DNA electrochemical biosensor based on triplex DNA-templated Ag/Pt nanoclusters for the detection of single-nucleotide

variant. **Talanta**, [S. l.], v. 207, n. December 2018, p. 120257, 2020. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120257. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120257>>.

ZAMECNIK, P. C.; STEPHENSON, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], 1978. DOI: 10.1073/pnas.75.1.280.

ZHANG, Jialin; WANG, Jiajia; ZHANG, Xiaoqing; HE, Fengjiao. Rapid detection of Escherichia coli based on 16S rDNA nanogap network electrochemical biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 118, p. 9–15, 2018 a. DOI: 10.1016/j.bios.2018.07.041. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.041>>.

ZHANG, Jing; WANG, Liang Liang; HOU, Mei Feng; XIA, Yao Kun; HE, Wen Hui; YAN, An; WENG, Yun Ping; ZENG, Lu Peng; CHEN, Jing Hua. A ratiometric electrochemical biosensor for the exosomal microRNAs detection based on bipedal DNA walkers propelled by locked nucleic acid modified toehold mediate strand displacement reaction. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 102, p. 33–40, 2018 b. DOI: 10.1016/j.bios.2017.10.050. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.10.050>>.

ZHAO, Liying; YANG, Huaixia; ZHENG, Xiaoke; LI, Jinge; JIAN, Lihe; FENG, Weisheng; KONG, Jinming. Dual signal amplification by polysaccharide and eATRP for ultrasensitive detection of CYFRA 21–1 DNA. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 150, p. 111895, 2020. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111895. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111895>>.

ZHENG, Xiaoke; LIU, Qianrui; LI, Manman; FENG, Weisheng; YANG, Huaixia; KONG, Jinming. Dual atom transfer radical polymerization for ultrasensitive electrochemical DNA detection. **Bioelectrochemistry**, [S. l.], v. 133, p. 107462, 2020. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2020.107462. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107462>>.

ZHU, Bicheng; TRAVAS-SEJDIC, Jadranka. PNA versus DNA in electrochemical gene sensing based on conducting polymers: Study of charge and surface blocking effects on the sensor signal. **Analyst**, [S. l.], v. 143, n. 3, p. 687–694, 2018. DOI: 10.1039/c7an01590a.