



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

NATÁLIA CYBELLE LIMA OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA AS CIÊNCIAS FORENSES

Recife

2017

NATÁLIA CYBELLE LIMA OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA AS CIÊNCIAS FORENSES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutorado.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Recife

2017

Catálogo na fonte
Rafaela Mello
CRB 1537

Oliveira, Natália Cybelle Lima
Desenvolvimento de Biossensores para as Ciências Forenses /
Natália Cybelle Lima Oliveira - Recife: O Autor, 2017.

120 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho.

**Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.**

Inclui referências e anexos.

- 1. Biossensores 2. Sensores Biomédicos I. José Luiz de Lima
Filho (orientador) II. Título**

610.28

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-235

NATÁLIA CYBELLE LIMA OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES PARA AS CIÊNCIAS FORENSES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutorado.

Aprovada em 20/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (Orientador)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr^a Danyelly Bruneska Martins Gondim (Membro Interno)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr^a Maria do Carmo de Barros Pimentel (Membro Externo)
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr^a. Sandra Maria dos Santos (Membro Externo)
Gerencia Geral de Polícia Científica – GGPOC
Secretaria de Defesa Social do Estado de Pernambuco - SDS-PE

Dr Ricardo Saldanha Honorato (Membro Externo)
Departamento de Polícia Federal
Superintendência Regional em Pernambuco

*Dedico este trabalho a fonte de toda sabedoria e amor do universo.
Aos meus pais, Marco e Marlene e a minha irmã, Nayara:
este trabalho não seria possível sem o apoio
de vocês nas horas mais difíceis da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a Deus, fonte de toda sabedoria e de amor deste universo, por todas as conquistas a mim atribuídas;

Gostaria de agradecer aos meus pais, Marlene e Marcos, pelo carinho, apoio incondicional, e por sempre estarem dispostos a me ouvirem em todos os momentos da minha vida. Também queria agradecer ao maior e melhor presente que Deus me deu na vida: a minha irmã Nayara. Obrigada por sempre me compreender e ser a minha melhor companheira de aventuras.

Agradeço profundamente a meu orientador e mestre José Luiz de Lima Filho, por sempre ter depositado toda sua confiança em mim e também por ser um verdadeiro exemplo de um líder: aquele que incentiva e caminha junto com os seus companheiros.

À Sandra Santos, que me incentivou e me guiou para chegar onde hoje eu me encontro.

Aos meus companheiros de laboratório que foram os alicerces para o meu desenvolvimento intelectual, humanístico, bem como as bases sólidas do presente trabalho. Vocês fizeram os meus dias felizes. Obrigada pela amizade e sabedoria doadas para mim.

Gostaria de agradecer ao Professor Christopher Robin Lowe, que me acolheu em seu grupo de pesquisa e me deu a oportunidade de realizar a pesquisa científica em uma das universidades mais prestigiadas do mundo, a Universidade de Cambridge. Sou muito grata por todo o ensinamento que me foi passado.

Agradeço aos meus landlords Sudhir e Shahla Agarwala que me acolheram carinhosamente como um membro da família nos meus primeiros dias no Reino Unido. Agradeço também às valiosas amigas que conquistei durante o período do meu intercâmbio. Obrigada a Graziella, Bahja, Gita, Jacky, Xinyue e Nan que me ajudaram nas descobertas científicas e humanitárias sobre o mundo. Obrigada pelas risadas, pelo carinho e pelo apoio durante os dias difíceis dessa jornada. Não poderia deixar de mencionar Gabi, Pablo e Cansu, que foram tão importantes para mim no término desse ciclo. Gratidão eterna a vocês.

. Queria agradecer aos meus preciosos amigos da minha querida Máquina de Sonhos Cia de Teatro. Nós nos formamos juntos, crescemos juntos e florescemos em comunhão. Gratidão por vocês existirem em minha vida! Agradeço também aos mestres do teatro que passaram por minha vida e que ainda me ensinam valores preciosos sobre a arte e a vida.

Aos meus amigos que me acompanharam desde os primórdios da minha vida e aos amigos que conquistei ao longo dos quatro anos do doutorado de todas as minhas esferas sociais. Rimos juntos, reclamamos juntos, festejamos juntos e, principalmente, evoluímos juntos! Muito obrigada.

“Na infinidade da vida onde estou tudo é perfeito, pleno e completo, e, no entanto, a vida está sempre mudando. Não existe começo nem fim, somente um constante ciclar e reciclar de substância e experiências. A vida nunca está emperrada, estática ou rançosa, pois cada momento é sempre novo e fresco. Eu sou uno com o poder que me criou e esse poder me deu o poder de criar minhas próprias circunstâncias. Regozijo-me no conhecimento de que eu tenho o poder de minha própria mente para usar de qualquer forma que eu escolher. Cada momento da vida é um novo ponto de começo à medida que nos afastamos do velho. Este momento é um novo ponto de começo para mim bem aqui e agora mesmo. Tudo está bem no meu mundo.”

Louise Hay, *Você Pode Curar Sua Vida*

RESUMO

A necessidade atual em descentralizar testes analíticos vem estimulando largamente pesquisas no desenvolvimento de biossensores nos mais diversos campos estratégicos, como nas ciências forenses, tornando-se um dos setores que crescem mais rápido no mundo. Pelo fato de que as técnicas rotineiramente usadas como testes de triagem em perícias criminais exibem inespecificidade, além da exigência de testes mais complexos para confirmar a detecção de uma molécula de interesse, a construção de tecnologias simples e portáteis, como os biossensores, torna-se crucial para a suplantação dessas dificuldades. O presente trabalho tem como objetivo desenvolver biossensores como modelos de testes confirmatórios para as ciências forenses. Dispositivos eletroquímicos e holográficos foram desenvolvidos para a detecção de moléculas de interesse forense, como sequências de DNA e cocaína. Além desses estudos, o uso de marcadores moleculares de identificação humana em casos de crimes foi analisado quanto a sua aplicabilidade como biorreceptores e como fonte de dados sociodemográficos relativos a crimes violentos. Pelos resultados apresentados, os biossensores foram sensíveis à presença de DNA, sendo capaz de detectá-lo mesmo em condições adversas, bem como à presença de cocaína, em que os correspondentes sistemas apresentaram um limite de detecção de 3,09 nM e 5,69mM, respectivamente. Além disso, os dados fornecidos pelas análises de casos de crime de estupro e de morte violenta atrelados ao uso de marcadores moleculares foram capazes de traçar um perfil sociodemográfico de vítimas acometidas por crimes violentos no Brasil, o que contribui para uma análise epidemiológica da criminalidade em escala global. Desse modo, o uso de biossensores atrelados a marcadores moleculares poderá contribuir como um rápido e efetivo método analítico em laboratórios forenses.

Palavras chaves: Biossensor, Ciências Forenses, Eletroquímica, Holografia, Marcadores Moleculares

ABSTRACT

Biosensors Market has witnessed significant advances over the years, becoming one of the fastest growing sectors in the world. Due to the high demand for decentralizing analytical tests, biosensors research has been applied in many fields, such as Forensic Sciences. Standard methods used as screening tests in criminal investigations usually exhibit disadvantages such as lack of specificity, which requires further confirmation with other more complex analytical methodologies generally based on some instrumental technique. Thus, the design of portable and simple devices, like biosensors, becomes fundamental to overcome those problems. The aim of this work is to develop biosensors as model for confirmatory tests for Forensic Sciences applications. Electrochemical and holographic platforms were developed in an attempt to detect compounds with impact in forensic (bio) chemical analyses, like DNA sequences and cocaine. In addition to these studies, the use of molecular markers for human identification used in criminal cases was analyzed regarded to its applicability as a bioreceptor and a source for sociodemographic data for violent crimes. The results showed that the biosensors were sensitive to the presence of DNA, even in harsh conditions as well as to cocaine, in which those different systems presented a limit of detection of 3,09nM and 5.69mM, respectively. Also, data recovered from rape cases and violent death were able to make victim profiling of those crimes occurred in Brazil, which contribute to epidemiological studies of violent crimes at a global scale, helping to prevent their occurrence. Thereby, using biosensors associated with molecular markers may contribute as a fast and effective analytical method in forensic laboratories.

Keywords: Biosensor, Electrochemistry, Forensic Sciences, Holography, Molecular Markers

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Elementos de um biossensor	15
Figura 2: Variedades de biorreceptores usados em biossensores.	19
Figura 3: Aptassensor eletroquímico microfluídico.	22
Figura 4: tapas para a detecção de SNPs em chip óticos	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ala	- Alanina
Arg	- Arginina
CSI	- Crime Scene Investigation
DMPA	- 2-Dimethoxy-2-phenyl Acetophenone
DNA	- Deoxyribonucleic Acid
DPV	- Differential Pulse Voltammetry
dsDNA	- Double Strand Deoxyribonucleic Acid
EG	- Eletrodos de grafite
EDMA	- Ethylene Glycol Dimethacrylate
FT-IR	- Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GABA	- γ -Aminobutyric Acid
GC-MS	- Gas Chromatography – Mass Spectrometry
Glu	- Glutamina
GOx	- Glicose Oxidase
HEMA	- 2- Hydroxyethyl Methacrylate
HPR	- Horseradish Peroxidase
InDels	- Insertion Deletion Polymorphism
IR	- Infravermelho (Infra-Red)
Leu	- Leucina
MACR	- Methacrolein
MATLAB	- Matrix Laboratory
MIPs	- Molecularly Imprinted Polymers
NAD ⁺	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Nd-YAG	- Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet
NMR	- Nuclear Magnetic Resonance

PBA	- 1-Pyrenebutyric Acid
PCR	- Polymerase Chain Reaction
P&D	- Pesquisa e Desenvolvimento
PGE	- Pencil Graphite Electrode
Phe	- Fenilalanina
PoC	- Point-of-Care
QD	- Quantum Dots
Ser	- Serina
SNPs	- Single Nucleotide Polymorphism
ssDNA	- Single Strand Deoxyribonucleic Acid
STRs	- Short Tandem Repeats
Tyr	- Tirosina
Ugi 4-CR	- Ugi four-component Reaction
UHP	- Ultra pure water
UV	- Ultravioleta
Val	- Valina
3D	- Three Dimensional
5-FAM	- 5-Carboxyfluorescein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	IMPACTOS ECONÔMICOS NO MERCADO MUNDIAL DE BIOSSENSORES.....	16
2.2	BIOSSENSORES: DEFINIÇÕES E ORIGEM.....	17
2.3	CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES.....	19
2.3.1	De acordo com o elemento biológico.....	19
2.3.2	De acordo com o transdutor.....	21
2.4	APLICAÇÕES DE BIOSSENSORES.....	23
2.5	CIÊNCIAS FORENSES.....	23
2.6	PAPEL DOS BIOSSENSORES NAS ANÁLISES FORENSES.....	24
2.6.1	Aplicações na toxicologia: detecção de drogas ilícitas.....	25
2.6.2	Aplicações na Bioquímica Forense: detecção de fluidos corporais humanos.....	26
2.6.3	Aplicações em Genética Forense: Identificação humana.....	27
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	PUBLICAÇÕES	31
	ARTIGO 1 - DNA BIOSENSOR AS A CONFIRMATORY TEST: STUDIES OF HOUSEHOLD CLEANERS EFFECTS OF ONTO ELECTROCHEMICAL DNA DETECTION.....	31
	ARTIGO 2 – DNA GENOTYPING ANALYSIS OVERVIEW: PROFILE OF RAPE CASES IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL	35
	ARTIGO 3 - A HOLOGRAPHIC SENSOR BASED ON A BIOMIMETIC AFFINITY LIGAND FOR THE DETECTION OF COCAINE.....	38
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
	REFERÊNCIAS.....	66
	APÊNDICE - CAPÍTULO DE LIVRO: BIOSSENSORES APLICADOS ÀS CIÊNCIAS FORENSES.....	72
	ANEXO A – PATENTE: PLATAFORMA TRANSDUTORA COMPOSTA DE 3,4- ETILENODIOXITIOFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO AMINOBENZENOSULFÔNICO	82
	ANEXO C – TRACE SAMPLES OF HUMAN BLOOD IN MOSQUITOES AS A FORENSIC INVESTIGATION TOOL	93
	ANEXO D - A SENSITIVE AND SELECTIVE LABEL-FREE ELECTROCHEMICAL DNA BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF SPECIFIC DENGUE VIRUS SEROTYPE 3 SEQUENCES	104

1 INTRODUÇÃO

A indústria dos biossensores tem alcançado significantes avanços tecnológicos ao longo dos últimos anos. O mercado mundial de biossensores é um dos setores que crescem mais rápido no mundo, o qual foi avaliado em US\$ 12.455,8 milhões em 2013. Apesar de altos custos iniciais de produção, as empresas investem maciçamente no setor, devido a suas vantagens inerentes, como alta sensibilidade e especificidade, compatibilidade com microtecnologias, portabilidade e rapidez nas análises.

Devido à necessidade do mercado tecnológico em descentralizar testes analíticos para que possam ser realizados remotamente em qualquer lugar e em quaisquer condições, pesquisas nos mais diversos campos estratégicos tem sido realizadas nos últimos anos, como nas ciências forenses. Nesse ramo, que visa aplicar o conhecimento e a tecnologia da ciência no cumprimento das leis sociais, as técnicas utilizadas permitem identificar a presença de pessoas em uma cena de crime, bem como confirmar ou refutar fatos importantes para investigações criminais. Entretanto, tais métodos exibem desvantagens significantes, como a ocorrência de resultados falso-positivos e negativos, incapacidade de análise quantitativa e, em alguns casos, inespecificidade. Devido a esse fato, os resultados fornecidos por esses métodos exigem uma posterior confirmação, através de outras metodologias analíticas mais complexas, geralmente baseadas em técnicas instrumentais. O desenvolvimento de biossensores aplicados à detecção e identificação de compostos químicos e biológicos específicos em cenas de crime constitui-se, então, numa excelente alternativa para o cenário atual das ciências forenses. Sua instrumentação relativamente simples, que diminui consideravelmente o número de etapas para o processamento e análise das amostras, não exige o uso de profissionais especializados para a sua utilização, o que resulta numa agilidade na tomada de decisões e aplicação de medidas efetivas nos processos penais, bem como na redução dos custos dessas operações para os Estados.

Baseado em tais fatos, o desenvolvimento de biossensores como modelo de testes confirmatórios foi analisado no presente estudo, utilizando-se de métodos eletroquímicos e holográficos. Ainda, a aplicabilidade de marcadores moleculares utilizados na identificação humana como elementos biorreceptores, bem como sua utilização na geração de dados sociodemográficos relativos a casos criminais também foram avaliados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPACTOS ECONÔMICOS NO MERCADO MUNDIAL DE BIOSSENSORES

A indústria dos biossensores tem atingido significantes avanços tecnológicos ao longo dos últimos anos. Os biossensores têm atraído a atenção da comunidade científica e industrial por combinar habilidades interdisciplinares de biólogos, físicos, químicos e engenheiros para promover soluções inovadoras para problemas analíticos (MONGRA; KAUR, 2012).

O mercado mundial de biossensores é um dos setores que crescem mais rápido no mundo, o qual foi avaliado em US\$ 12.455,8 milhões em 2013. Com um crescimento de 8,1% por ano, estima-se que esse número atinja quase US\$ 22 milhões em 2020. Os Estados Unidos e a Europa são os mercados dominantes do setor, arrecadando cerca de 70% dos rendimentos, tendo empresas como Roche Diagnostics, Abbot Diagnostics, LifeScan, Bayer Diagnostics, Affymetrix e Nova Biomedical como destaques mundiais (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2013).

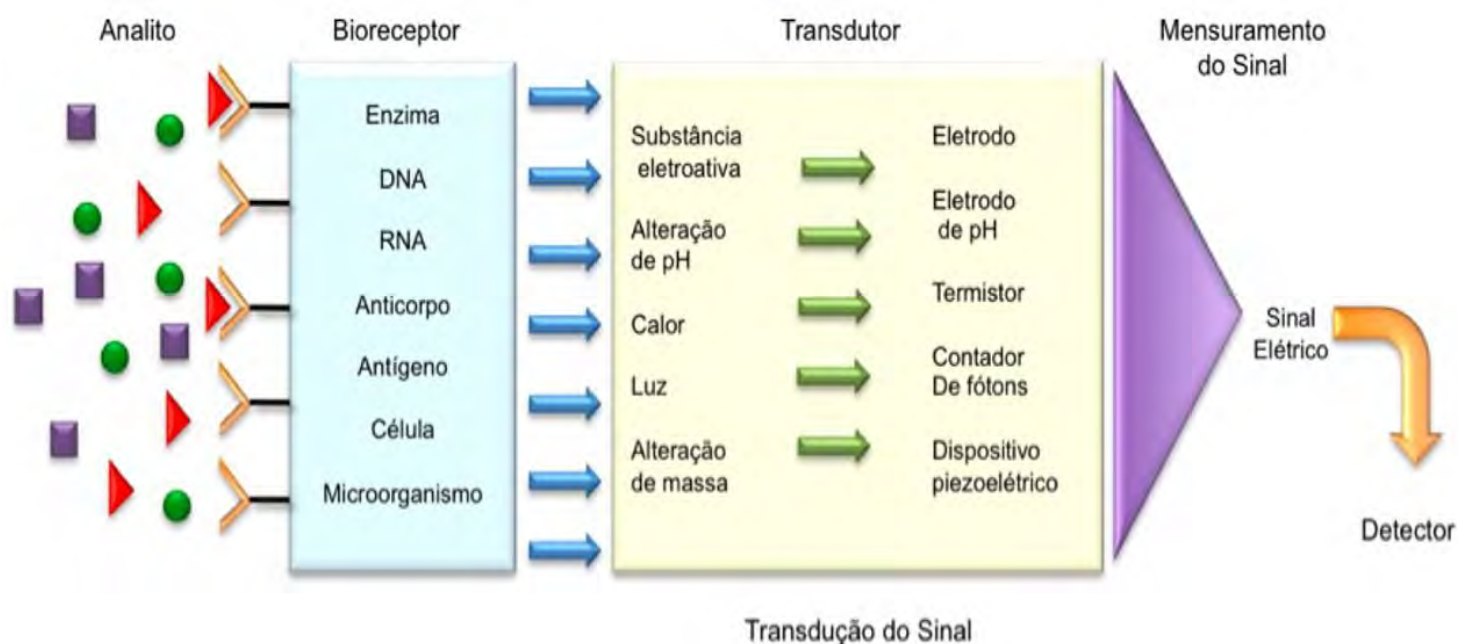
Este mercado possui um capital intenso e precisa de altos investimentos, especialmente em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D), para promover suas inovações tecnológicas. Apesar dos altos custos iniciais de produção, as empresas investem maciçamente no setor, especialmente na área médica, para sistemas do tipo Point-of-care (PoC) e em biossensores não invasivos, como uma forma de ajudar os pacientes a monitorar suas condições físicas constantemente e em tempo real por longos períodos (HONG et al., 2016).

Além da área médica, os biossensores agora estão sendo aplicados em outros ramos, como na indústria alimentícia e em segurança. Para alavancar a oferta de biossensores para diferentes aplicações, os fabricantes estão aumentando os investimentos em novos campos, como nanobiotecnologia, microfluídos e tecnologia de imobilização, biossensores impressos, microfabricação e outros, bem como estabelecendo colaborações com empresas farmacêuticas a fim de produzirem produtos de ponta, com a capacidade de fornecer resultados acurados a baixíssimos custos de produção em massa (BOBADE; KALOREY; WARKE, 2016; TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2012).

2.2 BIOSSENSORES: DEFINIÇÕES E ORIGEM

Por sua interdisciplinaridade intrínseca, o termo biossensor possui diferentes conceitos, dependendo do campo aplicado. Por exemplo, para um biólogo, um biossensor é “um dispositivo que traduz uma variável biológica, como potenciais elétricos, movimentos ou concentrações químicas em sinais elétricos”. Para um químico, uma definição mais adequada seria “um dispositivo que se utiliza de reações biológicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células para detectar componentes químicos, geralmente por sinais elétricos, térmicos ou óticos”. Um físico ainda poderia definir um biossensor como “um dispositivo que detecta, registra e transmite uma informação, por meio de uma considerada mudança fisiológica ou ocorrência de um processo (MARKS et al., 2008). Entretanto, de uma maneira geral, os biossensores são definidos como ferramentas analíticas que combinam biomoléculas, derivados de material biológico ou biomiméticos a um transdutor para criar uma superfície que permita a medição qualitativa e/ou quantitativa de um analito específico (THÉVENOT et al., 2001; XU; WANG; LI, 2017).

Os biossensores são compostos por três unidades distintas: o biorreceptor, que corresponde à biomolécula ligada a uma superfície, sendo responsável pela detecção de um analito em questão; o transdutor, que converte as alterações geradas pelo reconhecimento biológico em um sinal mensurável; e o detector, que amplifica e analisa os sinais oriundos do transdutor (**Figura 1**) (MOHANTY; KOUCIANOS, 2006; YAMANAKA; VESTERGAARD, MUN'DELANJI C. TAMIYA, 2016). O princípio da detecção desses dispositivos baseia-se na ligação específica do analito de interesse ao elemento biológico imobilizado num suporte adequado. A interação específica resulta na alteração de uma ou mais propriedades físico-químicas que são detectadas pelo transdutor, produzindo um sinal eletrônico proporcional à concentração do analito (HASSANI et al., 2016).

Figura 1: Elementos de um biossensor.

Fonte: O autor (2017).

O termo biossensor apareceu pela primeira vez na literatura científica no fim dos anos 1970 e foi revisto várias vezes no início da década de 80. Porém, o primeiro “biossensor” foi reconhecido quando introduzido por Clark e Lyons em 1962, por intercalar uma glicose oxidase solúvel (GOx) entre uma membrana de diálise externa e uma membrana de gás permeável de um eletrodo de oxigênio. A redução na concentração do oxigênio dissolvido foi detectada pelo eletrodo e mostrou ser proporcional à concentração de glicose na amostra (LAI et al., 2016). Notou-se rapidamente que eletrodos enzimáticos poderiam ser criados para uma variedade de outros analitos clinicamente importantes através da ligação de enzimas em sistemas de eletrodos apropriados. Rechhnitz descreveu um eletrodo seletivo para arginina em 1977, ao imobilizar microrganismos vivos na superfície de um eletrodo sensível à amônia e, para tal, usou o termo “sensor bioseletivo” em suas descrições. Esse termo foi subsequentemente encurtado para “biossensor” e permanece até os dias atuais como um termo genérico para descrever qualquer dispositivo analítico que combina um sistema de reconhecimento de origem biológica e um transdutor físico-químico (MARKS et al., 2008).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSSENSORES

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento biológico imobilizado (biorreceptor) ou pela plataforma de transdução do sistema (transdutor).

2.3.1 De acordo com o elemento biológico

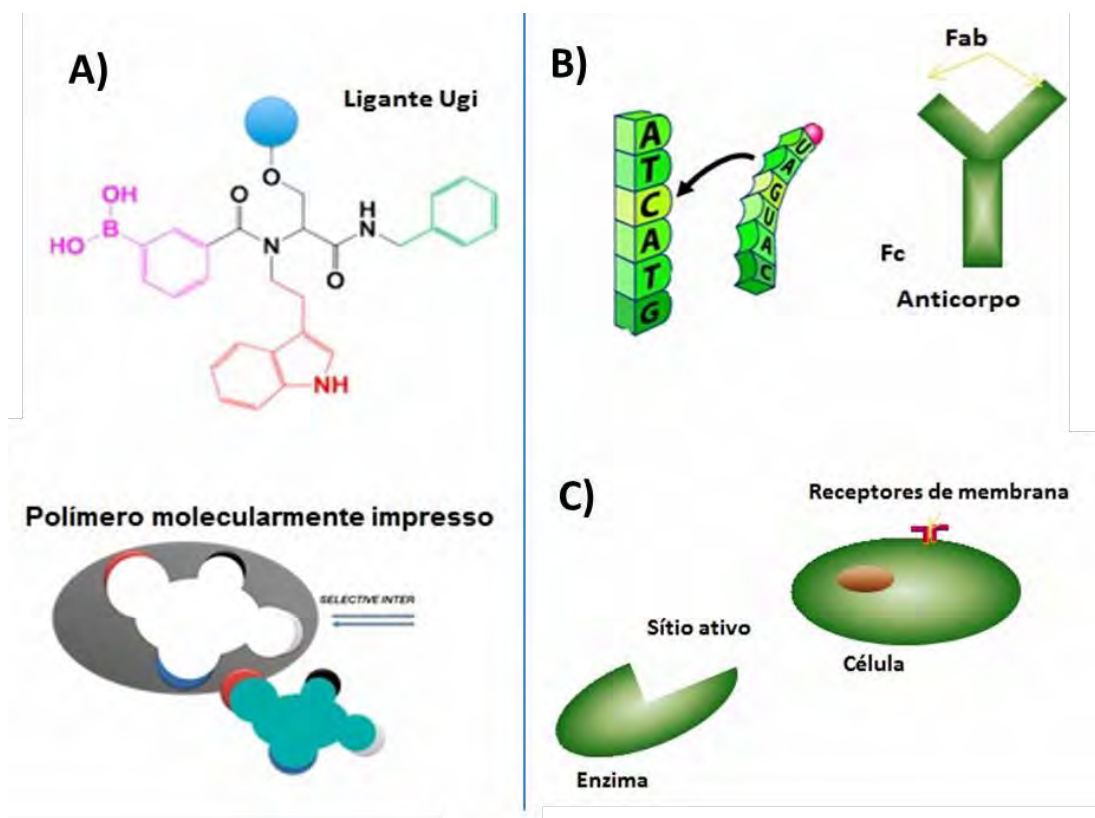
O elemento biológico é capaz de reconhecer a presença, atividade ou a concentração de um analito específico em uma complexa mistura de outros componentes (JUSTINO et al., 2015). O reconhecimento biológico, então, se enquadra em um de três diferentes tipos: nos biossensores de afinidade, que se baseiam nas interações de ligante-receptor, biossensores catalíticos, em que a interação entre o biorreceptor com o analito resulta na conversão de um substrato em um produto mensurável pelo transdutor e sensores biomiméticos, que se utilizam de receptores biológicos sintéticos ou modificados que possuem os mesmos princípios de ligação dos sistemas de afinidade e/ou catalíticos naturais (Figura 2) (MARKS et al., 2008).

- a) Biossensores de afinidade: nessa categoria, os anticorpos e antígenos (imunossensores) são os sistemas de afinidade mais conhecidos e mais empregados. A sensibilidade e especificidade dos imunossensores são governadas pela especificidade e afinidade da interação antígeno-anticorpo e pela alta relação de sinal-ruído do transdutor (CRIVIANU-GAITA; THOMPSON, 2016; LUONG; MALE; GLENNON, 2008). Além dos imunossensores, os biossensores de ácidos nucléicos possuem bastante notoriedade dentro desta categoria. O princípio do reconhecimento biológico baseia-se na hibridização entre a molécula imobilizada no transdutor (sonda molecular) e a sua sequência-alvo, que adquire a configuração de dupla hélice ao ligar-se à sua cadeia complementar, em que são ligadas por pontes de hidrogênio. A estabilidade dessa ligação depende da sequência de nucleotídeos em ambas as cadeias: uma combinação perfeita na sequência de nucleotídeos produz uma fita dupla altamente estável e facilmente detectada pelo transdutor (LIU et al., 2012; ZHANG et al., 2016)
- b) Biossensores catalíticos: os biossensores que usam enzimas como elemento de reconhecimento e resposta são os mais extensamente utilizados, em que o analito é passível de modificações químicas. O catalisador enzimático é integrado na superfície,

ao lado ou mesmo dentro do material transdutor para garantir que a transformação biocatalítica seja seletivamente transduzida em sinal elétrico (XU et al., 2005). De uma perspectiva analítica, a classe mais importante de enzimas são as oxirredutases, que catalisam a oxidação de substratos usando o oxigênio molecular, o NAD^+ (Nicotinamida adenina dinucleotídeo) ou a pirroloquinolina quinona, e as hidrolases (MARKS et al., 2008). Organelas, células e até fragmentos de tecidos tem sido extensivamente usados como biocatalisadores para a detecção de vários analitos de interesse clínico e ambiental (MEHROTRA, 2016).

- c) Sensores biomiméticos: Sistemas análogos aos ligantes naturais convencionais tem sido desenvolvidos para resolver as problemáticas relacionados à produção desses compostos, como custo-eficiência, duração e rentabilidade (CIEPLAK; KUTNER, 2016). O uso de polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês Molecularly Imprinted Polymers) é um exemplo disso. Estes são sistemas de reconhecimento artificiais, em que um polímero mimetiza moldes para o “encaixe” perfeito de um analito, através de cavidades presentes em suas rígidas camadas (ULUDAG et al., 2016). Os aptâmeros, por sua vez, são ligantes de ácidos nucleicos artificiais que são gerados através de bibliotecas combinacionais de oligonucleotídeos através de um processo iterativo de adsorção, recuperação e amplificação, podendo ser direcionado para o reconhecimento de aminoácidos, drogas, proteínas e outras moléculas menores. Possuem várias vantagens em relação aos anticorpos, como armazenamento de longo-prazo, produção por síntese química, que resulta em mínima ou mesmo nenhuma variação entre os lotes de aptâmeros (NEVES et al., 2010; ROUSHANI; SHAHDOST-FARD, 2015). Recentemente, o uso de reações multicomponentes para a geração de bibliotecas de compostos químicos tornou-se uma ferramenta poderosa para gerar diversas moléculas orgânicas (KAKUCHI, 2014). Dentre essas, destacam-se os peptideomiméticos, que são ligantes especialmente desenhados para mimetizar aminoácidos contidos no sítio ativo de enzimas, sendo capazes de interagir fortemente com seus respectivos alvos (BATALHA; ROQUE, 2016). Por serem estáveis, estruturalmente bem-definidos e esterilizáveis, estes biomiméticos oferecem uma tecnologia de produção em escala bastante eficiente para o setor industrial, o que explica um grande número de publicações científicas nessa área (HAIGH et al., 2009).

Figura 2: Variedades de biorreceptores usados em biossensores. A) Tipos de sensores biomiméticos. B) Tipos de biossensores de afinidade. C) Tipos de biossensores catalíticos



Fontes: Adaptado de Haigh et al.(2009) e Mehrotra (2016)

2.3.2 De acordo com o transdutor

Diferentes plataformas podem ser empregadas para a transdução do sinal biológico que ocorre na superfície transdutora, dependendo do tipo de energia envolvida na reação entre o biorreceptor e o analito. Os principais transdutores são:

- Biossensores óticos, que se baseiam na detecção de mudanças de absorção de radiação eletromagnética na região do visível/infravermelho entre os reagentes e os produtos da reação ou na medição da emissão de luz por um processo luminescente. Vários fenômenos espectrométricos podem ser explorados por esses biossensores, como a absorção de luz visível, infravermelho (IR) ou ultravioleta (UV), fluorescência, quimio ou bioluminescência, espectroscopia na região do infravermelho, fotometria do espalhamento da luz e a ressonância plasmônica de superfície. Os sensores holográficos, por exemplo, exploram as propriedades de contração e expansão de

polímeros ao interagir com analitos, em que essa interação é verificada através da variação do comprimento de onda e da intensidade da luz refletida pelo sistema antes e depois da reação com o analito (BENITO-PENÑA et al., 2016; TERESHCHENKO et al., 2016; YETISEN et al., 2014);

- b) Biossensores térmicos, que medem a variação de temperatura antes e depois que o analito entra em contato com o biorreceptor, geralmente uma enzima, em que esta alteração é detectada por termistores. (YAKOVLEVA; BHAND; DANIELSSON, 2013);
- c) Biossensores piezelétricos, que é caracterizado por um transdutor acústico formado por um material oscilante (geralmente um cristal) ligado ao biorreceptor. Quando o analito liga-se ao elemento biológico provoca uma variação na massa no cristal, resultando em uma mudança subsequente na frequência de ressonância do transdutor, que é medido por um frequencímetro (SKLÁDAL, 2016);
- d) Biossensores magnéticos, que exploram as propriedades magnéticas dos materiais para imobilizar e/ ou marcar biomoléculas, em que a detecção do analito é feita a partir das mudanças do campo magnético na superfície do transdutor, derivadas do reconhecimento biológico. (LLANDRO et al., 2010; SHARMA et al., 2016; WANG et al., 2016).
- e) Biossensores eletroquímicos, que são os mais frequentemente utilizados nos estudos com biossensores. Este tipo de transdução consiste nas análises de propriedades eletroquímicas do analito em questão, onde elétrons são gerados ou dissipados na superfície do transdutor, produzindo um sinal eletrônico proporcional à concentração do analito. Neste caso, a plataforma transdutora é formada por uma célula eletroquímica, que contém eletrodos em sua superfície. (FARIDBOD; GUPTA; ZAMANI, 2011; VASILESCU et al., 2016). Dependendo do tipo de operação, os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em quatro grupos: os potenciométricos, que medem uma diferença de potencial entre dois eletrodos em condições de corrente elétrica constante; os condutimétricos, que avaliam a condutância ou resistência do eletrólito, variando de acordo com a produção de íons/elétrons das reações eletroquímicas; os amperométricos, que se baseiam na geração de uma corrente elétrica, resultante de alterações de oxidação, ou redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo e os voltamétricos, o qual as informações eletroquímicas do analito são aferidas pela aplicação de uma varredura de

potencial entre dois eletrodos, registrando-se simultaneamente os valores da corrente gerada com o respectivo potencial (RUSLING, 2010; XU; WANG; LI, 2017).

2.4 APLICAÇÕES DE BIOSSENSORES

Devido à necessidade do mercado tecnológico em descentralizar testes analíticos para que possam ser realizados remotamente em qualquer lugar e em quaisquer condições, pesquisas nos mais diversos campos estratégicos tem sido realizadas nos últimos anos. As áreas mais promissoras e proeminentes são a área médica, a alimentícia, a de bioprocessamento, monitoramento ambiental e, recentemente, a área das ciências forenses. (MEHROTRA, 2016; VIGNESHVAR et al., 2016).

2.5 CIÊNCIAS FORENSES

As Ciências Forenses são áreas interdisciplinares do conhecimento que, em conjunto, atuam de modo a resolver casos de caráter legal, sendo sua definição mais ampla a aplicação da ciência à lei. A palavra forense deriva do latim *forensis*, com significado de público, sendo relativa ao fórum ou à discussão pública, onde atualmente é empregada nas cortes judiciais (SEBASTIANY et al., 2013). Devido à sociedade tornar-se dependente das leis para regular as atividades de seus membros e considerando-se a vasta disposição das leis civis e criminais que a regulam, as ciências forenses aplicam o conhecimento e a tecnologia da ciência no cumprimento das leis sociais (VELHO; GEISER; ESPÍNDULA, 2013).

Na Idade Antiga, práticas padronizadas nas ciências forenses eram escassas, o que ajudava aos criminosos escaparem à punição. As investigações criminais e os julgamentos então se baseavam em juramentos, confissões e testemunhos. Numa época em que ainda não havia uma distinção entre ciência e fenômenos como religião, magia e superstição, algumas civilizações usavam práticas como a ordália para determinar a culpa ou inocência dos cidadãos (HEBRARD; DAOUST, 2013).

É a Arquimedes que é amplamente atribuída a primeira evidência do uso da ciência aplicado à resolução de um crime. Ordenado pelo Rei Hierão II da Grécia, para determinar se um ourives era culpado ou não de ter substituído ouro puro por uma mistura de ouro e prata na confecção de uma coroa, Arquimedes tinha que resolver esse problema sem danificar o objeto. Utilizando-se dos princípios da relação entre volume de objetos e deslocamento de

volume de água, Arquimedes calculou a densidade da coroa e descobriu que essa possuía uma densidade menor do que se fosse feita somente por ouro puro, devido à adição de metais menos densos, como a prata, confirmando, assim, a fraude cometida pelo ourives. Os métodos aplicados por Arquimedes são considerados o primeiro exemplo do que atualmente é compreendido como Engenharia Forense (KAMAT, 1986).

O interesse em desvendar crimes por meio das ciências forenses tem sido o enredo de vários romances da literatura mundial, através de personagens como Sherlock Holmes, de Arthur Conan Doyle e Hercule Poirot, de Agatha Christie (BREWER; LEY, 2009). Nos dias atuais, a mídia foi um dos grandes fatores que influenciaram na atração do público geral para as investigações criminais, pelo meio de séries televisivas que abordam esta temática, como é o caso da série norte-americana CSI (Crime Scene Investigation). Entretanto, devido à relativa distorção entre ficção e realidade, juízes criminais nos Estados Unidos começaram a demandar perícias mais complexas e em tempo real, criando um impacto tão negativo para as investigações, em que esse fenômeno é atualmente conhecido como Efeito CSI (KIRBY, 2013).

2.6 PAPEL DOS BIOSSENSORES NAS ANÁLISES FORENSES

Em investigações criminais, o foco principal das análises é confirmar ou descartar o envolvimento do(s) suspeito(s). As técnicas empregadas permitem que seja possível identificar, com relativa precisão, se uma pessoa, por exemplo, esteve ou não na cena do crime a partir de uma impressão digital, ou então um fio de cabelo encontrado no local do crime. Em algumas situações, os peritos utilizam a tecnologia da impressão digital do DNA, as análises da autenticidade de documentos e obras de artes ou, ainda, o exame de adulteração de produtos industriais (SEBASTIANY et al., 2013).

No ramo das análises químico-biológicas forenses, vários testes de triagem capazes de detectar a presença de um ou mais compostos de interesse especial contidos nas amostras correspondentes tem sido propostos nos últimos anos. Muitos destes métodos baseiam-se em imunoenaios, como uma reação do tipo antígeno-anticorpo, no qual o antígeno é, em geral, o analito a ser detectado (YÁÑEZ-SEDEÑO et al., 2014). Estes métodos possuem importantes vantagens, como análise rápida, pouca manipulação de amostra e alta sensibilidade, mas

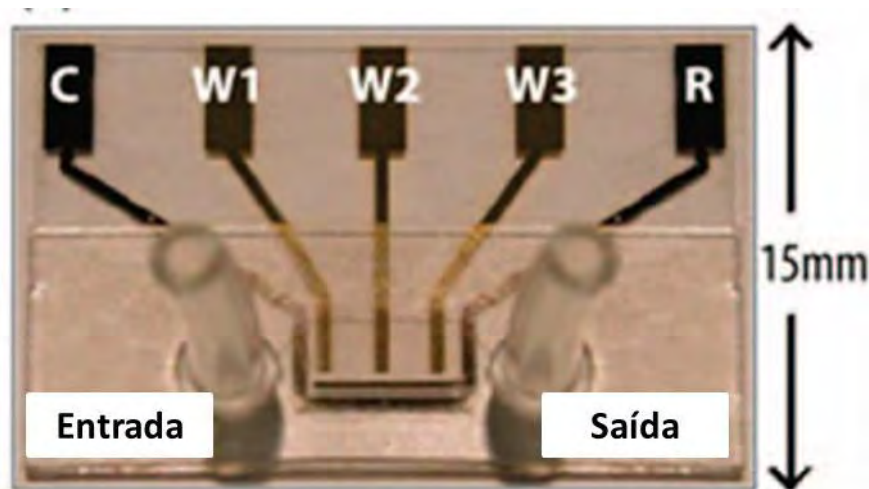
também exibem desvantagens significantes, como ocorrência de resultados falso-positivos e negativos e ausência de análise quantitativa. Devido a esse fato, os resultados fornecidos por esses métodos exigem uma posterior confirmação, através de outras metodologias analíticas mais complexas, geralmente baseadas em técnicas instrumentais, como métodos cromatográficos e espectrometria de massa (JAGERDEO; SCHAFF, 2016; SMITH; BLUTH, 2016). Entretanto, tais desvantagens podem ser dirimidas pelo uso de biossensores, que podem ser aplicados nos mais diversos ramos das análises forenses, como na Toxicologia, na Bioquímica Forense e na Genética Forense.

2.6.1 Aplicações na Toxicologia: detecção de drogas ilícitas

A detecção de traços de drogas ilícitas representa um importante desafio nas rotinas periciais. Embora as técnicas cromatográficas, principalmente a cromatografia gasosa com espectrômetro de massa (GC-MS), sejam empregadas para este propósito, estas dependem de um laboratório, possuem um alto custo e frequentemente requerem limpeza e derivatização da amostras, além de um longo tempo para análise (BACIU et al., 2015; HADLAND; LEVY, 2016). Como uma alternativa eficiente, o uso dos biossensores, principalmente os de afinidade e os biomiméticos tornam-se bastante atrativos e bastante pesquisados, por causa de suas propriedades de alta especificidade e sensibilidade (YÁÑEZ-SEDEÑO et al., 2014).

A determinação de traços de cocaína é importante para a resolução de crimes envolvendo tráfico de drogas, bem como para a clínica médica (BLUTH; PINCUS, 2016). Para obter-se um método eficiente de detecção, por exemplo, a ligação da cocaína com um aptâmero imobilizado em uma superfície transdutora (aptassensor) pode ser mensurada por meio da redução de espécies eletroativas ligadas a porção final mais longe do aptâmero, o que permite a detecção da cocaína a níveis micromolares usando métodos eletroquímicos (BAKER et al., 2006). Em um modelo mais recente, um aptassensor microfluídico contínuo usando a transdução eletroquímica foi capaz de detectar cocaína, dentre outros compostos químicos em amostras derivadas de soro humano (Figura 3), em que foram detectadas quantidades mínimas da droga, como 10 μ M (SWENSEN et al., 2009).

Figura 3: Aptassensor eletroquímico microfluídico. O biossensor é formado por um chip, contendo três eletrodos de ouro (W1, W2 e W3), um eletrodo de referência de platina(R) e um eletrodo auxiliar de platina(C), uma câmara de entrada, na qual a amostra se divide entre os três canais conectados aos três eletrodos de trabalho e uma câmara de saída, que elimina os resíduos que percorreram o sistema.



Fonte: Adaptado de Swensen et al.(2009).

2.6.2 Aplicações na Bioquímica Forense: detecção de fluidos corporais humanos

Identificar a origem de vestígios biológicos encontrados em uma cena de crime é um fator de importante nas investigações, em que possibilita reconstruir o ambiente e as circunstâncias em que o crime ocorreu. A determinação da presença ou ausência de um fluido corporal e sua posterior identificação pode ser suficiente para influenciar na resolução de um caso (HORJAN; BARBARIC; MRSIC, 2016; VIRKLER; LEDNEV, 2009). Atualmente vários testes são empregados para a realização destas análises, porém muitas deles demandam o emprego de substâncias que podem destruir as moléculas-alvo de testes complementares, como é o caso do luminol (3-aminofthalhidrazida) ou possuir baixa especificidade, como a espectroscopia de Raman (SIKIRZHYTSKI; SIKIRZHYTSKAYA; LEDNEV, 2012).

Vários kits comerciais utilizam anticorpos monoclonais dirigidos contra as proteínas-alvo de um tecido humano, em que a formação de linhas coloridas confirma a origem humana da amostra. Frascione et al. (2012) desenvolveram um método de detecção de sangue através da conjugação de anticorpos anti-glicoforina A de eritrócitos humanos com quantum dots (QD). O sistema foi capaz de detectar amostras de sangue líquido e seco, apesar do forte efeito de supressão de fluorescência (quenching). Além disso, a presença dos anticorpos

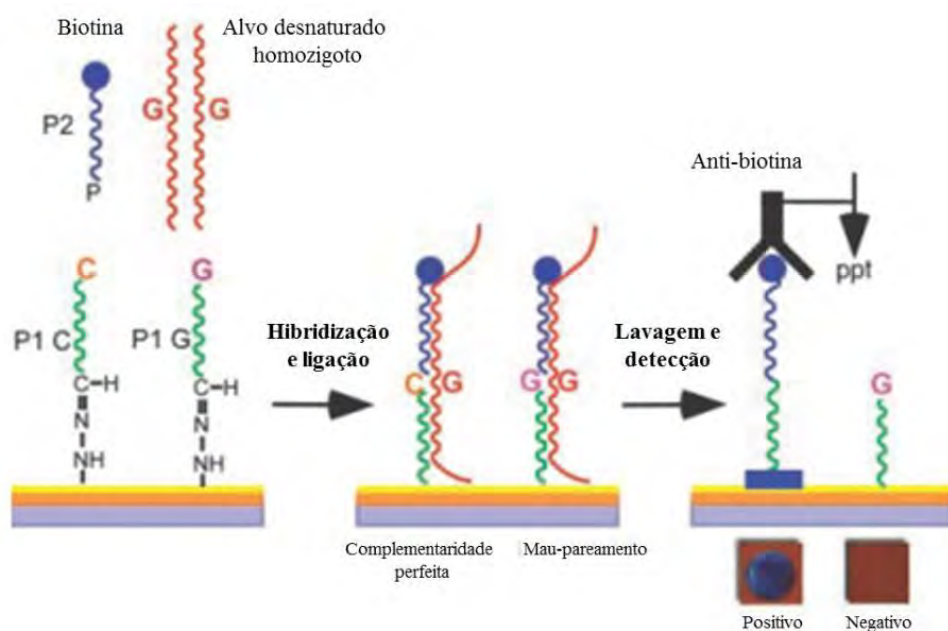
marcados com quantum dots nas amostras de sangue não inibiram a obtenção de perfis de DNA completos, o que em muito beneficiaria as investigações, em termos de tempo e custos.

2.6.3 Aplicações em Genética Forense: Identificação humana

Por mais de duas décadas, as análises de DNA tem sido usadas para identificar restos mortais de pessoas vítimas de conflitos e desastres. Embora existam muitas técnicas que possam ser utilizadas para facilitar a identificação de pessoas desaparecidas (como a papiloscopia e a odontologia forense), nos casos em que os vestígios estão muito danificados e fragmentados ou quando os registros ante-mortem estão indisponíveis, o exame do DNA é frequentemente o melhor método de obter uma identificação individual positiva (PARKER; JOHN; ARONSON, 2013). As análises moleculares incluem o uso de PCR e sequenciamento para detectar marcadores genéticos, como STRs (Short Tandem Repeats), SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) e InDels (Insertion Deletion Polymorphism), que são polimorfismos detectados, respectivamente, em sequências curtas, únicas e que possuem inserção ou deleção de bases no DNA humano (BØRSTING; MORLING, 2015).

Alguns sensores desenvolvidos para a genotipagem de marcadores moleculares baseiam-se em biossensores óticos. Um exemplo interessante é a construção de um biossensor que utiliza SNPs alelo-discriminantes (alelos específicos e diferentes facilmente detectáveis no genoma) como biorreceptores, sendo covalentemente ligados a um chip de silicone pela interação entre o grupo aldeído das sondas com a hidrazina presente no wafer de silicone (Figura 4) (ZHONG et al., 2003). Em cada spot do chip, diferentes pares de oligômeros alelo-discriminante (sonda P1) foram imobilizados, diferindo somente em uma das bases na sequência 3' terminal. Uma segunda sonda (P2), contendo parte da sequência complementar ao alvo, possui uma biotina na extremidade 3', que age como marcador, e uma extremidade fosfato na 5', para formar uma ligação fosfodiéster com sonda P1. A hibridização do alvo e a ligação entre P1 e P2 são feitas simultaneamente durante 20 minutos de incubação na presença de uma DNA ligase termoestável. Após lavagem com hidróxido de sódio para remover todas as moléculas não ligadas, a sonda P2 biotilada é detectada pela incubação com anticorpo anti-biotina conjugado com HPR (horseradish peroxidase), formando um precipitado detectável. A deposição de massa no substrato do chip mostra uma mudança de cor de dourado para azul/roxo na superfície do chip, o que, dependendo da densidade do oligonucleotídeo no spot, pode ser vista a olho nu ou por um simples sistema digital de imagens.

Figura 4: Etapas para a detecção de SNPs em chip óticos.



Fonte: Adaptado de Zhong et al. 2003.

A capacidade desse biossensor para realizar a tipagem de SNPs em estudos de genética de população foi avaliada, utilizando-se sondas para 20 diferentes SNPs que mapeiam o cromossomo 17 de humanos. As análises revelaram que o biossensor desenvolvido possui o mesmo poder discriminativo de uma PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real; quando se compara os resultados dos índices de desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg realizados pelas duas técnicas, verifica-se que não há diferenças analíticas significativas entre os dois métodos, o que confirma a aplicabilidade do biossensor para realizar a identificação humana.

O desenvolvimento de biossensores aplicados à detecção e identificação de compostos químicos e biológicos específicos em cenas de crime constitui-se uma excelente alternativa para o cenário atual das ciências forenses. Essas ferramentas tornam-se extremamente importantes numa investigação policial, pelo fato de que suas análises podem confirmar as evidências de um crime, muitas vezes estabelecendo uma associação entre o infrator, a vítima e o local de crime, informações cruciais para a resolução de um caso (MURO et al., 2016; VIRKLER; LEDNEV, 2009). Além disso, é uma técnica altamente sensível, possui uma instrumentação relativamente simples, diminui consideravelmente o número de etapas para o processamento e análise das amostras e é compatível com

tecnologias de informação, o que não exigiria o uso de profissionais especializados para a sua utilização, resultando numa agilidade na tomada de decisões e aplicação de medidas efetivas nos processos penais, bem como na redução dos custos dessas operações para os Estados (SINGH et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver biossensores como modelos de testes confirmatórios para Ciências Forenses.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver dispositivo eletroquímico que seja capaz de detectar moléculas de DNA com relativa sensibilidade, em condições otimizadas;
- Verificar a capacidade do dispositivo construído em detectar a hibridização de moléculas de DNA em condições adversas;
- Desenvolver uma plataforma holográfica que seja capaz de detectar cocaína, com sensibilidade comparável aos testes presuntivos para essa substância;
- Traçar um perfil sociodemográfico de vítimas acometidas por crimes violentos no Estado de Pernambuco.

4 PUBLICAÇÕES

ARTIGO 1 - DNA BIOSENSOR AS A CONFIRMATORY TEST: STUDIES OF HOUSEHOLD CLEANERS EFFECTS OF ONTO ELECTROCHEMICAL DNA DETECTION



Artigo publicado na Revista *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*

Fator de impacto: 0,350 (2015)



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

DNA biosensor as a confirmatory test: Studies of household cleaners effects of onto electrochemical DNA detection

Oliveira N.C.L.^{a,*}, Campos-Ferreira D.S.^a, Nascimento G.A.^a, Zanforlin D.M.L.^a, Bezerra W.S.R.^a, Santos S.M.^b, Lima-Filho J.L.^{a,c}^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil^b Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF), Gerência Geral de Polícia Científica – GGPOC, Estrada da Batalha s/n, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brazil^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2015

Accepted 16 September 2015

Available online 24 September 2015

Keywords:

Body fluids

Electrochemical analysis

DNA biosensors

Household cleaners

ABSTRACT

The detection and identification of human body fluids at crime scenes is usually performed using colorimetric and crystallographic tests. However, these assays may limit the samples detection during the washing steps. Currently, biosensors are emerging as alternative devices in molecular biology, combining the specificity and sensitivity of biological systems with the computing power of microprocessors. Herein, we report a preliminary study of an electrochemical biosensor able to detect DNA sequences in solutions mixed with household cleaners, aiming to simulate the effects of these chemicals on sample detection. The device was made using pencil graphite, acting as a working electrode (PGE) and an Ag/AgCl pin as a reference electrode. Single-strand DNA probes (ssDNA) were immobilized on PGE surface and the hybridization assay was performed by immersing the ssDNA–PGE electrode in a buffer solution with the target sequence under specific annealing temperature for 10 min. Samples contamination was stimulated by household cleaners by immersing dsDNA–PGE immersed in solutions containing sodium hypochlorite, alcohol and SDS for 30 min. The current peaks obtained with ssDNA–PGE and dsDNA–PGE were highly distinguishable (118.6 nA and 24.435 nA, respectively), even when dsDNA–PGE was mixed with sodium hypochlorite, alcohol and detergent (17.12 nA, 35.81 nA and 69.44 nA, respectively). These findings suggest that DNA biosensors have a great potential to be used as a confirmatory test to detect human body fluids in crime scenes.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The detection and identification of human body fluids in a crime scene are critical aspects in forensic sciences. Confirmatory tests use several techniques to characterize a human body fluid, mostly immunochromatographic assays. However, those kits are expensive and the molecular targets may be destroyed when washed with household cleaners, in an attempt to hide evidences [1,2]. Due to these facts, herein, an electrochemical DNA sensor device is presented, as a model for a confirmatory test for human body fluids. The effects of household cleaners on DNA detection are also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals were of reagent grade quality and used as received without further purification. DNA sequences were purchased as lyophilized power (IDT Technologies, USA) and prepared as stock solutions with 0.5 M acetate buffer (pH 5.00). The following sequences (27-mer oligonucleotides) were used in this study:

DNA probe: 5'-TGG AAA TCT TTT TTT GAA AGG CTT TGG-3'

DNA target: 5'-CCA AAG CCT TTC AAA AAA AGA TTT CCA-3'

In the step that simulates the effect caused by washing crime scenes, standard household cleaner solutions of alcohol, sodium dodecyl sulfate (SDS) and sodium hypochlorite were used.

The device was fabricated using pencil graphite as a working electrode (PGE) and an Ag/AgCl pin as a reference electrode. Single-strand DNA probes (ssDNA) diluted in acetate buffer were immobilized on PGE surface, after applying a potential of +0.5 V.

* Corresponding author. Fax: +55 81 2126 8000.

E-mail address: nataliacybelle.89@gmail.com (N.C.L. Oliveira).

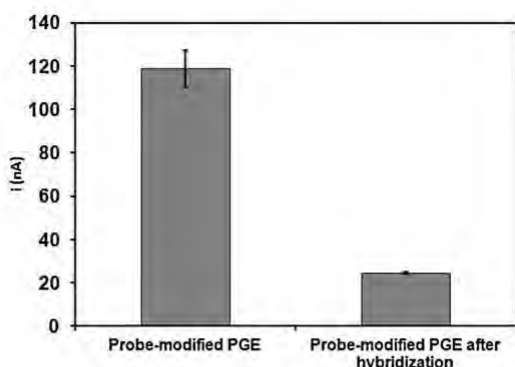


Fig. 1. Electrochemical signals obtained from differential pulse voltammetry (DPV) based on guanine oxidation on probe-modified PGE before and after hybridization with complementary sequence. Conditions: scan rate: 20 mV/s, scanning potential range: +0.5 V to +1.2 V.

3.2. Effect of household cleaners on electrochemical signals of DNA detection

The results presented in Fig. 2 show that the signals obtained with the blank solution (water) and sodium hypochlorite were statistically similar to those obtained with the dsDNA–PGE ($p=0.12$ e $p=0.16$, respectively), thus confirming that the added sequences have not interfered with the electrochemical DNA detection.

However, alcohol and SDS solutions have weakened the interaction between the DNA probe and target. This has been depicted by an increase of electrochemical signals, and could be due to two main facts: (i) ethanol solutions produce an oxidation peak at 0.96 V at concentrations above 3.0 mol L^{-1} , which is the same potential used to oxidize guanine bases of DNA, (ii) ionic detergents, such as SDS, frequently utilized as a pretreatment step in carbon electrodes at high concentrations, may cause steric hindrance during the adsorption of the complementary DNA

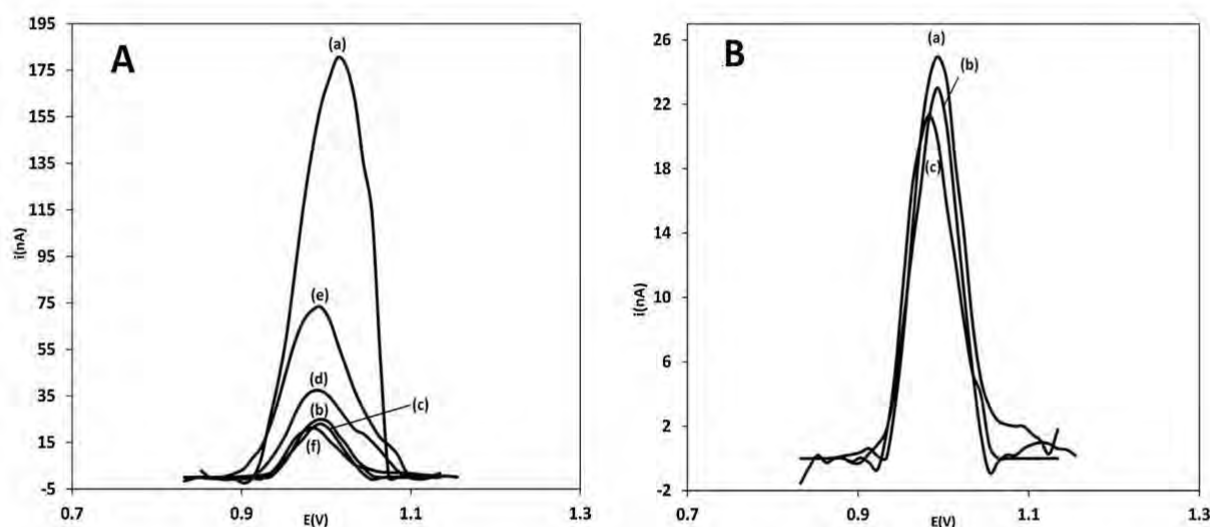


Fig. 2. (A) Differential pulse voltammograms for guanine oxidation in different situations, regarding on (a) probe-modified PGE, (b) probe-modified PGE with complementary sequence, (c) probe-modified PGE with complementary sequence mixed with ultrapure water (blank solution), (d) alcohol, (e) SDS and (f) sodium hypochlorite solution. (B) Zoom in current peak region of 0–40 nA, exhibiting a clear distinction among probe-modified PGE with complementary sequence (a) mixed with blank solution (b) and sodium hypochlorite solution (c). Conditions: scan rate: 20 mV/s, scanning potential range: +0.5 V to +1.2 V.

The hybridization assay was performed by immersing the ssDNA–PGE electrode in a buffer solution with the target sequence (100 nM) under specific annealing temperature of 55°C for 10 min. Finally, to simulate the contamination of samples by household cleaners, dsDNA–PGE was immersed in sodium hypochlorite, alcohol and SDS solutions and incubated at 27°C for 30 min.

3. Results and discussions

3.1. Electrochemical analyses of probe-modified PGE after hybridization assays

Electrochemical analyses of guanine oxidation on probe-modified PGE before and after hybridization with target sequence are shown below (Fig. 1). After the hybridization of DNA probe with the complementary sequence, a decreasing of approximately 79% in current signals was observed (118.6 nA for and 24.435 nA, respectively). This could be due to the reduction in the amount of free guanine base available for oxidation, and which are involved in hydrogen bonding that hold the chain together [3,4].

sequence, preventing the hybridization between the DNA probe and target, which allows guanine bases to undergo electrochemical redox reactions.

Furthermore, when the current signals under these conditions are compared with those of dsDNA–PGE, although higher current peaks are observed with the dsDNA–PGE, alcohol and SDS solutions, the signals of ssDNA–PGE are always discernable (35.81% and 58.64%, respectively). Therefore this data confirm that the DNA biosensor is able to detect a specific DNA sequence under harsh conditions in the presence of alcohol and SDS solutions.

4. Conclusions

An electrochemical DNA biosensor for the detection of DNA sequences was presented herein. The device displayed high sensitivity (100 nM DNA) when tested with commercial solutions of household cleaners. Based on these findings, this system emerges as a potential confirmatory test to be applied for the analysis of human body fluids in crime scenes.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), which provided financial support and Dr. Graziella El Khoury for reading the manuscript.

References

- [1] T. Akutsu, et al., Comparison of automated and manual purification of total RNA for mRNA-based identification of body fluids, *Forensic Sci. Int. Genet.* 14 (2015) 11–17.
- [2] K. Virkler, I.K. Lednev, Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Science* 188 (2009) 1–17.
- [3] S. Siddiquee, et al., Nanoparticle-enhanced electrochemical biosensor with DNA immobilization and hybridization of *Trichoderma harzianum* gene, *Sens. Bio-Sens. Res.* (2014) .
- [4] D.S. Campos-Ferreira, et al., Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples, *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 258–263.

ARTIGO 2 – DNA GENOTYPING ANALYSIS OVERVIEW: PROFILE OF RAPE CASES IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL



Artigo publicado na Revista *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*

Fator de impacto: 0,350 (2015)



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International: Genetics Supplement Series

journal homepage: www.elsevier.com/locate/FSIGSS

DNA genotyping analysis overview: Profile of rape cases in the state of Pernambuco, Brazil

N.C.L. Oliveira^{a,*}, M.H.F. Ekert^a, C.A. Souza^b, K.C.N. Rabêlo^b, S.M. Santos^c, J.L. Lima-Filho^{a,d}^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil^b Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF), Gerência Geral de Polícia Científica – GGPOC, Estrada da Batalha s/n, Jaboatão dos Guararapes, PE, Brazil^c Gerência Geral de Polícia Científica (GGPOC), Secretaria de Defesa Social do Estado de Pernambuco, Rua São Geraldo, nº 111, 1º andar, Santo Amaro, CEP 50040-020, Recife, PE, Brazil^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2015

Accepted 23 September 2015

Available online 26 September 2015

Keywords:

Rape cases

Human identification

DNA markers

ABSTRACT

Identification of perpetrators is crucial in criminal investigations, mainly in rape cases. Analysis of the area, victims' profile, as well as genotyping DNA markers from rapists may help to determine hotspots of the crime, in a way to prevent its recurrence. Herein, we report for the first time in Northeastern Brazil a preliminary genetic data analyses from rape cases that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014. Moreover, the distribution of the cases, as well as a general profile of the victims were analyzed from official reports of Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF-PE). The results showed that 62% of the cases are mainly located in the metropolitan area of Pernambuco. Eighty-eight percent of the victims were females and 37% were under age. Allele frequency was determined by at least 15 STRs and, in some cases, by Y-STRs and InDel markers. This study may contribute to the elucidation of rape crime investigation in the future.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rape is a crime committed by several types of perpetrators who attack different kind of victims under many different circumstances [1]. Obtaining the profile of the victims and the DNA markers of both victims and offenders constitute an important input to identify hotspots of the crime and design strategies in a way to prevent its recurrence [2–4]. Due to the lack of this type of studies in Northeastern Brazil population, a preliminary analysis of rape cases that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014 is presented herein, where DNA genotyping is used for human identification.

2. Materials and methods

In this study, reports of rape cases that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014 were obtained from Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense. In a way to obtain a general profile of the victims, variables as gender, age, relationship between offender and victim as well as geographical localization were analyzed.

In addition, the frequency of the following DNA markers used in each case was also evaluated: D3S1358, vWA, D16S539, CSF1PO, TPOX, D8S1179, D21S11, D18S51, D2S441, D19S433, TH01, FGA, D22S1045, D5S818, D13S317, D7S820, SE33, D10S1248, D1S1656, D12S391, D2S1338 and Amelogenin, for autosomic STR, DYS19, DYS389 I, DYS389 II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385a, DYS385b, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, YGATA H4, for Y-STR and one Y Indel.

* Corresponding author. Fax: +55 81 2126 8000.

E-mail address: nataliacybelle.89@gmail.com (N.C.L. Oliveira).

Distribution of rape cases in Pernambuco between 2012–2014

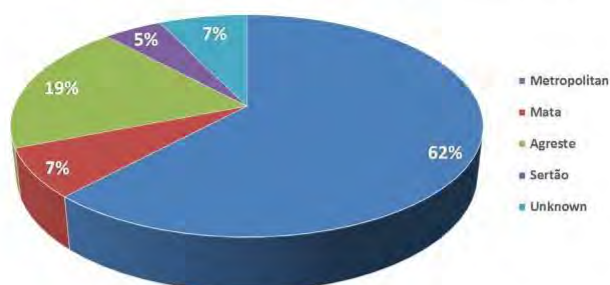


Fig. 1. Geographical distribution of rape cases in Pernambuco by Microregions, between 2012 and 2014.

Table 1

Profile of rape victims in Pernambuco between 2012 and 2014, according to the gender, age and relationship between the victims and offenders.

Variable	Classes	Distribution	
		N	%
Gender	Female	38	88.37%
	Male	5	11.63%
Age	Underage	16	37.21%
	Overage	18	41.86%
	Unknown	9	20.93%
	Family	5	11.63%
Offender/victim relationship	Non-Family	3	6.98%
	Stranger	32	74.42%
	Unknown	3	6.98%
	Unknown	3	6.98%
Total		43	100%

3. Results and discussion

As shown in Fig. 1 and Table 1, the prevalence of females being attacked by a stranger and mainly in the Metropolitan area of Pernambuco helps to address strategies to prevent sexual abuse in Brazil.

The use of at least 15 autosomic STRs provided sufficient information to identify the individuals involved in each case

Table 2

Frequency of DNA markers used to identify individuals involved in each case. DNA markers used by LPPGF to identify offenders in rape cases between 2012 and 2014.

DNA Marker		Distribution	
		N	%
STR	Number of STR markers	37	86.05%
	15 STRs	4	9.30%
	16 STRs	1	2.33%
	21 STRs	1	2.33%
	23 STRs		
y-STR		4	9.30%
Indel		1	2.33%
Total		43	100

(Table 2). Therefore, these results can contribute to the analysis of epidemiology of rape cases at a global scale, and help to better understand and manage the local DNA database.

Conflict of interest

None.

Acknowledgment

The authors would like to thank Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense, which kindly provided access to police reports and Dr. Graziella El Khoury for reading the manuscript.

References

- [1] Z. Jakovski, et al., Forensic approach to analyzing rape cases, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser. 4* (2013) e45–e46.
- [2] E.Y. Lee, et al., Analysis of 22 Y chromosomal STR haplotypes and Y haplogroup distribution in Pathans of Pakistan, *Forensic Sci. Int. Genet.* 11 (2014) 111–116.
- [3] A. Oliveira, et al., Male lineage strata of Brazilian population disclosed by the simultaneous analysis of STRs and SNPs, *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 264–268.
- [4] M. Andersen, et al., Identifying the most likely contributors to a Y-STR mixture using the discrete Laplace method, *Forensic Sci. Int.: Genet.* 15 (2015) 76–83.

ARTIGO 3 - A HOLOGRAPHIC SENSOR BASED ON A BIOMIMETIC AFFINITY LIGAND FOR THE DETECTION OF COCAINE



Artigo a ser submetido à Revista *Biomaterials*.

Fator de impacto: 8.387 (2016)

A holographic sensor based on a biomimetic affinity ligand for the detection of cocaine

Natália C. L. Oliveira ^{1*}, Graziella El Khoury ², Jennifer M. Versnel ², Gita K. Moghaddam ², Lucas S. Leite¹, José L. Lima-Filho ^{1,3}, Christopher R. Lowe ²

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus Universitário, 50670-901 Recife, PE, Brazil.

² Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QT, UK.

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco(UFPE), Av. Professor Moraes Rego, Campus Universitário, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author Tel.: +55 812126.8000

E-mail address: nataliacybelle.89@gmail.com

Abstract

The increasing consumption of illicit drugs has become a worldwide social and medical problem. The supply of illicit drugs must be eradicated, and the inspection for narcotics has a key role in achieving this goal. There is an urge to develop devices that provide a fast and simple response towards drugs detection using optical platforms. Consequently, a preliminary study for the development of holographic sensors modified with a rationally designed Ugi ligand for cocaine detection was undertaken. A hybrid hydrogel of Poly(2-hydroxyethyl methacrylate - ethylene dimethacrylate - methacrolein) was used as photosensitive material, in which methacrolein was used as a carbonyl source for the Ugi ligand developed on the hydrogel surface. After the fabrication of Ugi-modified gold holograms, the diffraction wavelength was measured to characterize the holographic response to cocaine as a function of pH and ionic strength effects. A combinatorial chemical library of synthetic Ugi ligands was screened, and the lead ligand A19C28I5 presented a significant response ($\lambda = 21.87$ nm) to cocaine in solution (50 mM), with a limit of detection of 5.69 mM. The holographic signals were very distinguishable from those obtained with related drugs, such as naloxone hydrochloride. These findings confirm the potential application of this analytical method in field drug tests.

Keywords: Cocaine, Holographic sensor, Ligand design, Ugi reaction.

1 Introduction

The abuse of illegal drugs has become a worldwide public health issue [1]. Currently, drug trafficking is the largest global illicit business, raising around \$322 billion per year, and being a potential threat to a number of economies in terms of the financial power generated, which may seriously jeopardize a country's future [2,3]. According to the United Nations Office on Drugs and Crime, it was estimated that in 2014 around 250 million people between the ages of 15 and 64 years used at least one drug, of which nearly 208 000 cases caused deaths.

Cocaine is one of the most consumed and commercialized drugs all around the world [4]. Several field tests, such as cobalt thiocyanide test (Scott test) have been developed for its presumptive identification, mainly relying on colorimetric reactions. However, these tests present some major drawbacks regarding the lack of selectivity and production of false-negative results, which leads to an incorrect on-site decision. Consequently, the results generated from this system require further confirmation with other intricate analytical methods generally based on instrumental techniques, such as GC-MS or HPLC, which are expensive and time-consuming [5–7].

As an alternative to those conventional methods, portable technologies, such as holographic sensors can be developed to promote a rapid and reliable detection of cocaine. A holographic sensor is a device that comprises a hologram incorporated into smart hydrogel films that diffract narrow band light at different wavelengths for the detection and quantification of analytes and/or physical parameters [8,9]. The detection usually results from the chemical or physical interactions that alter the polymer matrix structure, which consequently varies the refractive index or spacing between the holographic fringes of the film, causing a visible wavelength shift and/or intensity (brightness) change [10–12]. Due to these properties, the diffraction grating of the hologram act like an optical transducer, offering several major advantages when compared to other optical sensors, like the ability to display three-dimensional (3D) images, real time label-free sensing platform and amenability to laser manufacturing [13,14]. In addition, the holographic sensor is a lightweight system associated with no additional panel or power supply requirement for its functioning, which makes it suitable for miniaturization and as a disposable device, and this is highly needed for field investigation tests for cocaine detection [15,16].

In a way to respond to external stimuli due to the presence of the target, the smart hydrogel films are usually modified with functional groups [17]. However, those groups may exhibit non-specific binding to other compounds, which can be reduced by chemical substitution of rationally designed small biomolecules, such as peptidomimetics [18]. These molecules are synthetic compounds that mimic key amino acid residues of a natural protein specific to the target analyte [19]. Since they have a specific and well-defined chemical structure, the synthetic ligands have a great potential to be used as receptors for sensing purposes [20].

The use of combinatorial approaches for ligand design has proved to be effective in the generation of a variety of synthetic compounds [21]. The Ugi four-component reaction (Ugi 4-CR) was reported by Ivar Ugi and co-workers in 1959 and has been used for the synthesis of a large number of different compounds in a one-pot reaction, by the condensation of an oxo-component (aldehyde or ketone), a primary or secondary amine, a carboxylic acid and an isonitrile group to yield a single di-amide scaffold product [22]. Ugi ligands can also be formed around an aldehyde-functionalized solid-support (such as hydrogel films) and the variation of the amine, carboxylic acid and isonitrile components provides functional variability that allows potential affinity interactions [23].

In this work, we present a preliminary study for the development of a holographic platform to detect cocaine, based on a rationally designed peptidomimetic ligand obtained via Ugi reaction. In order to design the synthetic ligand, structures of two proteins (human carboxylesterase 1 and catalytic antibody GNL7A1) were analyzed for their binding pockets amino acid residues that interact with cocaine. A combinatorial ligand library was then constructed and a lead peptoidal scaffold was identified on the aldehyde-functionalized hydrogel surface. The fabrication of the optical sensor is also outlined, followed by an evaluation of its analytical properties and performance for the quantitation of cocaine and related substances.

2 Experimental section

2.1 Chemicals and materials

Unless otherwise stated, all chemicals were of analytical grade and were purchased from Sigma-Aldrich (Gillingham, UK). Methanol and sodium thiosulfate (Hypo) were purchased from Fisher Scientific, UK. All solutions were prepared in deionized (DI)

water. Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) and TE (Tris-EDTA) buffer solutions were prepared using the appropriate reagents and dissolved in Ultra High Purity (UHP) water, the buffers were used at room temperature (23 °C). Microscope slides (1.0–1.2 mm thick/plain 26x76 mm) were purchased from VWR International, UK and optical glass cuvettes were purchased from Thermo Fisher Scientific, UK.

2.2 Instrumentation

Polymerization of hydrogel films was carried out using a UVItec LF 206LS UVilite lamp. Ligand synthesis was performed using a Hybaid Maxi 14 hybridization oven (Thermo Electron, UK). For fluorescence microscopy assays, an Olympus BX51 microscope (100× magnification), a U-MWB filter ($\lambda_{\text{ex}} = 460\text{--}490\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 515\text{--}700\text{ nm}$) was used. A frequency-doubled Nd-YAG Quantel Brilliant BW laser (532 nm) (Les Ulis, France) and a Quartz spreader lens (focal length 8.8 cm) were used for laser ablation. Holographic measurements were carried out by an Avantes Avaspec ULS 2048-SPU2 spectrophotometer. Cuvette set-ups and the fibre optics for spectrophotometry were supplied by Knight Photonics, UK.

2.3 Software and models

MarvinSketch 16.7.25 (ChemAxon Ltd., Hungary) was used for drawing molecular structures of the Ugi ligands. PyMOL 1.8.4.0 with AutoDock Version 4.2 program was used to predict the interactions of the designed Ugi ligand with cocaine. AvaSoft 7.2 software was used as a graphic interface of Avaspec spectrophotometer to record the holographic signals. MATLAB (R2014a) was used to generate the graphs as well as the linear regression plot to calculate the detection limit of the system.

2.4 Methods

2.4.1 Silanization of glass slides and synthesis of polymer films

For the silanization procedure, glass slides were soaked in a 2%(v/v) solution of 3-(Trimethoxysilyl)propyl methacrylate in acetone for 2 min before draining the solution and allowing the slides to dry overnight in the dark. On the following day, the glasses were rinsed thoroughly with DI water and left to dry prior to use or stored. Polymerization was performed initially by mixing the required volumes of a prepolymer solution containing the following monomers (with the correct molar ratio): 80% of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), 5% of ethylene glycol dimethacrylate (EDMA)

and 15% of methacrolein (MACR). This solution was then diluted with an equal volume of propan-2-ol. The free radical initiator 2-dimethoxy-2-phenyl acetophenone (DMPA, 1% (w/v)) was added to the mixture and vortexed briefly.

A 150 μ L of the monomer mixture was then placed on a sheet of aluminized polyester supported on a glass plate and a silanized microscope slide gently lowered onto it to spread the monomer solution and produce a uniform film. The films were polymerized for 40 min at room temperature using a UV lamp (254 nm wavelength). The aluminized polyester was peeled off and the hydrogel films were washed with DI water to remove any initiator fragments and unpolymerized monomer remaining, before being left to dry in air.

2.4.2 *Ugi synthesis on hydrogel surface*

Prior to perform Ugi reaction, the hydrogel films were subjected to a series of washes of increasing methanol concentration: From 25% (v/v) methanol up to 100% (v/v) methanol in 25% (v/v) increments. Ugi ligands were synthesized on the aldehyde-modified polymer films according to the protocol described by Haigh *et al.* [21], using a fixed concentration of pre-selected amine, carboxylic acid and isonitrile components (with 5 $\times$ molar excess to aldehyde-polymer concentration) diluted in methanol. At the end of the reaction, the Ugi-modified polymer films were washed with a series of solutions with decreasing methanol concentrations, in a way to enhance their hydrophilicity to undergo hologram construction process.

2.4.3 *Preparation of hologram with gold (III) chloride trihydrate solution*

On a clean glass surface, 300 μ L of a 0.03 M gold chloride trihydrate solution was deposited. Ugi-modified hydrogels slides were immediately placed face down onto the solution and left to soak for 3 min. The film was dried briefly under a tepid air current and immediately immersed into the reducing agent solution (1 M sodium ascorbate) until a film color change can be observed. The surface of the slides was gently swiped to remove any residual nanoparticles. After exposure to the reducing agent, the slides were removed from the solution and washed thoroughly with DI water followed by immersion for 15 min in sodium thiosulphate solution and washed again with DI water.

The slides were then placed on a reflective surface at an angle of 5° with the polymer side facing downwards, totally immersed in water. After incubation for

approximately 15 min, the samples were exposed to a single 6 ns pulse of green laser beam (Flashlamp-Q switched delay 258 μ s, 532 nm and approximately 350 mJ energy output), in which the reflective surface was used to redirect the beam back to create an ablated grating pattern on the gold hologram surface. The slides were then washed with water and left to dry.

2.4.4 Hologram readouts

Prior to spectrophotometric analysis, Ugi holographic films were cut into rectangular pieces with a diamond-tipped glass cutter to the desired size. Measurements of the holographic response were obtained following vertical placement of the holographic films in 4 mL cuvettes, and a spectrophotometer with a diffraction grating range of 360–860 nm was used to capture their spectrum representing the largest peak intensity on a single sample (holographic peak). Aqueous solutions (i.e., buffer or analyte solution) were added in 1.5 mL fractions to the cuvette and a 15 min stabilization time was allowed before recording holographic signals. In a way to evaluate the physicochemical response of Ugi-hologram films, the effect of pH, ionic strength and cocaine solutions were assessed, as well as other parameters including time response, repeatability and specificity. The experiments were all performed in triplicate, at room temperature (23 °C).

3 Results and discussion

3.1 Rational design of Ugi combinatorial library

The selection of the combinatorial library was based on X-ray and NMR crystallography studies of protein–cocaine interactions; the proteins used as models to design the ligand were human carboxylesterase-1 (hCE1) and monoclonal catalytic antibody GNL7A1 [24,25]. Human carboxylesterase 1 is a serine hydrolase found in the liver and circulating plasma that hydrolyzes esters, amides and thioesters into chemically distinct compounds. During cocaine metabolism, hCE1 catalyzes the methyl ester hydrolysis of the drug to benzoylecognine [26,27]. However, this enzyme has a broad-spectrum affinity to other compounds, such as heroin and other amine-modified substances, in an attempt to narrow down the specificity of the Ugi ligand for cocaine, the structure analysis of antibody GNL7A1 was also included in the molecular modelling studies. Antibody GNL7A1 was developed to neutralize the drug circulation

for therapeutic applications, exhibiting high binding affinity to cocaine [28]. In addition, this antibody exhibits a catalytic activity to metabolize cocaine, by hydrolyzing the benzoyl ester of the molecule to yield ecgonine methyl ester and benzoic acid, which confirms the suitability of this biomolecule as a model for the design of a cocaine affinity ligand.

A detailed inspection of the binding pockets of the abovementioned protein-cocaine complexes revealed that the amino acids involved in these interactions are: Tyr, Leu, Phe, Val, Glu, Ala, Ser and Arg; there is a predominance of hydrophobic residues that interact with cocaine in a way to stabilize the molecule in the right position for catalysis, and this is performed by Ser and Tyr residues in hCE1 and antibody GNL7A1, respectively [24,25]. A total of 52 commercially available Ugi components were selected for the combinatorial library, where 19 amines, 28 carboxylic acid and 5 isocyanides were chosen, based on their similarities to the side chain structures of the listed key amino acid residues.

3.2 Evidence for Ugi ligand formation on polymer glass surface

The criteria for ligands selection was based on the combination of the Ugi components that is most likely to recover the original structure of the proteins binding pockets as well as the hydrophobicity of the ligands (i.e., $\log P$ values). As the hydrogel film composition is hydrophilic, it was thought that adding a hydrophobic component to its structure could help redirect cocaine binding with the immobilized ligands and reduce non-specific binding on the polymer surface.

Nevertheless, it was difficult to evaluate the formation of Ugi products on the polymer surface by methods such as FT-IR and NMR spectroscopy. As an alternative, reporter fluorescent molecules, such as 1-pyrenebutyric acid (PBA), 1-pyrenemethylamine (PMA) hydrochloride and 5-carboxyfluorescein (5-FAM), were included in the combinatorial library and used as carboxylic acid and amine sources. Therefore, the Ugi scaffold formation was assessed with fluorescence microscopy.

After a preliminary screening, Ugi products obtained with the mixture of PBA and PMA hydrochloride showed low yields and were scarcely fluorescent upon image analysis. On the other hand, ligand A19C28I5 including 5-FAM (A19, amine component), γ -aminobutyric acid (GABA, C28 carboxylic acid) and cyclohexyl

isocyanide (I5 isocyanide) - according to the $A_xC_yI_z$ ligand nomenclature described by Haigh *et al.* [21] - displayed the highest fluorescence intensity observed on the polymer glass surface as shown in Figure 1. Thus, ligand A19C28I5 was chosen as a receptor for the assessment of the cocaine holographic sensor in subsequent experiments.

INSERT FIGURE 1

3.3 Effect of pH on Ugi holographic sensor

Altering the pH environment usually affects the charge of susceptible functional groups (e.g., amine and carboxylic acid) present in a hydrogel, which in turn facilitates water uptake or downtake and is consequently reflected in its overall volume [29]. Since the present Ugi-holographic sensor was developed to operate as a reflection-type hologram (which is affected by variations in the lattice spacing or the effective refractive index caused by volumetric changes on hydrogel film), the effect of pH on the holographic signal was investigated. Therefore, Ugi-holograms were tested using 100 mM sodium phosphate buffers at different pH values, ranging between 2 and 9. The pH was adjusted with monobasic, dibasic and tribasic sodium phosphate solutions to avoid the effect of a different ionic buffer composition.

As shown in Figure 2, at pH 2, there was a negative shift in wavelength ($\Delta\lambda_{\text{peak}} = -3.99\text{nm}$) due to a slight contraction of the polymer film caused by the presence of high proton concentrations (Figure 2). However, when the pH increased to 3 and 4, a positive shift in wavelength was observed in the holographic response. This is mainly due to the ionization of GABA's carboxyl group (with an apparent $pK_a \sim 4$), which increases the density of negatively charged groups within the hydrogel network, strongly accompanied by the draw in of counterions along with water molecules inside the polymer, causing the swelling effect [12,17].

INSERT FIGURE 2

As long as the pH moves up to a range of 5-6, the swelling equilibrium is reached and the system is more neutralized, leading the hologram film to shrink, due to an increasing concentration of hydroxide ions (OH^-) ions that shield the polymer ionized

acidic groups. Nevertheless, the hologram upshifts again ($\Delta\lambda_{\text{peak}} = 6.53\text{nm}$), when the pH 7 buffer solution is added to the system. In addition, the Ugi ligand does not comprise any free basic ionized groups and exhibits an apparent $pK_a \sim 7$. However, based on Marvin Sketch pK_a calculation tool, it was predicted that two hydroxyl groups on the phenol rings of 5-FAM had pK_a values of 8.52 and 9.32, which can be compatible with what was observed in the experiments, if the influence of the surrounding microenvironment on Ugi conformational structure was considered. Finally, at higher pH values (8-9), the hologram downshifts once more and the holographic signals become stable as an effect of the ionic saturation of the system. Hence, from those findings, it can be inferred that the Ugi-hologram polymer has two phase transitions, which helped to understand its behavior as an amphiphilic hydrogel.

3.4 Ionic strength effects on Ugi-hologram response

Similarly, hydrogels containing negatively and positively charged groups can be affected by ionic strength conditions; therefore, the influence of ionic strength on Ugi-holograms response was also evaluated. The experiments were conducted by testing different molarities of NaCl in TE buffer solutions, to correct for pH variation.

As a general trend, it was observed that with increasing NaCl concentrations, the hydrogel showed signs of contraction, with the peak wavelength decreasing a total of 6.21nm (Figure 3). Generally, low ionic strengths medium promotes a swelling on hydrogel films, due to the exchange of mobile counterions of the gel by the adjacent ions and arise of the osmotic pressure inside the gel [30,31]. In our case, however, the increase of chloride ions (Cl^-) concentration in solution may have caused strong interactions with water molecules, which destroyed water-polymer hydrogel bonding and enhanced the gel hydrophobicity, leading to hydrogel shrinkage [32].

INSERT FIGURE 3

3.5 Holographic sensing of cocaine solutions

After establishing the main parameters that may influence the interaction of the hologram with non-specific agents, the efficacy of the system for cocaine detection was assessed. The Ugi-hologram was tested with cocaine solutions diluted in bathing

medium (TE buffer) which was also used as a control sample. The $\Delta\lambda$ peak values were obtained by subtracting the wavelength of the holographic peaks of cocaine solutions from those recorded with TE buffer.

The results showed that the holographic signals rose gradually with increasing concentration of cocaine, indicating the expansion of the hydrogel (Figure 4). The maximum swelling displayed was $\Delta\lambda_{\text{peak}} = 21.87$ nm at 50 mM solution. The calibration curve (described by the equation $y = 0.6248x - 10.65$) has the best mathematical linear approximation between 10 mM and 50 mM, with a correlation coefficient of 0.9924 ($p < 0.000086$, $n = 6$). A detection limit of 5.69 mM could be estimated with the following equation: $3 s/m$, where s is the standard deviation of the blank solution (Ugi-holographic signals tested with TE buffer) and m is the slope of the related calibration line [33].

INSERT FIGURE 4

According to molecular interactions predictions obtained with PyMol (data not shown), cocaine molecules interact with the A19C28I5 ligand mainly via hydrophobic (π -stacking) interactions and hydrogen bonding. Nevertheless, electrostatic interactions were also expected between cocaine and positively charged carboxylic groups of the ligand, however, these interactions did not show to contribute to the binding, this could be due to the lack of ionization of the nitrogen group of cocaine mixed in TE buffer solutions (TE buffer pH = ~ 8 and cocaine $pK_a = 8.54$).

Moreover, when the molecule of cocaine binds to the ligand within the hydrogel, it can fold around it to promote hydrogen bonding and π -stacking interactions, which expands polymer chains. Thus, the lattice spacing of the gold metallic grains within the hydrogel increases, displaying longer wavelengths on the spectrophotometer. Simultaneously, with an upshift of $\Delta\lambda$ peaks, an increase of 55% in signals intensity was observed after adding cocaine in bathing medium (Figure 5), where a positive response of the sensor can be easily distinguished from a negative response. Therefore, this also confirms the great potential of the developed system to be used as a screening test for the presence of cocaine.

INSERT FIGURE 5

3.6 Time response of the holographic system

The kinetics of the maximum swelling of the Ugi-hologram over time in the presence of 50 mM cocaine solutions are shown in Figure 6. It was observed that the maximum expansion of the hydrogel is reached after an equilibration time of 15 minutes and this signal remains stable over a period of 24 hours. Although there are not strong binding forces between the ligand and cocaine, the non-covalent interactions were sufficient to keep the molecule attached to the polymer for long periods of time with maintaining nearly the same response signals, which is an important parameter for the validation of the current analytical method.

INSERT FIGURE 6

3.7 Repeatability and reversibility of holographic signals

In a way to evaluate the repeatability and reversibility of the measurements, a 50 mM cocaine solution was added to the cuvette in which the Ugi-hologram slide was placed. After reaching the maximum response, the solution was discarded and the hologram was washed with the bathing medium to remove any cocaine residue left. The holographic signals were continuously measured in cycles at least three times. The results showed that the Ugi-holograms signal changes were freely repeatable and reversible, as displayed in Figure 7, indicating that the behavior of the hydrogel towards the presence of cocaine was not affected by the wash out cycles of the system. Thus, the reusability and stability of cost-effective Ugi-holograms is highly beneficial for their applications in crime scene investigations.

INSERT FIGURE 7

3.8 Specificity studies of hologram

In a way to assess the specificity of the Ugi-hologram sensor, binding tests were performed with a xenobiotic drug. A heroin analogue (naloxone hydrochloride) was used for the tests since heroin has similar structural groups to cocaine in its chemical composition (such as a tertiary amine and aromatic rings), which makes it an appropriate choice for specificity investigations.

INSERT FIGURE 8

Initially, the wavelength shifts down when low concentrations of naloxone are added to the holographic sensor, and then moves up until a 44 mM concentration is reached (Figure 8). After this point, the holographic signals become stable and the hydrogel no longer expands, showing a different behavior when compared with that obtained with cocaine solutions. In addition, the peak intensity of the hologram at its maximum swelling decreased by 28% in contrast to the values obtained with cocaine solutions (Figure 9). Even though the sensor responded to naloxone, due to some unspecific non-covalent interactions, however, the overall holographic response was notably distinguishable from that obtained with cocaine solutions, confirming that a rationally designed Ugi ligand attached to a hydrogel holographic platform is able to display a specific interaction with cocaine.

INSERT FIGURE 9

4 Conclusion

A holographic sensor platform modified with Ugi ligands was successfully produced for the detection of cocaine at the same range of drugs presumptive assays, with a remarkable sensitivity. The system was able to distinguish different signals obtained with cocaine and related substances, which shows the great potential of this platform to be used in field drug tests. The results achieved from this pilot study are promising, and further experiments should be performed, such as tests with street samples and full chemical characterization of the sensor, in order to confirm its suitability for implementation and mass production.

Acknowledgement

The authors would like to thank Science Without Borders Program from the Brazilian government CNPq for funding the Sandwich PhD Fellowship (249597/2013-6) for Natalia C.L. Oliveira. They also would like to thank Dr. Colin Davidson and Jeff Blyth (University of Cambridge) for helpful discussions in holography and Dr. Jones Albuquerque (Universidade Federal Rural de Pernambuco) for discussions in mathematical statistics and data analysis.

References

1. Chen, T. H.; Hsu, H. Y.; Wu, S. P. The detection of multiple illicit street drugs in liquid samples by direct analysis in real time (DART) coupled to Q-orbitrap tandem mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* **2016**, 267, 1–6.
2. United Nations Office of Drugs and Crime *World Drug Report 2016*; New York, 2016.
3. United Nations Office of Drugs and Crime *Estimating the value of illicit drug markets*; New York, 2005.
4. Tsujikawa, K.; Iwata, Y. T.; Segawa, H.; Yamamuro, T.; Kuwayama, K.; Kanamori, T.; Inoue, H. Development of a new field-test procedure for cocaine. *Forensic Sci. Int.* **2017**, 270, 267–274.
5. United Nations *Recommended methods for the detection of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, methamphetamine and ring-substituted amphetamine derivatives in biological specimens*; New York, 1995.
6. Yáñez-Sedeño, P.; Agüí, L.; Villalonga, R.; Pingarrón, J. M. Biosensors in forensic analysis. A review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 823, 1–19.
7. Eliaerts, J.; Dardenne, P.; Meert, N.; Van Durme, F.; Samyn, N.; Janssens, K.; De Wael, K. Rapid classification and quantification of cocaine in seized powders with ATR-FTIR and chemometrics. *Drug Test. Anal.* **2017**.
8. Yetisen, A. K.; Naydenova, I.; da Cruz Vasconcellos, F.; Blyth, J.; Lowe, C. R. Holographic Sensors : Three-Dimensional Analyte-Sensitive Nanostructures and Their Applications. *Chem. Rev. (in Press)*. **2014**.
9. Marks, R. S.; Lowe, C. R.; Cullen, D. C.; Weetall, H. H.; Karube, I. *Handbook of Biosensors and Biochips*; Marks, R. S.; Cullen, D. C.; Karube, I.; Lowe, C. R.; Weetall, H. H., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2008.
10. Millington, R. B.; Mayes, A. G.; Blyth, J.; Lowe, C. R. A Holographic Sensor for Proteases. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4229–4233.
11. Mikulchyk, T.; Walshe, J.; Cody, D.; Martin, S.; Naydenova, I. Humidity and

temperature induced changes in the diffraction efficiency and the Bragg angle of slanted photopolymer-based holographic gratings. *Sensors Actuators, B Chem.* **2017**, *239*, 776–785.

12. Marshall, A. J.; Blyth, J.; Davidson, C. a B.; Lowe, C. R. pH-sensitive holographic sensors. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4423–31.

13. Bhowmik, K.; Peng, G. D.; Ambikairajah, E.; Rajan, G. *Photonic Materials for Sensing, Biosensing and Display Devices*; 2016; Vol. 229.

14. Yetisen, A. K.; Butt, H.; da Cruz Vasconcellos, F.; Montelongo, Y.; Davidson, C. a B.; Blyth, J.; Chan, L.; Carmody, J. B.; Vignolini, S.; Steiner, U.; Baumberg, J. J.; Wilkinson, T. D.; Lowe, C. R. Light-directed writing of chemically tunable narrow-band holographic sensors. *Adv. Opt. Mater.* **2014**, *2*, 250–254.

15. Naydenova, I.; Jallapuram, R.; Toal, V.; Martin, S. Characterisation of the humidity and temperature responses of a reflection hologram recorded in acrylamide-based photopolymer. *Sensors Actuators, B Chem.* **2009**, *139*, 35–38.

16. Mao, D.; Geng, Y.; Liu, H.; Zhou, K.; Xian, L.; Yu, D. Two-way shift of wavelength in holographic sensing of organic vapor in nanozeolites dispersed acrylamide photopolymer. *Appl. Opt.* **2016**, *55*, 6212–6221.

17. Richter, A.; Paschew, G.; Klatt, S.; Lienig, J.; Arndt, K.; Adler, H. P. Review on Hydrogel-based pH Sensors and Microsensors. **2008**, *c*, 561–581.

18. Vezouviou, E.; Lowe, C. R. A near infrared holographic glucose sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *68*, 371–381.

19. Goyal, D.; Shuaib, S.; Mann, S.; Goyal, B. Rationally designed peptides and peptidomimetics as inhibitors of amyloid- β (A β) aggregation: potential therapeutics of Alzheimer's disease. *ACS Comb. Sci.* **2017**, acscombsci.6b00116.

20. Vagner, J.; Qu, H.; Hruby, V. J. Peptidomimetics, a synthetic tool of drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 292–296.

21. Haigh, J. M.; Hussain, A.; Mimmack, M. L.; Lowe, C. R. Affinity ligands for immunoglobulins based on the multicomponent Ugi reaction. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 1440–1452.

22. Ugi, I.; Meyr, R.; Feizer, U.; Steinbriickner, C. Versuche mit isonitrilen. *Angew. Chemie* **1959**, *71*, 386.
23. El Khoury, G.; Lowe, C. R. A biomimetic Protein G affinity adsorbent: An Ugi ligand for immunoglobulins and Fab fragments based on the third IgG-binding domain of Protein G. *J. Mol. Recognit.* **2013**, *26*, 190–200.
24. Bencharit, S.; Morton, C. L.; Xue, Y.; Potter, P. M.; Redinbo, M. R. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 349–356.
25. Zhu, X.; Dickerson, T. J.; Rogers, C. J.; Kaufmann, G. F.; Mee, J. M.; McKenzie, K. M.; Janda, K. D.; Wilson, I. A. Complete reaction cycle of a cocaine catalytic antibody at atomic resolution. *Structure* **2006**, *14*, 205–216.
26. Wang, D.-D.; Zou, L.-W.; Jin, Q.; Hou, J.; Ge, G.-B.; Yang, L. Recent progress in the discovery of natural inhibitors against human carboxylesterases. *Fitoterapia* **2017**, *117*, 84–95.
27. Brzezinski, M. R.; Spink, B. J.; Dean, R. A.; Berkman, C. E.; Cashman, J. R.; Bosron, W. F. Human liver carboxylesterase hCE-1: Binding specificity for cocaine, heroin, and their metabolites and analogs. *Drug Metab. Dispos.* **1997**, *25*, 1089–1096.
28. McKenzie, K. M.; Mee, J. M.; Rogers, C. J.; Hixon, M. S.; Kaufmann, G. F.; Janda, K. D. Identification and Characterization of Single Chain Anti-cocaine Catalytic Antibodies. *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 722–731.
29. Elliott, J. E.; MacDonald, M.; Nie, J.; Bowman, C. N. Structure and swelling of poly(acrylic acid) hydrogels: Effect of pH, ionic strength, and dilution on the crosslinked polymer structure. *Polymer (Guildf)*. **2004**, *45*, 1503–1510.
30. Marshall, A. J.; Young, D. S.; Kabilan, S.; Hussain, A.; Blyth, J.; Lowe, C. R. Holographic sensors for the determination of ionic strength. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *527*, 13–20.
31. Liu, H.; Yu, D.; Mao, D.; Geng, Y.; Wang, W. Modeling swelling and absorption dynamics for holographic sensing in analytes sensitive photopolymer. *Opt. Commun.* **2016**, *368*, 95–104.

32. Gerlach, G.; Guenther, M. Hydrogel for Chemical Sensors. In *Hydrogel Sensors and Actuators*; Gerlach, G.; Arndt, K., Eds.; Springer: Berlin, 2009; Vol. 6, pp. 165–195.
33. Gumustas, M.; Ozkan, S. A. The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. **2011**, 1–21.

FIGURES

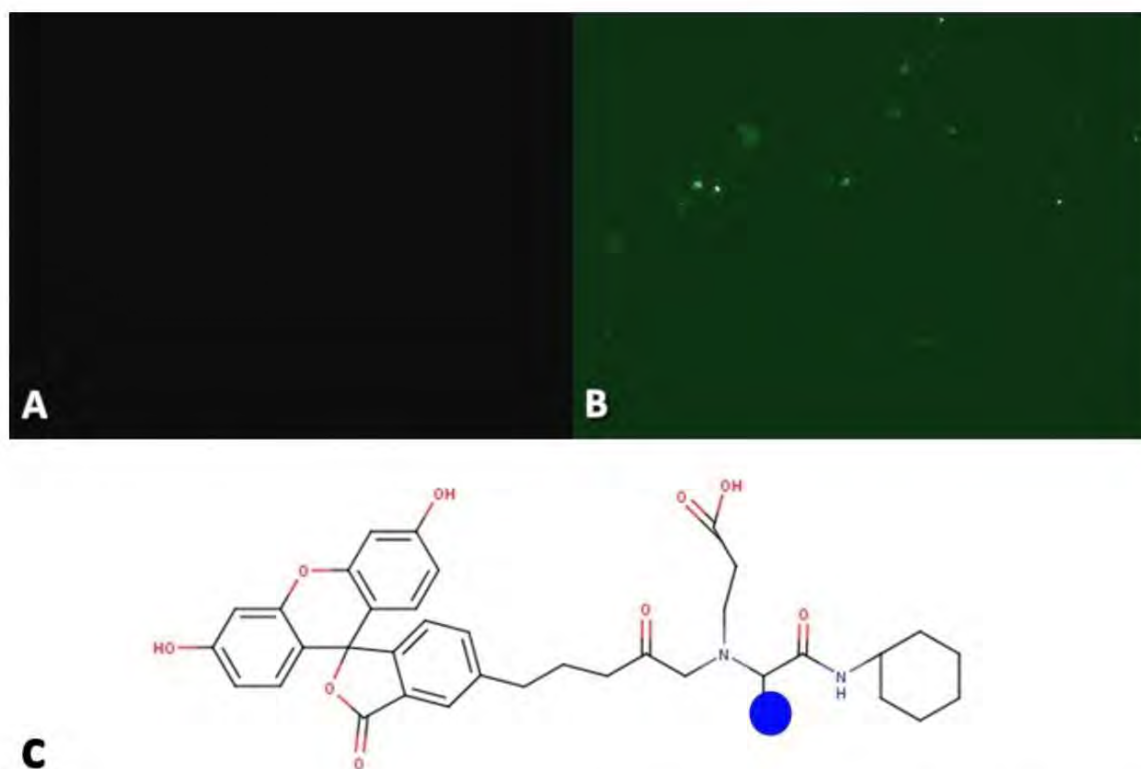


Figure 1: Fluorescence microscopy images of aldehyde-modified polymer before (A) and after (B) Ugi reaction that formed A19C28I5 ligand on hydrogel surface. Chemical structure of A19C28I5 ligand (C).

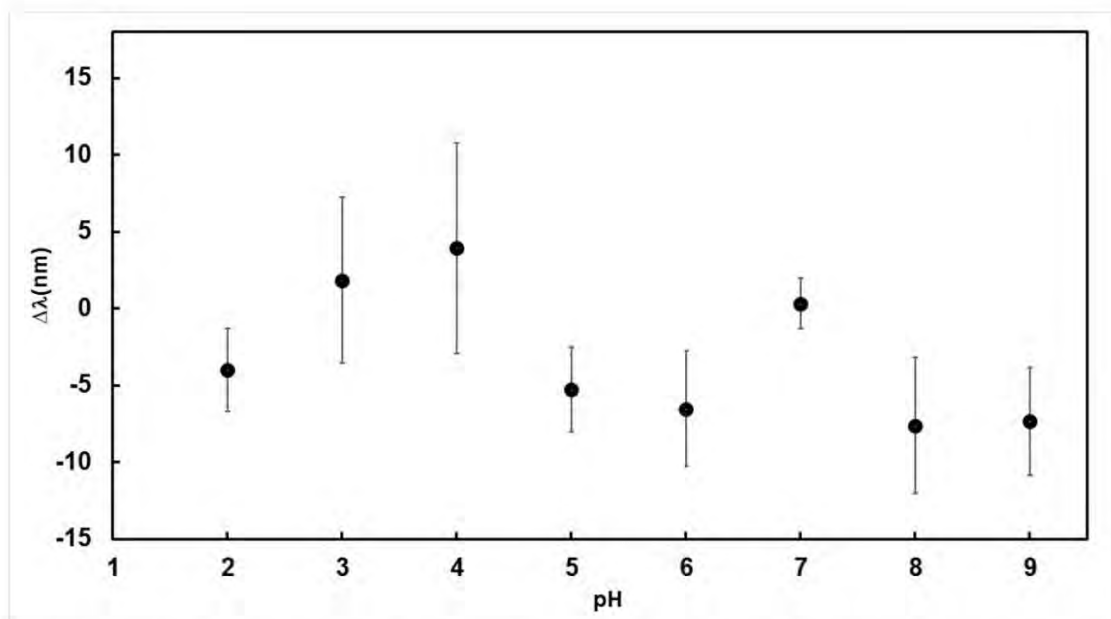


Figure 2: The effect of pH over the range 2-9 on wavelength signs of the Ugi hologram tested with phosphate buffer at 23°C. The experiments were performed three times.

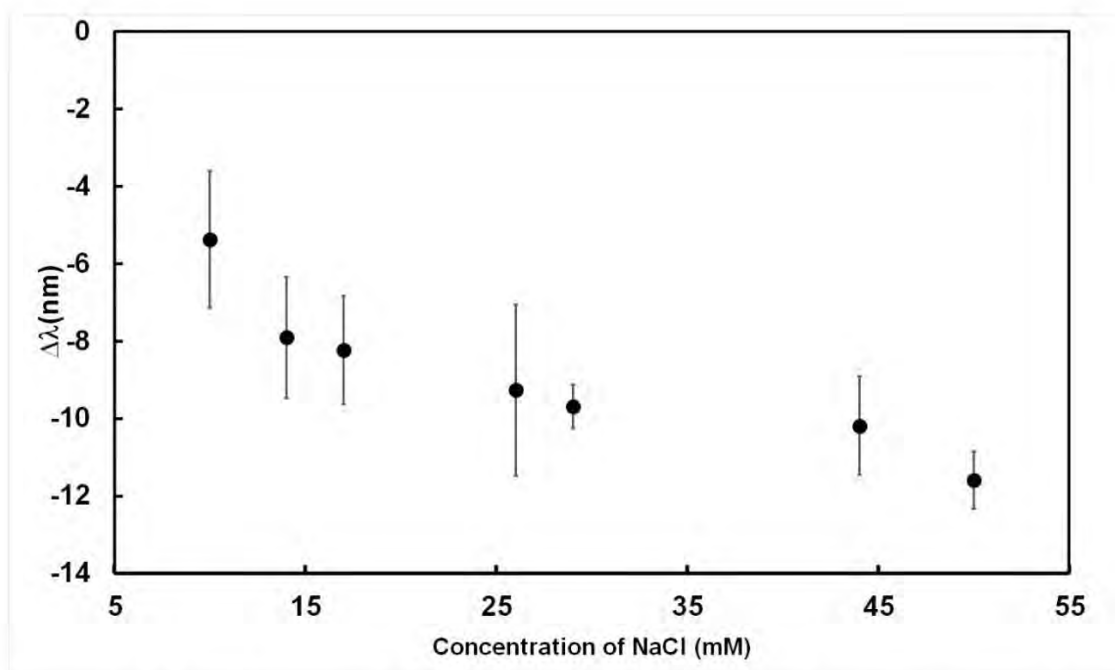


Figure 3: Effect of the ionic strength with 10-50 mM NaCl solutions on the wavelength shifts of the Ugi hologram. The experiments were performed three times.

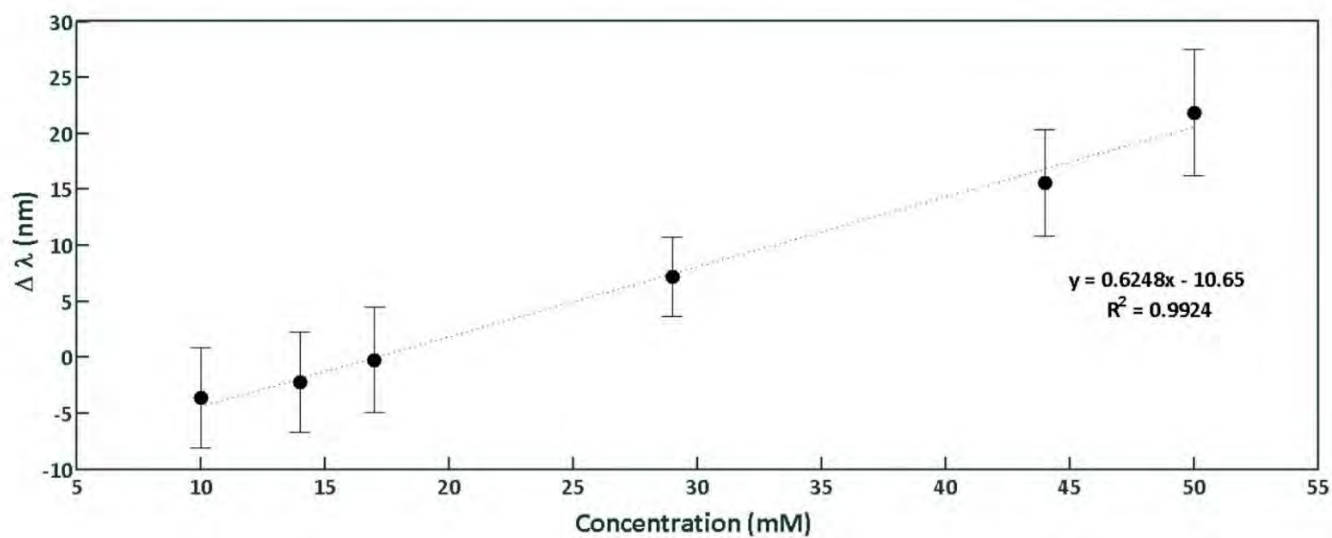


Figure 4: Ugi-hologram responses for different cocaine concentrations with related calibration curve calculated with the best mathematical linear approximation. Calculations were undertaken with MATLAB. Experiments were performed three times.

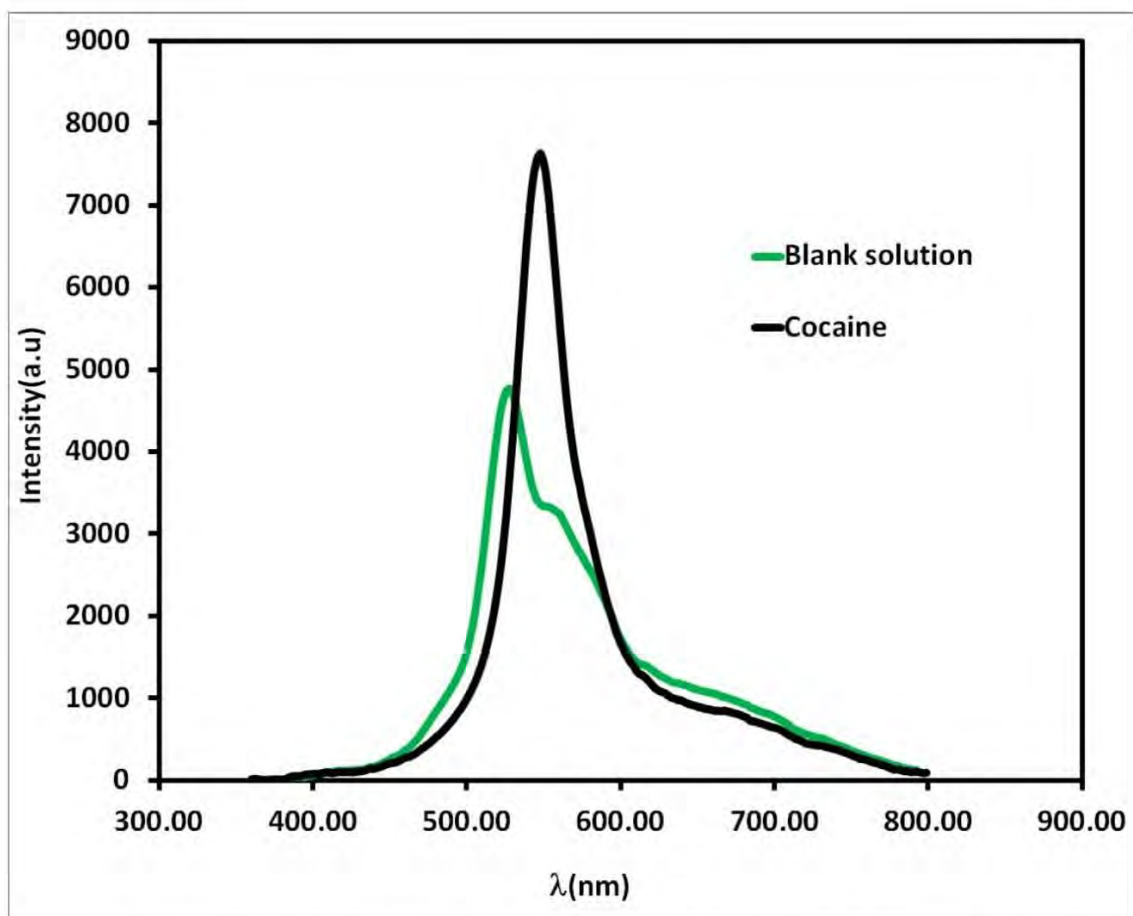


Figure 5: Spectra of highest peak of Ugi hologram responses before and after testing with (XX mM) cocaine solutions. The spectrum was collected within the UV-Vis range.

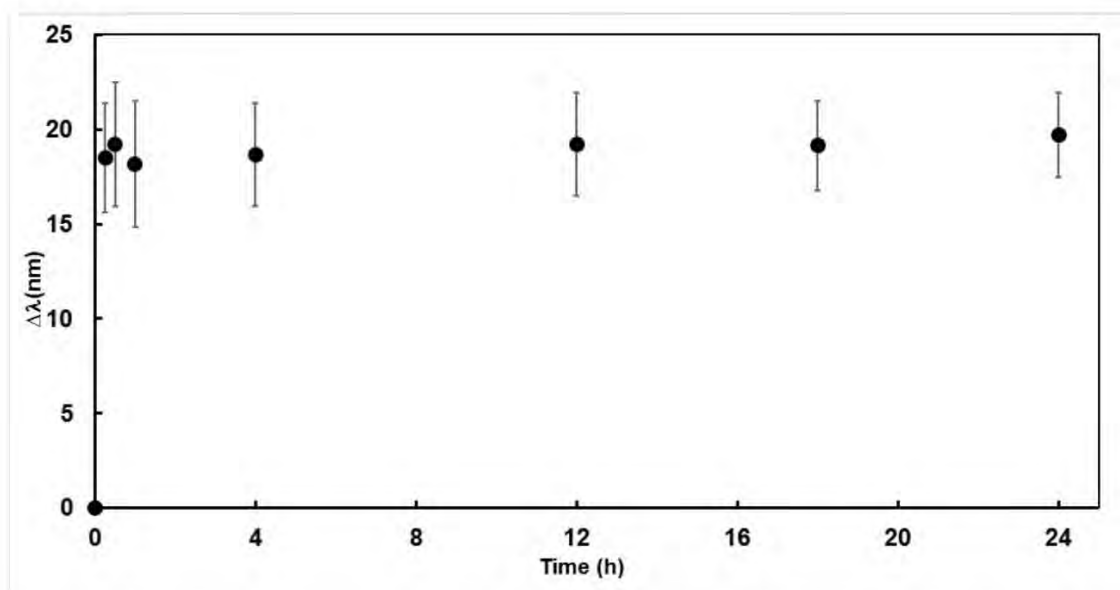


Figure 6: Time response of Ugi holographic sensor. The tests were conducted by adding a 50 mM cocaine solution in a cuvette containing the Ugi hologram and recording wavelengths values over a period of 24 hours.

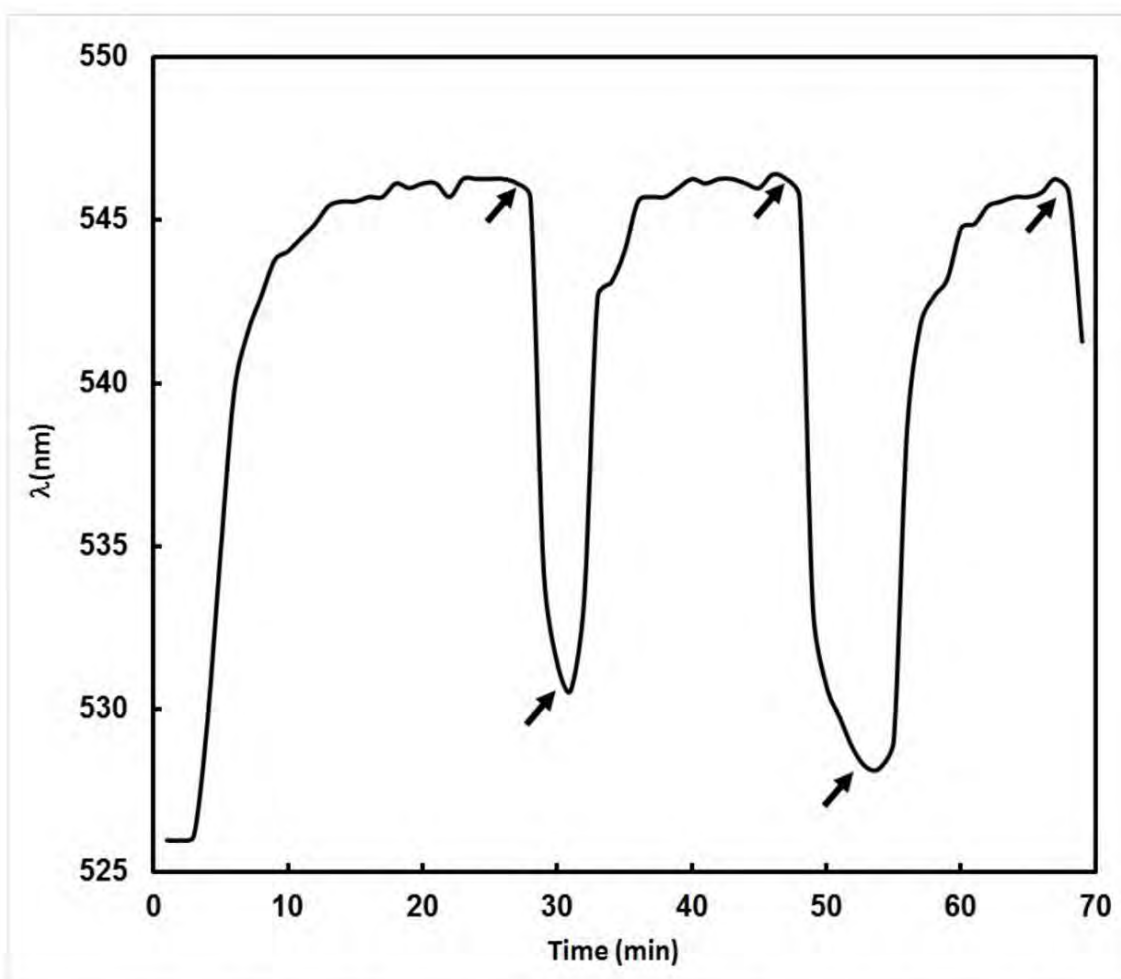


Figure 7: Repeatability of the Ugi holographic response. Arrows in the bottom indicates addition of 50 mM cocaine solution in the cuvette containing the hologram slides and top arrows indicates washing with TE buffer. Data was collected at the maximum peak intensity.

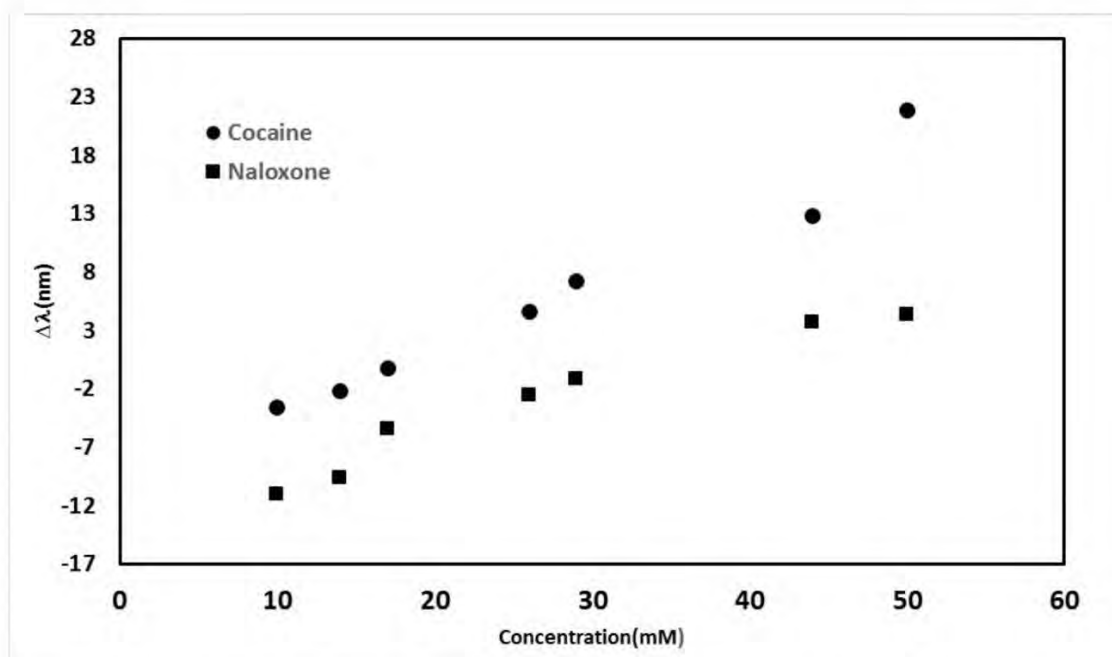


Figure 8: Comparison of the effect of cocaine and naloxone on Ugi-hologram over a range of 10-50 mM drugs solutions. The experiments were performed three times.

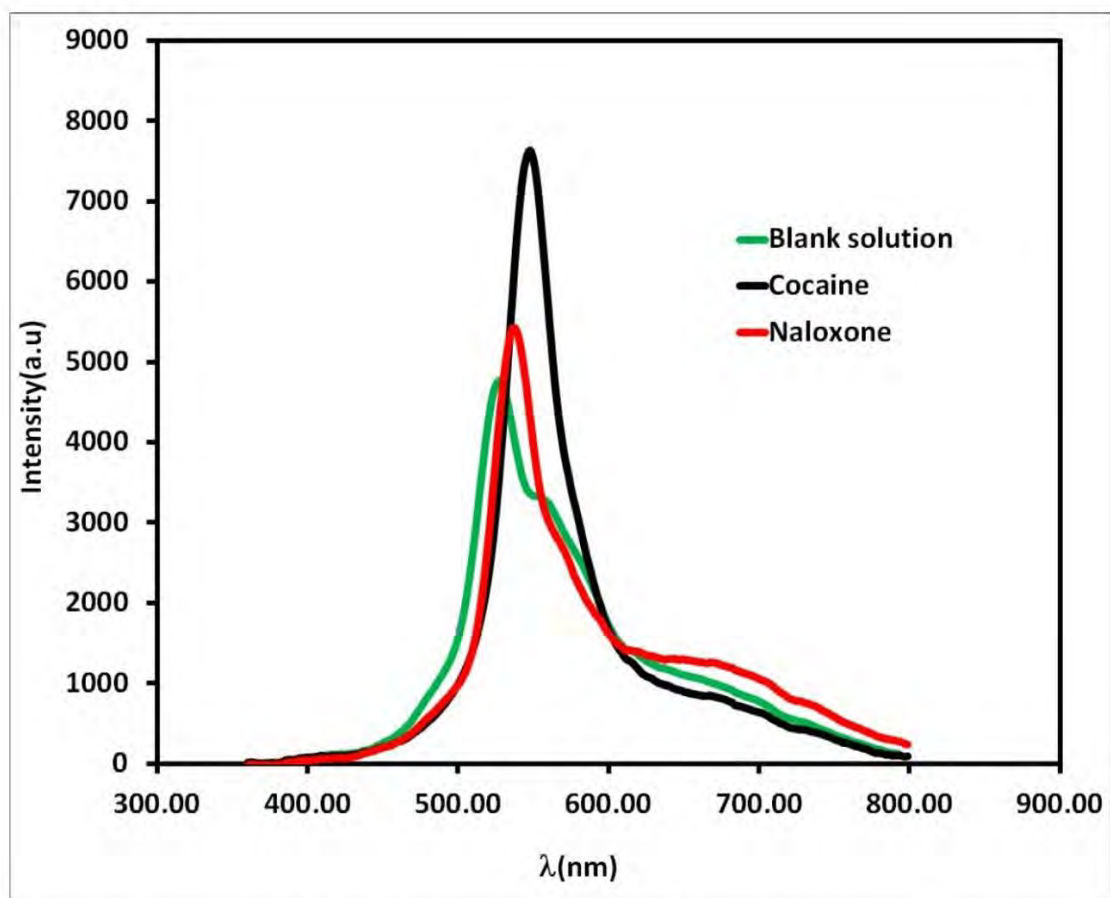


Figure 9: Comparison of highest spectrum peaks of hologram tested with cocaine and naloxone solutions.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados observados, conclui-se que os biossensores desenvolvidos foram capazes de detectar a presença de DNA e cocaína (com detecção limite de 3,09 nM e 5,69mM, nos respectivos sistemas), o que confirma a adequabilidade e a viabilidade dessas ferramentas serem aplicadas *in loco* nas perícias criminais. Atrelado a isso, os marcadores moleculares foram capazes de estabelecer um perfil sociodemográfico das vítimas de crime violento, bem como as circunstâncias do fato, colaborando na análise epidemiológica dos casos de crimes em escala global, além de auxiliar na elaboração de estratégias eficazes que visam diminuir a ocorrência de crimes violentos no país. O uso de biossensores como testes confirmatórios possui um grande potencial, que poderá contribuir no futuro com um rápido e efetivo método analítico no âmbito das ciências forenses.

REFERÊNCIAS

- BACIU, T. et al. Capillary electrophoresis and related techniques in the determination of drugs of abuse and their metabolites. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 89–108, 2015.
- BAKER, B. R. et al. An Electronic , Aptamer-Based Small-Molecule Sensor for the Rapid , Label-Free Detection of Cocaine in Adulterated Samples and Biological Fluids. **Journal of American Chemical Society**, n. Figure 3, p. 3138–3139, 2006.
- BATALHA, I. L.; ROQUE, A. C. . Petasis-Ugi ligands: New affinity tools for the enrichment of phosphorylated peptides. **Journal of Chromatography B**, v. 1031, p. 86–93, 2016.
- BENITO-PEÑA, E. et al. Fluorescence Based Fiber Optic and Planar Waveguide Biosensors. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 943, 2016.
- BLUTH, M. H.; PINCUS, M. R. Narcotic Analgesics and Common Drugs of Abuse: Clinical Correlations and Laboratory Assessment. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, n. 4, p. 603–634, 2016.
- BOBADE, S.; KALOREY, D. R.; WARKE, S. Biosensor Devices: A review on their biological applications. **Bioscience Biotechnology Research Communications**, v. 9, n. 1, p. 132–137, 2016.
- BØRSTING, C.; MORLING, N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. **Forensic Science International: Genetics**, v. 18, p. 78–89, 2015.
- BREWER, P. R.; LEY, B. L. Media Use and Public Perceptions of DNA Evidence. **Sci Commun**, v. 32, n. 1, p. 1075547009340343–1075547009340343, set. 2009.
- CIEPLAK, M.; KUTNER, W. Artificial Biosensors: How Can Molecular Imprinting Mimic Biorecognition? **Trends in Biotechnology**, v. xx, n. 11, 2016.
- CRIVIANU-GAITA, V.; THOMPSON, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 85, p. 32–45, 2016.
- FARIDBOD, F.; GUPTA, V. K.; ZAMANI, H. A. Electrochemical Sensors and Biosensors.

International Journal of Electrochemistry, p. 1–2, 2011.

FRASCIONE, N.; PINTO, V.; DANIEL, B. Development of a biosensor for human blood : new routes to body fluid identification. p. 23–28, 2012.

HADLAND, S. E.; LEVY, S. Objective Testing: Urine and Other Drug Tests. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 549–565, 2016.

HAIGH, J. M. et al. Affinity ligands for immunoglobulins based on the multicomponent Ugi reaction. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 14–15, p. 1440–1452, 2009.

HASSANI, S. et al. Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment. **Archives of Toxicology**, 2016.

HEBRARD, J.; DAOUST, F. **History of Forensic Sciences**. 2. ed. [s.l.] Elsevier Ltd., 2013.

HONG, C. C. et al. Handheld analyzer with on-chip molecularly-imprinted biosensors for electrical detection of propofol in plasma samples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 86, p. 623–629, 2016.

HORJAN, I.; BARBARIC, L.; MRSIC, G. Applicability of three commercially available kits for forensic identification of blood stains. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 38, p. 101–105, 2016.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). GLOSSARY FOR CHEMISTS OF TERMS USED. **Pure and Applied Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 143–168, 1992.

JAGERDEO, E.; SCHAFF, J. E. Rapid screening for drugs of abuse in biological fluids by ultra high performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 1027, p. 11–18, 2016.

JAMES F. RUSLING. Electrochemical biosensors. p. 1747–1763, 2010.

JUSTINO, C. I. L. et al. Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2–17, 2015.

KAKUCHI, R. Multicomponent reactions in polymer synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 1, p. 46–48, 2014.

KAMAT, S. S. The Pioneer Forensic Scientist. **Journal of the Forensic Science Society**, v. 26, n. 6, p. 421–422, 1986.

KIRBY, D. A. Forensic fictions: Science, television production, and modern storytelling. **Studies in History and Philosophy of Science Part C :Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, v. 44, n. 1, p. 92–102, 2013.

LAI, J. et al. Polyaniline-based glucose biosensor: A review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 782, p. 138–153, 2016.

LIU, A. et al. Development of electrochemical DNA biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 37, p. 101–111, 2012.

LLANDRO, J. et al. Magnetic biosensor technologies for medical applications : a review. **Medical, & Biological Engineering & Computing**, p. 977–998, 2010.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology : Technology push versus market pull. **Analytical Chemistry**, v. 26, p. 492–500, 2008.

MARKS, R. S. et al. **Handbook of Biosensors and Biochips**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2008.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications - A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.

MOHANTY, S. P.; KOUCIANOS, E. Biosensors: A tutorial review. **IEEE Potentials**, v. 25, n. 2, p. 35–40, 2006.

MONGRA, A. C.; KAUR, A. Overview of Biosensors Development Around the World. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v. 3, n. 7, p. 519–530, 2012.

MURO, C. K. et al. Forensic body fluid identification and differentiation by Raman spectroscopy. **Forensic Chemistry**, v. 1, n. 2016, p. 31–38, 2016.

NEVES, M. A. D. et al. Defining the secondary structural requirements of a cocaine-binding aptamer by a thermodynamic and mutation study. **Biophysical Chemistry**, v. 153, p. 9–16, 2010.

PARKER, L. S.; JOHN, A.; ARONSON, J. D. Forensic Science International : Genetics

Incidental findings in the use of DNA to identify human remains : An ethical assessment.

Forensic Science International: Genetics, v. 7, n. 2, p. 221–229, 2013.

ROUSHANI, M.; SHAHDOST-FARD, F. A highly selective and sensitive cocaine aptasensor based on covalent attachment of the aptamer-functionalized AuNPs onto nanocomposite as the support platform. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p. 214–221, 2015.

SEBASTIANY, A. P. et al. A utilização da Ciência Forense e da Investigação Criminal como estratégia didática na compreensão de conceitos científicos. **Educación Química**, v. 24, n. 1, p. 49–56, 2013.

SHARMA, P. P. et al. Integrated platform for detecting pathogenic DNA via magnetic tunnelling junction-based biosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 2016.

SIKIRZHYTSKI, V.; SIKIRZHYTSKAYA, A.; LEDNEV, I. K. Advanced statistical analysis of Raman spectroscopic data for the identification of body fluid traces : Semen and blood mixtures. **Forensic Science International**, v. 222, n. 1–3, p. 259–265, 2012.

SINGH, V. et al. Biosensor Developments : Application in crime detection. **International Journal of Engineering and Technical Research**, p. 163–166, 2014.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 127–133, 2016.

SMITH, M. P.; BLUTH, M. H. Forensic Toxicology: An Introduction. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 36, n. 4, p. 753–759, 2016.

SWENSEN, J. S. et al. Continuous, Real-Time Monitoring of Cocaine in Undiluted Blood Serum via a Microfluidic, Electrochemical Aptamer-Based Sensor. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 1, p. 4262–4266, 2009.

TERESHCHENKO, A. et al. Optical biosensors based on ZnO nanostructures: Advantages and perspectives. A review. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 229, p. 664–677, 2016.

THÉVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, n. 1–2, p. 121–131, 2001.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Global Biosensors Market 2012 - 2018**. [s.l.:

s.n.].

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Global Biosensors Market - 2014-2020. p. 1–96, 2013.

ULUDAG, Y. et al. Lab-on-a-chip based biosensor for the real-time detection of aflatoxin. v. 160, p. 381–388, 2016.

VASILESCU, A. et al. Electrochemical Affinity Biosensors Based on Disposable Screen-Printed Electrodes for Detection of Food Allergens. **Sensors**, v. 16, n. 11, p. 1863, 2016.

VIGNESHVAR, S. et al. Recent Advances in Biosensor Technology for Potential Applications – An Overview. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, n. February, p. 1–9, 2016.

VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. **Science**, v. 188, p. 1–17, 2009.

WANG, T. et al. Magnetic impedance biosensor: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, n. October, 2016.

WANG, Z. et al. Forensic Science International: Genetics Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. v. 7, p. 116–123, 2013.

XU, F. et al. Combined affinity and catalytic biosensor: In situ enzymatic activity monitoring of surface-bound enzymes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 38, p. 13084–13085, 2005.

XU, M.; WANG, R.; LI, Y. Electrochemical biosensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7. **Talanta**, v. 162, p. 511–522, 2017.

YAKOVLEVA, M.; BHAND, S.; DANIELSSON, B. The enzyme thermistor-A realistic biosensor concept. A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 1–12, 2013.

YAMANAKA, K.; VESTERGAARD, MUN'DELANJI C. TAMIYA, E. Printable Electrochemical Biosensors: A Focus on Screen-Printed Electrodes and Their Application. **Sensors**, v. 16, n. 1761, p. 1–16, 2016.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P. et al. Biosensors in forensic analysis. A review. **Analytica chimica acta**, v. 823, p. 1–19, 1 maio 2014.

YETISEN, A. K. et al. Holographic Sensors: Three-Dimensional Analyte-Sensitive Nanostructures and Their Applications. **Chemical Reviews (in press)**, 2014.

ZHANG, F.-T. et al. Immobilization-free DNA-based homogeneous electrochemical biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 17–32, 2016.

ZHONG, X. et al. Single-nucleotide polymorphism genotyping on optical thin-film biosensor chips. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, n. 20, p. 11559–11564, 2003.

APÊNDICE - CAPÍTULO DE LIVRO: BIOSSENSORES APLICADOS ÀS CIÊNCIAS FORENSES

BIOSSENSORES APLICADOS ÀS CIÊNCIAS FORENSES

Introdução

A Ciência Forense é um conjunto de componentes ou áreas que, em conjunto, atuam de modo a resolver casos de caráter legal, sendo sua definição mais ampla a aplicação da ciência à lei. A palavra forense deriva do latim *forensis*, com significado de público, sendo relativa ao fórum ou à discussão pública, onde atualmente é empregada nas cortes judiciais (SOUZA, 2008). Devido à sociedade tornar-se dependente das leis para regular as atividades de seus membros e considerando-se a vasta disposição das leis civis e criminais que a regulam, as ciências forenses aplicam o conhecimento e a tecnologia da ciência no cumprimento das leis sociais (VELHO; GEISER; ESPÍNDULA, 2012).

O interesse em desvendar crimes por meio das ciências forenses formou o enredo de vários romances da literatura mundial, indo desde personagens como Dupin, de Edgar Allan Poe, até os mais ilustres, como Sherlock Holmes, de Arthur Conan Doyle e Hercule Poirot, de Agatha Christie (BREWER; LEY, 2009). Nos últimos anos o interesse pelas ciências forenses tem crescido de modo gradual, principalmente pelo foco da mídia, através de séries televisivas que abordam esta temática, como é o caso da série norte-americana CSI (Crime Scene Investigation), que retrata o cotidiano das equipes de pesquisadores forenses, atraindo assim a curiosidade do público para as investigações criminais (HOUCK, 2006).

O uso do conhecimento científico no âmbito criminal vem fundamentando um papel importante na apuração das circunstâncias em um crime. Várias tecnologias realizadas para tal finalidade exibem uma boa seletividade e sensibilidade em seus métodos analíticos; entretanto, estas são incapazes de serem realizadas em tempo real (FOUDEH et al., 2012). Além disso, estas análises frequentemente requerem

procedimentos complexos e demorados, o que precisa demanda uma busca de novas tecnologias que visam superar estas dificuldades, como é o caso dos biossensores que serão exibidos a seguir.

Identificação de explosivos e ameaças biológicas

A detecção de ameaças químicas e biológicas é um aspecto fundamental na Segurança Interna de um país e também no militarismo. Os métodos atuais utilizados para a identificação desses agentes são baseados principalmente em testes que exigem instrumentação avançada, como HPLC (High Performance Liquid Chromatography), espectroscopia de massa e PCR (Polimerase Chain Reaction) (NIE et al., 2011; UPADHYAYULA, 2012). Entretanto, essas técnicas demandam um longo tempo de análise e não são aplicáveis em estudos de campo, o que impede, por exemplo, uma melhor delimitação de estratégias de guerra, bem como uma rápida prevenção e recuperação de ataques terroristas. As pesquisas de biossensores desenvolvidas nessa área, então, visam suplantando estas presentes dificuldades (SMITH; D'SOUZA; NICKLIN, 2008).

Explosivos: TNT

O explosivo mais usado mundialmente é ainda o trinitrotolueno (TNT). Além do perigo de explosivos esquecidos em minas ou munições não ativadas ou durante um acidente de risco, o TNT possui um risco de saúde por longos períodos para a população (EHRENTREICH-FÖRSTER; ORGEL; RIMMELE, 2008). O TNT contamina águas industriais ou podem ser liberados de instalações obsoletas. Para serem capazes de proteger a população civil e militar bem como delimitar e evacuar áreas previamente usadas para armazenagem e processamento de munições, há uma necessidade por um método rápido, confiável e barato para detectar explosivos (BROMAGE et al., 2007; SABLOK et al., 2013).

Matsumoto et al. (2005) descreveram a detecção de TNT a partir de anticorpos policlonais por meio de um SPR portátil. Os anticorpos foram obtidos a partir do soro de coelhos e através da imunorreação indireta competitiva, o sistema apresentou uma detecção limite de aproximadamente 1×10^{-11} g/mL (10 ppt). Outro biossensor desenvolvido por Bhalla e colaboradores (2011) baseia-se na imobilização de

cloroplastos obtidos de folhas de espinafre em eletrodos impressos, em que explora a inibição do fotossistema II pela exposição a herbicidas e explosivos, incluindo o TNT. A presença do explosivo é evidenciada pela diminuição do pico de corrente detectado pelo transdutor, devido à ligação do TNT à plastoquinona móvel Q_B , prevenindo a transferência de elétrons gerados pela fotossíntese chegarem à superfície do eletrodo (após uma breve exposição do biossensor à luz). A detecção limite do biossensor foi estimada em 378 nM, ao utilizar a duroquinona como marcador, e de 675 nM, com o ferricianida, considerada como elevada pelos autores. Fatores como baixa solubilidade do TNT em água e baixa permeabilidade da matriz de imobilização feita de BSA-glutaraldeído ao TNT foram atribuídos ao desempenho insuficiente do biossensor, sendo que novas pesquisas estão sendo feitas para minimizar estes efeitos, otimizando assim a performance do dispositivo.

Armas biológicas: Bacillus anthracis

O *Bacillus anthracis* é o agente causativo do antraz, uma doença com um alto índice de mortalidade em humanos e animais (HICKS et al., 2012). A bactéria produz esporos que sobrevivem por longos períodos em ambientes desfavoráveis, além de serem de fácil dispersão, o que a configura como uma das principais armas biológicas a serem utilizadas em ataques terroristas, como o ocorrido nos Estados Unidos em 2001 (BHATTA et al., 2011; WANG et al., 2013). Devido a este fato, vários estudos foram feitos para o desenvolvimento de métodos de detecção rápida dos esporos de *B. anthracis*, para prevenir e controlar sua disseminação em um território.

O uso de nanopartículas de ouro funcionalizadas com sondas de DNA para capturar sequências gênicas do *B. anthracis* (sequências do cromossomo Ba813 e do plasmídeo PXO1), foram empregadas para amplificar os sinais eletrônicos oriundos do reconhecimento biológico com o agente biológico, em que uma microbalança de quartzo age como transdutor piezoelétrico (Figura 1) (HAO et al., 2011). Este estudo demonstrou que o dispositivo pôde detectar especificamente essa bactéria num intervalo de 30 minutos (tempo muito inferior a técnicas rotineiras, como o PCR, que duram cerca de 2 horas) e que o sinal produzido pela ligação biológica com o alvo era amplificado em até 14 vezes, quando as nanopartículas de ouro eram empregadas nos experimentos.

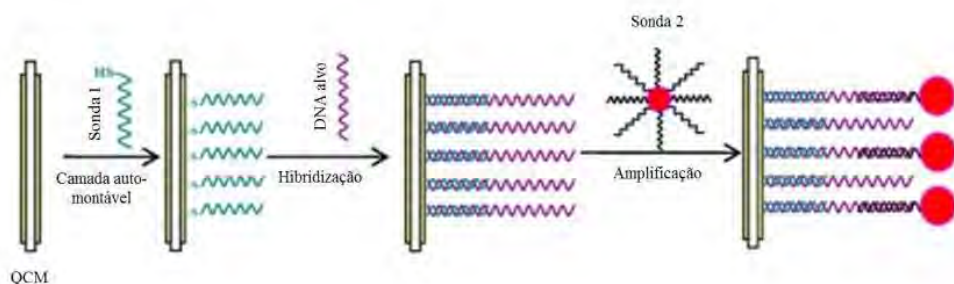


Figura 1: Ilustração esquemática da imobilização da sonda de DNA na superfície do QCM, seguido pela hibridização com sequência-alvo e subsequente amplificação do sinal pela ligação com uma segunda sonda de DNA funcionalizada com nanopartículas de ouro. Adaptado de Hao et al., 2011.

Uma combinação entre imunofluorescência indireta e interações estreptavidina-biotina também foram usadas para a detecção do *B.anthraxis* (XIAO-HONG et al., 2011). Utilizando-se quantum dots (QD) para evidenciar a ligação de anticorpos anti-*B.anthraxis*, foi verificado que o sistema apresentou uma boa relação linear entre a intensidade da fluorescência e as unidades formadoras de colônias (entre as concentrações de 1×10^2 UFC/mL e 1×10^6 UFC/mL), além de uma especificidade, em que o tempo total da processo foi de aproximadamente 1 hora.

Alcoolemia

Dirigir sobre a influência de álcool é um significativo problema de saúde pública mundial, que resulta em acidentes fatais quase todos os anos. Essa substância possui importância não só medicina legal, como também clínica médica, por ocasionar um número elevado de óbitos nos dias atuais, decorridos pelo abuso do álcool (BONI et al., 2012). Como é do conhecimento geral, a alcoolemia serve como um “padrão ouro” nos quais os policiais comprovam o fato de que os condutores estejam dirigindo embriagados. Então, uma medida precisa do álcool sanguíneo é muito importante para a medicina forense e para as ações judiciais (LUO et al., 2008).

Atualmente, as pesquisas com biossensores focam-se na detecção eletroquímica do álcool, imobilizando-se as enzimas álcool desidrogenase (ADH) ou álcool oxidase na superfície de um eletrodo. Salimi et al. (2012) construíram um biossensor eletroquímico com ADH para a detecção do etanol, em que a superfície do eletrodo de trabalho (carbono) foi modificada com nanopartículas de zircônio. Foi verificado que o uso das nanopartículas facilitou a troca de elétrons entre o centro ativo da enzima e o eletrodo

de carbono por facilitar uma melhor imobilização da enzima nessa superfície. Além disso, o sistema apresentou uma excelente estabilidade a baixas temperaturas e a longos prazos de tempo, não mudando seu padrão de resposta analítica. Uma modalidade mais prática e rápida para a detecção do álcool foi proposta por Zhen et al. (2011), ao utilizar eletrodos impressos modificados com nanotubos de carbono e azul de metileno (Figura 2).

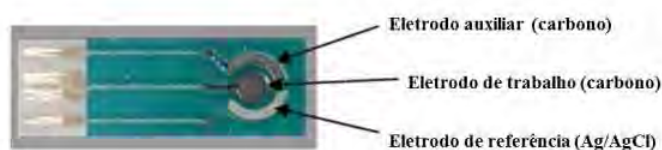


Figura 2: Fotografia do eletrodo impresso utilizado para determinar os níveis de álcool sérico e seus respectivos componentes. Adaptado de Zhen et al. (2011).

Após a caracterização da superfície e comprovar uma melhor condutividade elétrica na superfície do eletrodo com o uso dos nanotubos de carbono, a performance do biossensor pôde ser medida, em que seu tempo de resposta eletroquímico foi menor que 15 s, com uma detecção limite de $50\mu\text{L}$. Além disso, uma boa correlação entre diferentes concentrações de álcool contidos em amostras de sangue foi visualizada, ao comparar os resultados obtidos por com os analisados pela cromatografia de gás, validando o biossensor como método analítico para a determinação da alcoolemia.

Identificação humana

A identificação precoce e definitiva de vestígios humanos é um dos aspectos de importância máxima em uma cena de crime, independente sob quais circunstâncias os mesmos foram encontrados. A partir desse pressuposto, várias biossensores foram desenvolvidos e alguns até comercializados para caracterizar a origem humana de amostras biológicas.

Detecção de fluidos corporais humanos

Identificar a origem de vestígios biológicos encontrados em uma cena de crime é um fator de importante nas investigações, em que possibilita reconstruir o ambiente e as

diferentes pares de oligômeros alelo-discriminante (sonda P1) foram imobilizados, diferindo somente em uma bases na sequência 3' terminal. Uma segunda sonda (P2), contendo parte da sequência complementar ao alvo, possui uma biotina na extremidade 3', que age como marcador, e uma extremidade fosfato na 5', para formar uma ligação fosfodiéster com sonda P1. A hibridização do alvo e a ligação entre P1 e P2 são feitas simultaneamente durante 20 minutos de incubação na presença de uma DNA ligase termoestável. Após lavagem com NaOH para remover todas as moléculas não ligadas, a sonda P2 biotinilada é detectada pela incubação com anticorpo anti-biotina conjugado com HPR (horseradish peroxidase), formando um precipitado detectável. A deposição de massa no substrato do chip mostra uma mudança de cor de dourado para azul/roxo na superfície do chip, o que, dependendo da densidade do oligonucleotídeo no spot, pode ser vista a olho nu ou por um simples sistema digital de imagens.

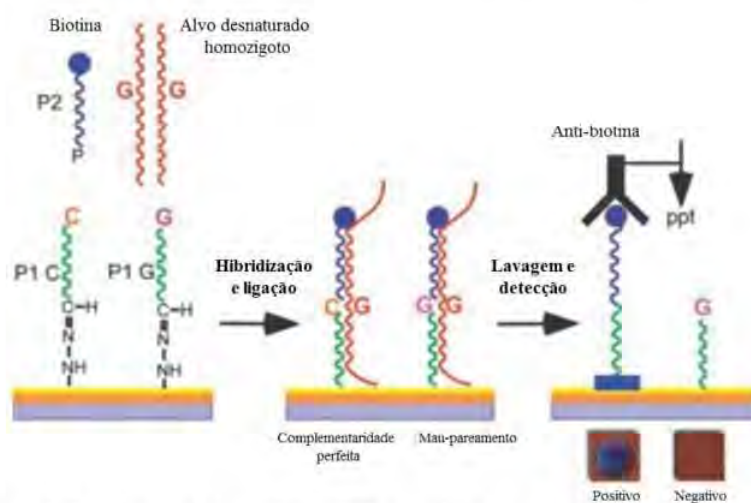


Figura 3: Etapas para a detecção de SNPs em chip óticos. Adaptado de Zhong et al. 2003.

A capacidade desse biossensor para realizar a tipagem de SNPs em estudos de genética de população foi avaliada, utilizando-se sondas para 20 diferentes SNPs que mapeiam o cromossomo 17 de humanos. As análises revelaram que o biossensor desenvolvido possui o mesmo poder discriminativo de uma PCR em tempo real; quando se compara os resultados das tipagens dos SNPs e os índices desvios de Hardy-Weinberg realizados pelas duas técnicas, verifica-se que não há diferenças analíticas significativas entre os dois métodos, o que confirma a aplicabilidade do biossensor para realizar a identificação humana.

Conclusões

Os biossensores foram demonstrados como sendo poderosas ferramentas para as ciências forenses, agindo como testes para a detecção de substâncias químicas e de vestígios biológicos. Os dispositivos possuem uma simples performance, com resultados de fácil interpretação e com resposta relativamente rápida. Novas pesquisas, entretanto, são necessárias para melhorar o desempenho desses biossensores, podendo futuramente contribuir para os avanços da ciência forense no âmbito nacional e mundial.

Referências Bibliográficas

- ABACUS DIAGNOSIS. 2013. Disponível em <<http://www.abacusdiagnostics.com/index.html>> Acesso em 05 abr 2013
- BHALLA, V.; ZHAO, X.; ZAZUBOVICH, V. Detection of explosive compounds using Photosystem II-based biosensor. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 657, n. 1-2, p. 84-90, jul. 2011.
- BHATTA, D. et al. Optical microchip array biosensor for multiplexed detection of bio-hazardous agents. **Biosensors & bioelectronics**, v. 30, n. 1, p. 78-86, 15 dez. 2011.
- BONI, R. DE et al. Regional differences associated with drinking and driving in Brazil. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 34, n. 3, p. 306-313, set. 2012.
- BREWER, P. R.; LEY, B. L. Media Use and Public Perceptions of DNA Evidence. **Sci Commun**, v. 32, n. 1, p. 1075547009340343-1075547009340343, set. 2009.
- BROMAGE, E. S. et al. The development of a real-time biosensor for the detection of trace levels of trinitrotoluene (TNT) in aquatic environments. **Biosensors & bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2532-8, 15 maio. 2007.
- BUILES, J. J. et al. New alternative for human identification . Investigator IDplex Kit – QIAGEN 1 reproducibility : Latin American interlaboratory study. v. 3, p. 83-84, 2011.
- EHRENTREICH-FÖRSTER, E.; ORGEL, D.; RIMMELE, M. Biosensor-based on-site explosives detection using aptamers as recognition elements. p. 1793-1800, 2008.
- FOUDEH, A. M. et al. Microfluidic designs and techniques using lab-on-a-chip devices for pathogen detection for point-of-care diagnostics. **Lab on a chip**, v. 12, n. 18, p. 3249-66, 21 set. 2012.

HAO, R. et al. Biosensors and Bioelectronics DNA probe functionalized QCM biosensor based on gold nanoparticle amplification for *Bacillus anthracis* detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 8, p. 3398-3404, 2011.

HICKS, C. W. et al. NIH Public Access. v. 38, n. 7, p. 1092-1104, 2012.

HOUCK, M. M. CSI Reality. **Scientific American**, p. 85-89, 2006.

LUO, P. et al. Determination of serum alcohol using a disposable biosensor. **Forensic science international**, v. 179, n. 2-3, p. 192-8, 6 ago. 2008.

MATSUMOTO, K. et al. Preparation and characterization of a polyclonal antibody from rabbit for detection of trinitrotoluene by a surface plasmon resonance biosensor. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 305-11, 15 dez. 2005.

NIE, D. et al. Two-dimensional molecular imprinting approach for the electrochemical detection of trinitrotoluene. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 156, n. 1, p. 43-49, ago. 2011.

PARKER, L. S.; JOHN, A.; ARONSON, J. D. Forensic Science International : Genetics Incidental findings in the use of DNA to identify human remains: An ethical assessment. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 2, p. 221-229, 2013.

SABLOK, K. et al. Amine functionalized graphene oxide/CNT nanocomposite for ultrasensitive electrochemical detection of trinitrotoluene. **Journal of hazardous materials**, v. 248-249C, p. 322-8, 15 mar. 2013.

SALIMI, F. et al. A novel Alcohol Biosensor Based on Alcohol Dehydrogenase and Modified Electrode with ZrO₂ Nanoparticles. v. 7, p. 7225-7234, 2012.

SIKIRZHYTSKI, V.; SIKIRZHYTSKAYA, A.; LEDNEV, I. K. Advanced statistical analysis of Raman spectroscopic data for the identification of body fluid traces : Semen and blood mixtures. **Forensic Science International**, v. 222, n. 1-3, p. 259-265, 2012.

SMITH, R. G.; D'SOUZA, N.; NICKLIN, S. A review of biosensors and biologically-inspired systems for explosives detection. **The Analyst**, v. 133, n. 5, p. 571-84, maio. 2008.

UPADHYAYULA, V. K. K. Analytica Chimica Acta Functionalized gold nanoparticle supported sensory mechanisms applied in detection of chemical and biological threat agents : A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 715, p. 1-18, 2012.

VIRKLER, K.; LEDNEV, I. K. Analysis of body fluids for forensic purposes : From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. **Science**, v. 188, p. 1-17, 2009.

WANG, D.-B.; TIAN, B. et al. Rapid detection of *Bacillus anthracis* spores using a super-paramagnetic lateral-flow immunological detection system. **Biosensors & bioelectronics**, v. 42, p. 661-7, 15 abr. 2013.

WANG, Z.; ZHANG, J. et al. Forensic Science International : Genetics Screening and confirmation of microRNA markers for forensic body fluid identification. v. 7, p. 116-123, 2013.

XIAO-HONG, L. I. U. et al. Detection of Bacillus Anthracis Using Fluorescence Immunoassay with Quantum Dots Labels. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 2, p. 163-167, 2011.

ZHEN, S. et al. A novel microassay for measuring blood alcohol concentration using a disposable biosensor strip. **Forensic science international**, v. 207, n. 1-3, p. 177-82, 15 abr. 2011.

ZHONG, X. et al. Single-nucleotide polymorphism genotyping on optical thin-film biosensor chips. v. 100, n. 20, p. 11559-11564, 2003.

ANEXO A – PATENTE: PLATAFORMA TRANSDUTORA COMPOSTA DE 3,4-ETILENODIOXITIOFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO AMINOBENZENOSULFÔNICO



< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado para o protocolo

Espaço reservado para a etiqueta

Espaço reservado para o código QR



INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

 Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 1/3
		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

Depósito de Pedido de Patente

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: José Luiz de Lima Filho
 1.2 Qualificação: Médico
 1.3 CNPJ/CPF: 216382414-49
 1.4 Endereço Completo: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235
 1.5 CEP: 50670-901
 1.6 Telefone: (81) 2126-8080
 1.7 Fax:
 1.8 E-mail: joseluiz60@mac.com

☐ continua em folha anexa

- 2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

PLATAFORMA TRANSDUTORA COMPOSTA DE 3,4-ETILENODIOXITIOFENO FUNCIONALIZADO COM ÁCIDO AMINO BENZENOSULFÔNICO

☐ continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão: do pedido N°** **Data de Depósito:**

- 5. Prioridade:** ☐ Interna (66) ☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 2/3
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: José Luiz de Lima Filho

6.2 Qualificação: médico

6.3 CPF: 216382414-49

6.4 Endereço Completo: Av. Professor Moraes Rêgo - 1235, Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (81) 2126-8080

6.7 FAX:

6.8 E-mail: joseluiz60@mac.com

☒ continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

☐

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

☐ Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

☐ continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

☐


INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
	Formulário		3/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código:	Versão:
FQ001		2	
		Procedimento:	
		DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
☒	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
☐	11.2	Procuração.	
☐	11.3	Documentos de Prioridade.	
☐	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
☒	11.5	Relatório descritivo.	7
☒	11.6	Reivindicações.	1
☒	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	5
☒	11.8	Resumo.	1
☐	11.9	Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
☐	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de seqüências.	
☐	11.11	Listagem de seqüências em formato impresso.	
☐	11.12	Declaração relativa à Listagem de seqüências.	
☒	11.13	Outros (especificar) Lista de autores	2

12. Total de folhas anexadas: 17 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

 Recife, 23 de julho de 2014
 Local e Data

 Assinatura e Carimbo

6. Inventores (72)

6.1 Maria Amélia Carlos Souto Maior Borba

6.2 Qualificação: Estudante

6.3 CPF:

XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone:

(XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: mariameliaborba@gmail.com

6.1 Danielly Santos Campos Ferreira

6.2 Qualificação: Biomédica

6.3 CPF:

XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone:

(XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: 8771-0112

6.1 Deborah Maria Landim Zanforlin

6.2 Qualificação: Biomédica

6.3 CPF:

XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone:

(XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: deborahzanforlin@gmail.com

6.1 Gustavo Alves do Nascimento

6.2 Qualificação: Biólogo

6.3

CPF: XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone:

(XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: galvesn@gmail.com

6.1 Natália Cybelle Lima Oliveira

6.2 Qualificação: Bióloga

6.3 CPF:

XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone:

(XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: nataliacybelle89@gmail.com

6.1 Mirella Monteiro Silva

6.1 Qualificação: Estudante

6.3 CPF: XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: mirellamonteiros@gmail.com

6.1 Renato Pessoa e Melo Neto

6.2 Qualificação: Estudante

6.3 CPF: XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: renatopessoaneto@gmail.com

6.1 Sérgio Luiz Rocha Gomes Filho

6.2 Qualificação: Biólogo

6.3 CPF: XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: rochagomesfilho@gmail.com

6.1 Wessulla Suzana Bezerra Ribeiro

6.2 Qualificação: Educadora Física

6.3 CPF: XXX.XXX.XXX-XX

6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: wessullas@yahoo.com.br

6.1 Mariana Souza Arruda de Santana

6.2 Qualificação: Bióloga

6.3 CPF: XXX.XXX.XXX-XX

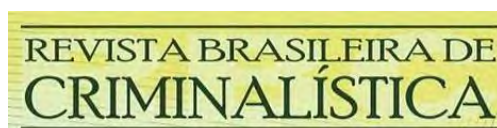
6.4 Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo, 1235 Cidade Universitária

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: (XX) XXXX-XXXX

6.7 Email: mariana.s.arruda@gmail.com

**ANEXO B - DNA FORENSE APLICADO NA IDENTIFICAÇÃO DE VÍTIMAS DE CRIMES EM
PERNAMBUCO, BRASIL**



Artigo publicado na Revista Brasileira de Criminalística.

Qualis: C (2014)

DNA forense aplicado na identificação de vítimas de crimes em
Pernambuco, BrasilM.H.F. Ekert ^{a,*}, N.C.L. Oliveira ^b, C.A. de Souza ^c, S.M. Santos ^c, D.B.G. Martins ^b,
J.L.L. Filho ^b^a Instituto de Criminalística, Perícia Oficial de Alagoas, Maceió (AL), Brasil^b Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Recife (PE), Brasil^c Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense, Recife (PE), Brasil*Endereço de e-mail para correspondência: marek.henryque@gmail.com, Tel.: +55-82-9-9804-3995.

Recebido em 21/01/2016; Revisado em 29/06/2016; Aceito em 02/07/2016

Resumo

Introdução: A identificação humana por DNA é atualmente considerada crucial para a resolução de situações envolvendo matéria penal, bem como aquelas relacionados à paternidade e continua revolucionando as áreas jurídicas e penais. As principais regiões polimórficas de DNA usados na rotina forense são os STRs (Short Tandem Repeats) presentes nos cromossomos autossômicos. **Objetivo:** Este estudo teve como objetivo identificar o perfil das vítimas afetadas por vários tipos de crimes ocorridos em Pernambuco. **Materiais e Métodos:** O Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF) proveu 125 casos de vários tipos de crimes ocorridos em Pernambuco entre 2012 e 2014. A verificação de identificação humana por amostras de músculo e osso foi realizada por amplificação de DNA e genotipagem pela alimentação do sistema Plex Fusion (24 loci STR) e ABI PRISM 3500 HID respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas pelos softwares: "familias" e "patcan". **Resultados:** O LPPGF recebeu dois tipos de amostras biológicas para os ensaios de identificação genética humana: tecido ósseo (52,8%) e o tecido muscular (47,2%). A alta prevalência de casos em aberto (47,2%) e homicídio (42,4%), tanto na área metropolitana, quanto no interior, alerta a necessidade de implementar programas sociais de prevenção e qualidade de vida, além da necessidade de mais celeridade nas investigações policiais. **Conclusões:** A abordagem genética para identificação humana, principalmente vítimas de crimes, é uma condição importantíssima para a resolução de qualquer tipo de processo criminal e reduzir ainda mais a agonia vivida por famílias que tiveram seus entes queridos desaparecidos.

Palavras-Chave: Identificação humana; DNA Forense; STRs; Homicídio.**Abstract**

Introduction: The human identification by DNA is currently considered crucial for the resolution of situations involving criminal matters as well as those related to paternity and continues revolutionizing the legal and criminal areas. The main polymorphic regions of DNA used in forensic routine are the STRs (short tandem repeats) present in autosomal chromosomes. **Objective:** This study aimed to identify a profile of victims affected by several kinds of crimes that occurred in Pernambuco. **Materials and Methods:** Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (LPPGF) provided 125 reports of several kinds of crimes that occurred in Pernambuco between 2012 and 2014. Verification of human identification by muscle and bone samples was performed by DNA amplification and genotyping by Power Plex Fusion System (24 loci STRs) and ABI PRISM 3500 HID respectively. Statistical analyzes were carried out by software: "familias" and "patcan". **Results:** LPPGF received two types of biological samples for human identification genetic test: bone tissue (52.8%) and muscle tissue (47.2%). the high prevalence of open cases (47.2%) and murder (42.4%), both metropolitan area, as up-state alerts the need to implement improvements social programs of prevention and quality and speed of police investigations. **Conclusions:** The genetic approach to human identification, mainly victims of crimes, is very important for resolving any kind of criminal case and further reduce the agony experienced by families who had their missing loved ones.

Keywords: Human Identification; Forensic DNA; STRs; Murder.

1. INTRODUÇÃO

A identificação humana é um processo de investigação forense necessário para caracterizar o início e o fim da personalidade civil [1]. O evento da morte de um indivíduo extingue o poder familiar, limites de casamento, contratos pessoais e usufruto e, sem confirmação não inicia o processo de sucessão [2]. Além disso, a identificação humana é uma questão jurídica de importância em casos criminais, exigindo a necessidade de investigação [3].

A busca de métodos confiáveis de identificação humana sempre foi uma grande necessidade social. Em diversas situações, tais como guerra, agitação sócio-política e de desastres de massa mostram a necessidade urgente de uma ação eficaz para identificar as vítimas, com o objetivo de suavizar de alguma forma a ansiedade social que sempre se instala [4].

A identificação humana por DNA é atualmente considerada crucial para a resolução de situações que envolvem matéria penal, bem como os relacionados com a paternidade e continua revolucionando as áreas legais e criminais [5]. Esta abordagem baseia-se principalmente nas diferenças entre indivíduos em regiões não codificantes do genoma. Estas diferenças são o princípio básico da metodologia utilizada em Genética Forense [6].

Em sequências de DNA repetitivas são encontradas repetições “in tandem” que podem determinar regiões hipervariáveis classificáveis por polimorfismos [7]. As principais regiões polimórficas do DNA utilizadas na rotina forense são os STRs (short tandem repeats) presentes nos cromossomos autossômicos. O tipo e quantidade mínima de marcadores são validados e sugeridos por renomadas instituições nacionais e internacionais [8,9]. Quanto maior o número de marcadores e mais estudadas as frequências alélicas desses marcadores na população local, maiores as chances de sucesso na identificação forense [10,11].

Devido à falta deste tipo de estudo na população do Nordeste do Brasil, o presente artigo objetivou caracterizar um perfil geral das vítimas acometidas por vários tipos de crimes que ocorreram em Pernambuco entre 2012 e 2014, abrangendo variáveis como sexo, amostra utilizada e localização geográfica da agressão, após sua identificação pelo DNA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Neste estudo, o Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense de Pernambuco (LPPGF-PE) proveu 125 relatórios policiais com laudos genéticos de vários tipos de crimes que ocorreram em Pernambuco entre 2012 e 2014.

2.2. Métodos

2.2.1 Extração e Quantificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras biológicas por dois métodos diferentes: por extração orgânica (utilizada em amostras questionadas) e usando kits de DNA IQTM System Promega® (utilizada em amostras de referência).

As amostras biológicas utilizadas foram de osso e músculo, visto que para estas o LPPGF possui validação metodológica. A escolha da primeira, última ou ambas, variou de acordo com o caso e a disponibilidade das mesmas. Estas amostras eram entregues ao LPPGF oriundas do IML.

A quantidade de DNA recuperado foi quantificada por PCR em Tempo Real, utilizando o reagente Quantifiler® Duo DNA Quantificação Kit (Life Technologies) juntamente com o sistema de PCR Tempo Real 7500 (Life Technologies).

2.2.2 Amplificação do DNA

As amostras de DNA extraídas foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando o sistema de análise de loci de STR PowerPlex Fusion System (Promega Corporation), com um total de 24 loci.

2.2.3 Genotipagem do DNA

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese capilar utilizando o equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer HID (Applied Biosystems), no qual 22 (loci) STR foram analisados (D3S1358, D1S1656, D2S441, D10S1248, D13S317, PENTA E, D16S539, D18S51, D2S1338, CSF1PO, PENTA D, TH01, vWA, D21S11, D7S820, D5S818, TPOX, D8S1179, D12S391, D19S433, FGA, D221045), além do gene da amelogenina e do fragmento do cromossomo Y, DYS391, para identificar o gênero sexual.

Todas as metodologias moleculares foram abordadas de acordo com as instruções dos respectivos fabricantes e, ainda, todos os procedimentos operacionais padrões foram validados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de polimorfismos de DNA nuclear de cromossomos autossômicos foi realizado a partir de amostras recolhidas, o que permitiu determinar a partir das amostras questionadas o perfil genético de cada vítima. O LPPGF recebeu dois tipos de amostras biológicas para a identificação humana: tecido ósseo (52,8%) e o tecido muscular (47,2%). Esses valores retratam a seguinte realidade: menos da metade das amostras biológicas recebidas pelo LPPGF estavam conservadas suficientemente para extração de DNA

através de tecido muscular, ao passo que todo o restante, não apresentava essas condições satisfatórias, sendo necessária uma extração mais demorada, através do tecido ósseo. Vale salientar que o LPPGF não obteve problemas no processamento das 125 amostras utilizadas neste estudo.

O fluxo de trabalho do LPPGF inclui a extração de DNA a partir destes dois tipos de amostras biológicas para as amostras questionadas e o esfregaço bucal para as amostras de referência. Tais amostras são encaminhadas ao LPPGF a depender do estado de conservação do cadáver. Todos os métodos moleculares abordados neste artigo foram validados.

Qualquer amostra biológica recolhida na cena do crime pode ser submetida a técnicas de identificação baseadas nas regiões polimórficas do DNA, processo seguro, com alto poder de discriminação e alta confiabilidade, sendo aceita como prova legal em processos judiciais [12]. Quando o corpo está em um estado de decomposição muito avançado, carbonizado ou esqueletizados ou em condições que impedem o uso de impressão digital ou odontologia legal, é necessário analisar o DNA [13].

O FBI (Federal Bureau of Investigation) adota e recomenda um conjunto padrão de loci que são seguidos pelos laboratórios de genética forense em vários países. Durante muitos anos o FBI preconizou que a análise genética de pelo menos 13 regiões autossômicas e uma sonda para o gene da amelogenina, usado para identificar o sexo, é suficiente para resolver os casos forenses [14]. Mas para garantir uma estatística robusta usamos em nosso estudo 24 marcadores STRs.

Como mostrado na Figura 1, a alta prevalência de casos em aberto (47,2%) alerta a necessidade de implementar melhorias na qualidade e velocidade das investigações policiais. Em outras palavras, as vítimas estão sendo identificadas geneticamente, mas o diagnóstico diferencial de ato criminoso e suas circunstâncias não. O Relatório da Comissão Internacional de Direitos Humanos observou que os casos abertos são absolutamente incompletos e omissos,

e ainda 71% não são encaminhados, levando a lugar nenhum [15].



Figura 1. Frequência dos crimes que acometeram as vítimas analisadas pelo LPPGF entre 2012 e 2014.

O crime que mais afeta o estado de Pernambuco é o assassinato (42,4%), tanto na área metropolitana, como no interior, seguido dos acidentes de tráfego (8,8%), e por fim suicídio e afogamento (ambos com 0,8%). Tais dados mostram a necessidade de implementar políticas públicas de combate à violência primária em todo o estado. A percentagem de 77% das vítimas serem do sexo masculino, atacados principalmente no interior de Pernambuco, ajudam a criação de estratégias para entender as razões e motivações para tal número (Tabela 1). O tráfico de drogas tem sido o principal fator responsável pelo aumento na criminalidade nos últimos anos, sendo o homicídio o crime de maior violência no contexto social [16]. Números da Secretaria de Defesa Social de Pernambuco mostram que no primeiro semestre de 2015, 45% dos homicídios no interior de Pernambuco tiveram ligação direta com o tráfico [17]. Apesar dos esforços da referida Secretaria, o mês de julho de 2015 não teve um bom resultado com o programa social chamado Pacto Pela Vida: depois de dois meses consecutivos de queda, o aumento chegou a 15,6% no número de homicídios [18].

Tabela 1. Parâmetros analisados pelo LPPGF de acordo com os crimes ocorridos em Pernambuco entre 2012-2014.

Parâmetro	Variável	Distribuição	
		n	%
Sexo	Masculino	97	77%
	Feminino	28	33%
Amostra	Osso	66	52,8%
	Músculo	59	47,2%
Área	Metropolitana	60	48%
	Interior	65	52%
Total		125	100%

4. CONCLUSÕES

A abordagem genética para identificação humana, principalmente vítimas de crimes, é uma condição importantíssima para a resolução de qualquer tipo de crime e reduzir ainda mais a agonia vivida por famílias que tiveram seus entes queridos desaparecidos. Ademais, esses resultados podem contribuir para a análise da epidemiologia dos casos de crime em uma escala maior, e ajudará melhor a compreender e gerir a base de dados de DNA local.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense de Pernambuco, que gentilmente permitiu o acesso aos relatórios policiais; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami e à Perícia Oficial de Alagoas, que ajudaram na confecção deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] T. Moreti. *Identificação humana: uma proposta metodológica para obtenção de DNA de ossos e implementação de banco de dados de frequências alélicas de STRs autossômicos na população de Santa Catarina*, 2009.
- [2] R.A. Scoralick, A.A. Barbieri, Z.M. Moraes, J. Francesquini, J. Daruge, S.C.M. Naressi. Human identification through dental radiographs study: case report. *Rev. Odontol. Unesp* **42(1)**, 67-71, 2013.
- [3] E.F.A. Silva, G.S. Jacques, G. Chemale, P.A. Francez. *Genética Forense*. Ed. Millenium, 2013.
- [4] T. Dhanardhono, N. Wulandari, S.K.L. Bhima, H.J. Ahmadb, P.T. Widodo. Dna profiling of disaster victim identification in trenggalek shipwreck case. *Forensic Sci. Int. Genet.* **4(1)**, e5-e6, 2013.
- [5] J.W. Schumm, C. Gutierrez-Mateo, E. Tan, R. Selden. A 27- locus STR assay to meet all United States and European law enforcement agency standards. *J. Foren. Sci.* **58(6)**, 1584-1592, 2013.
- [6] L. Roewer. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Invest. Gen.* **4**, 22, 2013.
- [7] H.B. Ferreira. *Organização gênica de procariotos. Biologia Molecular Básica*. Cap. 4. Porto Alegre: Mercado Aberto, 2004.
- [8] D.R. Hares. Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* **6**, e52-e54, 2012.
- [9] C.J. Gershaw, A.J. Schweighardt, L.C. Rourke, M.M. Wallace. Forensic utilization of familial searches in DNA databases. *Forensic Sci. Int. Genet.* **5(1)**, 16-20, 2011.
- [10] J.M. Butler. Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing. *J. Forensic Sci.* **51(2)**, 253-265, 2006.
- [11] J.A. Riancho, M.T. Zarrabeitia. PATCAN: a Windows-based software for paternity and sibling analyses. *Forensic Sci. Int.* **135**, 232-234, 2013.
- [12] K. Michelin, J.M. Freitas, G.L. Kortmann. *Locais de crime dos vestígios a dinâmica criminosa*. Campinas. Ed. Milenium, 2013.
- [13] D. Primorac, M.S. Schanfield. Application of forensic DNA testing in the legal system. *Croat. Med. J.* **41(1)**, 32-46, 2000.
- [14] J.M. Butler, C.R. Hill. Biology and genetics of new autosomal STR loci useful for forensic DNA analysis. *Forensic Sci. Rev.* **24(1)**, 15-26, 2012.
- [15] Bourrier A. *Relatório apela contra extermínio de criança*. Rio de Janeiro: Jornal do Brasil - 29/04/1992.
- [16] M.J.C.S Ferreira. *A relação mediata do tráfico de drogas com a prática do homicídio em Caruaru-PE*. Monografia de conclusão de curso, 2016.
- [17] G1. *Caruaru e região*. Retirado em 20.01.2016, de <http://g1.globo.com/pe/caruaruregiao/noticia/2015/10/mas-de-50-dos-assassinatos-em-caruaru-estao-ligadosoutros-crimes.html>.
- [18] W. Oliveira. *Violência volta a subir em Pernambuco*. Retirado em 08.10.2015, de <http://diariodepernambuco.com.br>.

ANEXO C – TRACE SAMPLES OF HUMAN BLOOD IN MOSQUITOES AS A FORENSIC INVESTIGATION TOOL.



Artigo publicado na revista “Genetics Molecular Research”.

Qualis (Ciências Biológicas I): B4 (2014)



Trace samples of human blood in mosquitoes as a forensic investigation tool

K.C.N. Rabêlo^{1,4}, C.M.R. Albuquerque², V.B. Tavares³, S.M. Santos⁴,
C.A. Souza⁴, T.C. Oliveira^{1,4}, N.C.L. Oliveira¹ and S. Crovella^{1,5}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami,
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Zoologia, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

³Laboratório de Endemias,
Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁴Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense,
Secretaria de Defesa Social de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁵Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco,
Recife, PE, Brasil

Corresponding author: K.C.N. Rabêlo
E-mail: kaynaracecilia@yahoo.com.br

Genet. Mol. Res. 14 (4): 14847-14856 (2015)

Received March 17, 2015

Accepted June 9, 2015

Published November 18, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.November.18.50>

ABSTRACT. Investigations of any type of crime invariably starts at the crime scene by collecting evidence. Thus, the purpose of this research was to collect and analyze an entomological trace from an environment that is similar to those of indoor crime scenes. Hematophagous mosquitoes were collected from two residential units; saliva of volunteers that were residents in the units was also collected for genetic analysis as reference samples. We examined the allele frequencies of 15 short tandem repeat loci (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, and FGA) and amelogenin. A total of 26 female hematophagous mosquitoes were identified as *Aedes aegypti*,

Aedes albopictus, and *Culex quinquefasciatus*; we were able to obtain 11 forensically valid genetic profiles, with a minimum of 0.028203 ng/ μ L of human DNA. Thus, the results of this study showed that it was possible to correlate human genetic information from mosquitoes with the volunteer reference samples, which validates the use of this information as forensic evidence. Furthermore, we observed mixed genetic profiles from one mosquito. Therefore, it is clearly important to collect these insects indoors where crimes were committed, because it may be possible to find intact genetic profiles of suspects in the blood found in the digestive tract of hematophagous mosquitoes for later comparison to identify an offender and/or exclude suspects.

Key words: Mosquitoes blood meal; Forensic DNA; Forensic entomology

INTRODUCTION

Molecular techniques that profile individuals from a small amount of DNA have facilitated the use of engorged female mosquitoes, which may be crucial for solving some types of crimes. Mosquitoes (Culicidae) are a widely distributed source of human genetic material that can easily be found at crime scenes (Spitarella, 2006). Genetic profiles obtained from human blood found in the digestive tracts of mosquitoes, for example, can assist in the investigation of crimes committed in a closed environment (such as a room or vehicle; Spitarella, 2006; Curic, 2014). Comparison of the samples to the suspect's with a DNA database of criminals may also indicate whether a crime is a repeated offense (Wallace et al., 2014).

Intrinsic features of the biology and behavior of mosquitoes are potential advantages to the use of these insects as forensic evidence. Different species are active at different times (morning, twilight, or night) as well as local feeding and resting (indoors, outdoors, and in forests) (Rozendaal, 1997; Mehlhorn, 2008; Takken and Verhulst, 2013). Additionally, their propensity of eating quickly and remaining at the site (Chadee and Beier, 1996, 1997; Edman et al., 1998; Forattini, 2002) allows us to determine DNA profiles from the blood ingested by female mosquitoes, which facilitates identification of people present at the scene or may indicate whether a victim was at the crime scene.

Furthermore, females only stop feeding when the digestive tract is filled with blood, even if they have to feed on more than one host (Canyon et al., 1998; Forattini, 2002). This characteristic is an additional advantage because it can result in more than one human DNA profile (Clayton et al., 1998; Gill et al., 1998; González-Andrade et al., 2006) by female mosquitoes that may have fed on the victim or criminal. Therefore, the links between the suspect, victim, crime, and/or crime scene can be achieved by analyzing mosquitoes (Curic et al., 2014). In this study, we compared the profile of human DNA saliva with blood from the digestive tract of mosquitoes found in the same environment. We also investigated whether multiple feedings of a single mosquito, volunteer sex, and mosquito species would affect the genetic profiles of analyzed blood.

MATERIAL AND METHODS

DNA samples obtained from hematophagous mosquitoes

Hematophagous females were collected from student housing in Recife (Pernambuco, Brazil) called residential units (RUs) "A" and "B." RU "A" is composed of the first floor of a building, and RU "B" is a one-story house. Both RUs have several rooms and this structure is analogous to common home. Mosquitoes were mainly collected from common areas such as the TV room, study room, bathrooms, and kitchens. The RUs were chosen because we considered them to be similar environments to those in which indoor crimes are committed, and volunteers/residents represented possible suspects.

All mosquitoes found in RUs "A" and "B" were manually captured and placed in plastic pots and then sacrificed with chloroform to aid identification with a stereoscopic microscope (Olympus) using the Consoli and Oliveira (1994) and Forattini (2002) taxonomic keys. After these procedures, the mosquitoes were crushed in filter paper and left to dry for future genetic analysis, which is the same methodology that was followed by Spitaleri et al. (2006).

Research on the biological reference samples was conducted only after authorization of the volunteers; the research was explained and the volunteer signed the informed consent form that gave permission to collect a buccal mucosa sample by wabbing the oral mucosa for further DNA examination (Sweet et al., 1997; Anzai-Kanto et al., 2005). Genetic analyses were performed at Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (Secretaria de Defesa Social de Pernambuco/Brasil).

Reference samples

Genetic analysis was performed by comparative study of the alleles found in the electropherograms of volunteer buccal mucosa samples and human DNA found in the blood from the digestive tract of the hematophagous mosquitoes.

Human DNA extraction

The DNA extraction samples were extracted using the DNA IQ™ System kit (Promega, Madison, WI, USA) as recommended by the manufacturer.

Genetic analysis

DNA quantification was performed after DNA extraction with a Quantifiler® Duo DNA Quantification kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the Real Time PCR ABI 7500 platform. Later, multiplex amplification was performed by PCR analysis using the AMPF/STR Identifiler Plus® PCR kit (Life Technologies; Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocols. Fifteen STR loci were analyzed (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, D5S818, and FGA) in addition to a gender identification marker, amelogenin. PCRs were run for 28 amplification cycles for a total of 2 h, 28 min, and 5 s. Blank controls were used to detect possible contamination.

The amplification products were subjected to capillary electrophoresis with the ABI

PRISM 3500HID automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were analyzed using the GeneMapper® ID-X Software. Non-nucleotide linkers, which are used in primer synthesis for the loci CSF1PO, D13S317, D16S539, D2S1338, and TPOX, allows for simultaneous amplification and efficient separation of the 15 STR loci and amelogenin during automated DNA fragment analysis in accordance with the manufacturer's protocols (Grossman et al., 1994; Baron et al., 1996; Butler, 2005).

The entire protocol followed in this study is the same used by Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense (Secretaria de Defesa Social de Pernambuco/Brasil) in the genetic routine analysis is related to traces of research reports of crime scenes.

Ethics approval

This study was approved by the Ethics Committee of Universidade Federal de Pernambuco (Recife/Brazil) under protocol No. 462/11.

Statistical analyses

The likelihood ratio between the questioned sample and the reference was calculated using the PATCAN v.1.2 software (Riancho and Zarrabeitia, 2003) using Bayesian analysis to test the hypothesis that blood found in an entomological trace belonged to a reference sample.

The likelihood ratio (LR) and posterior probability are measures of reliability; consequently, trace criminal evidence can be correlated with references, and the probability can be calculated that a genetic profile would be found in other individual in the population.

RESULTS AND DISCUSSION

In the present study, a total of 18 biological samples were collected from the oral mucosa of volunteers/residents from RU "A" (32.5°C, 66% relative humidity) and nine samples were collected from the oral mucosa of volunteers/residents from RU "B" (34°C, 56% relative humidity) for a total of 27 samples references. Twenty-six total female hematophagous mosquitoes (Diptera, Culicidae) were captured; 15 were from RU "A" and 11 were from RU "B." Identification revealed that we collected 13 *Aedes aegypti* individuals, 12 *Culex quinquefasciatus* individuals, and one *Aedes albopictus* individual; the mosquitoes collected from each RU included: seven *Ae. aegypti* individuals, seven *Culex quinquefasciatus* individuals, and one *Ae. albopictus* individual were collected from UR "A", and six *Ae. aegypti* individuals and five *Cx. quinquefasciatus* individuals were collected from UR "B". Although it is possible that the DNA will degrade, the consumption of blood by mosquitoes and use of PCR and STR techniques facilitated amplification, enabling interpretation and subsequent validation and confirming the previous results of Alaeddini et al. (2010).

Of the 26 hematophagous mosquitoes, there were 11 samples (Table 1) that would be considered viable trace samples, with amplification of the DNA visualized by the peaks in the electropherograms for profiles of 16 loci (Figure 1). Culicidae mosquitoes, including *Ae. aegypti*, *Cx. quinquefasciatus*, and/or *Ae. albopictus*, were used to obtain viable profiles that could be used as a form of evidence for police investigation and judicial proceedings. Even with potentially degraded DNA, it was possible to obtain a number of suitable profiles with electropherogram analysis.

Table 1. Human DNA amplified from blood in the digestive tract of hematophagous mosquitoes.

Sample of human DNA amplified	Sex based on human DNA profile	Human DNA quantity (ng/ μ L)	Prior probability (%)	Likelihood ratio (LR)	Posterior probability (%)
Mosquito 1	Man	0.041996	50	3.67×10^{22}	99.9999999999999999999999
Mosquito 2	Man	0.028203	50	1.34×10^{21}	99.9999999999999999999999
Mosquito 3	Mixture of two women**	0.058803	50	***	***
Mosquito 4*	Woman*	0.043155	50	1.73×10^{25}	99.9999999999999999999999
Mosquito 5	Woman	0.109843	50	2.73×10^{19}	99.9999999999999999999999
Mosquito 6	Woman	0.080513	50	8.43×10^{18}	99.9999999999999999999999
Mosquito 7	Man	0.042154	50	5.84×10^{26}	99.9999999999999999999999
Mosquito 8*	Woman*	0.304895	50	1.73×10^{25}	99.9999999999999999999999
Mosquito 9*	Man*	0.329996	50	1.76×10^{20}	99.9999999999999999999999
Mosquito 10*	Man*	0.133783	50	1.76×10^{20}	99.9999999999999999999999
Mosquito 11	Man	0.138298	50	4.92×10^{19}	99.9999999999999999999999

Bayesian analysis was used for comparisons. *Distinct mosquitoes fed on the same individual; therefore, LR and posterior probability values are equal in the following analyzed mosquitoes: 4 and 8; 9 and 10. **A single mosquito fed on two female individuals. ***No comparative statistical analysis because of a lack of reference biological material.

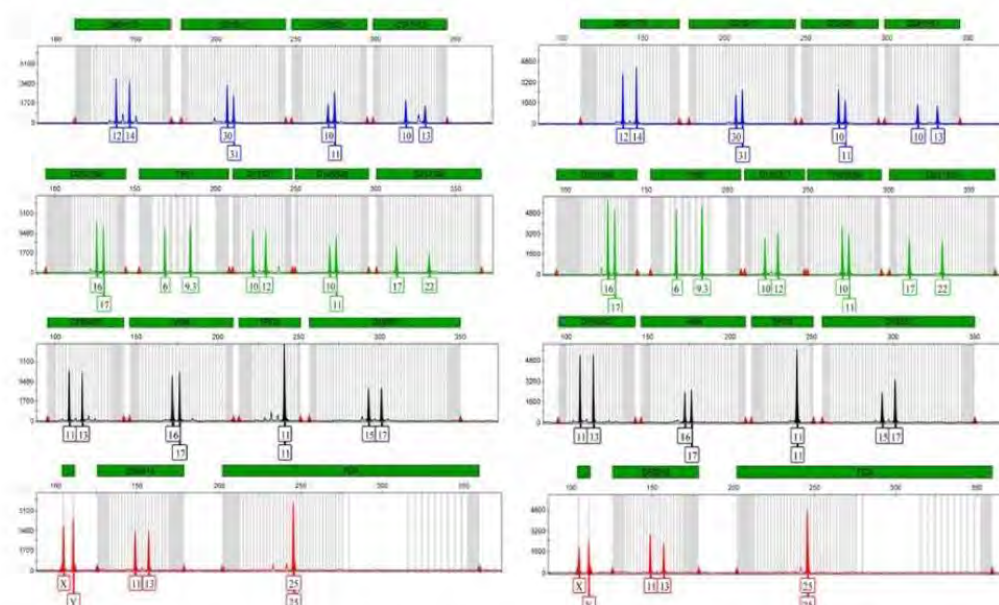


Figure 1. DNA profile of a man. Left, human blood extracted from *Culex quinquefasciatus* mosquito; right, reference sample from a volunteer's saliva. Fifteen STR loci and amelogenin were amplified.

Electropherograms for amelogenin revealed five male and five female genetic profiles. In our study, mosquitoes equally preferred biting males and females; this contradicts the reports of Brouwer (1960), Geier et al. (1996), and Brady (1997), who reported that *Anopheles stephensi*, *A. aegypti*, and *Anopheles gambiae* prefer males because of hormonal differences.

This study revealed that even a mixture of human DNA found in a single mosquito could be quantified. Therefore, when a crime occurs, a mosquito may bite the victim and suspect, because sometimes the victim is immobilized and thus would be easier to bite, and the human DNA profile could be accepted as expert proof.

Human DNA profiles from a single *Ae. aegypti* mosquito revealed a genetic profile mixture of two women (Figure 2). Additionally, individuals of two different mosquito species (*Cx. quinquefasciatus* and *Ae. aegypti*) had blood supplied from a single individual (Figure 3).

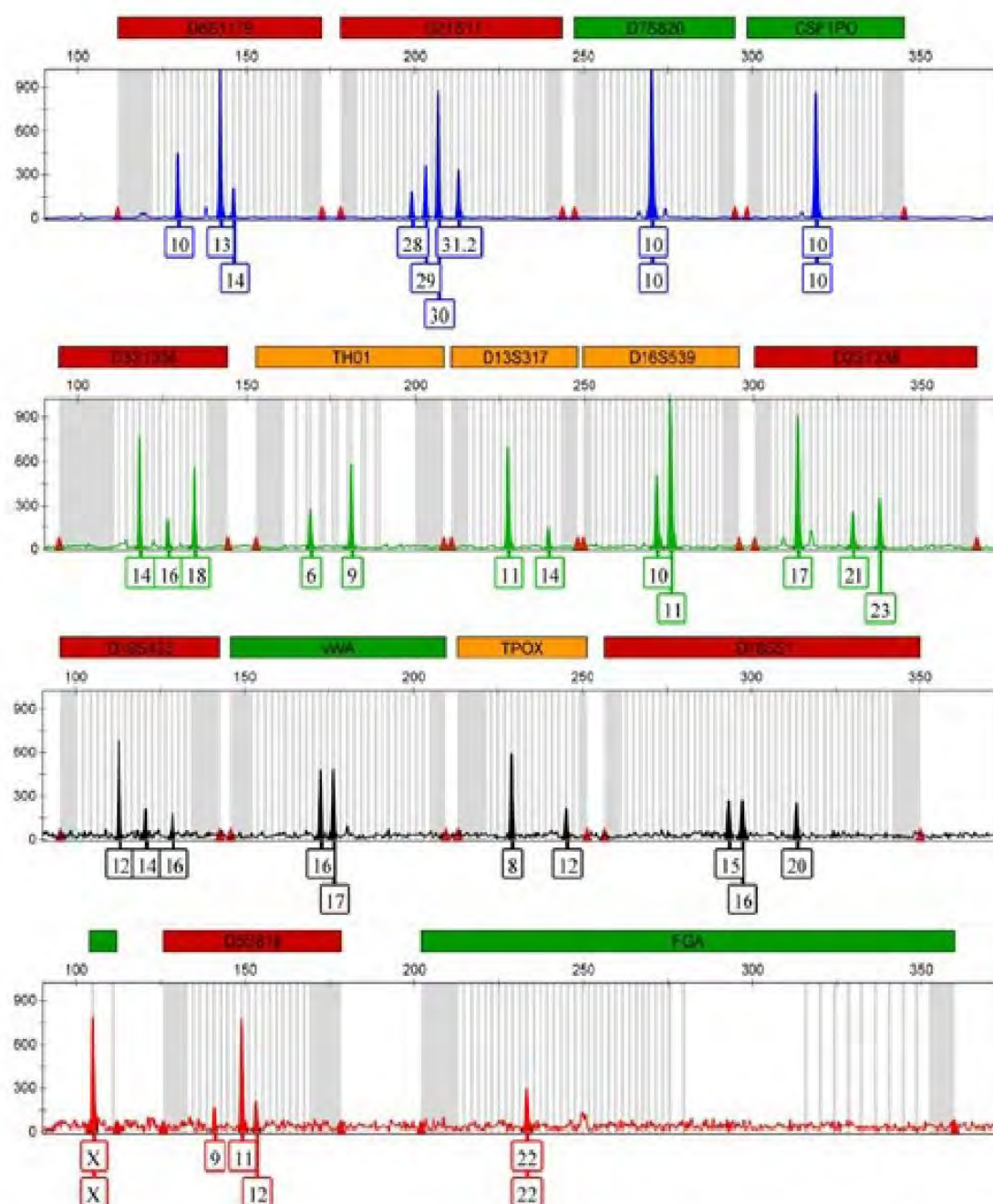


Figure 2. Mixed DNA profiles of two women prepared using human blood extracted from an *Aedes aegypti* mosquito. Fifteen STR loci and amelogenin were amplified.

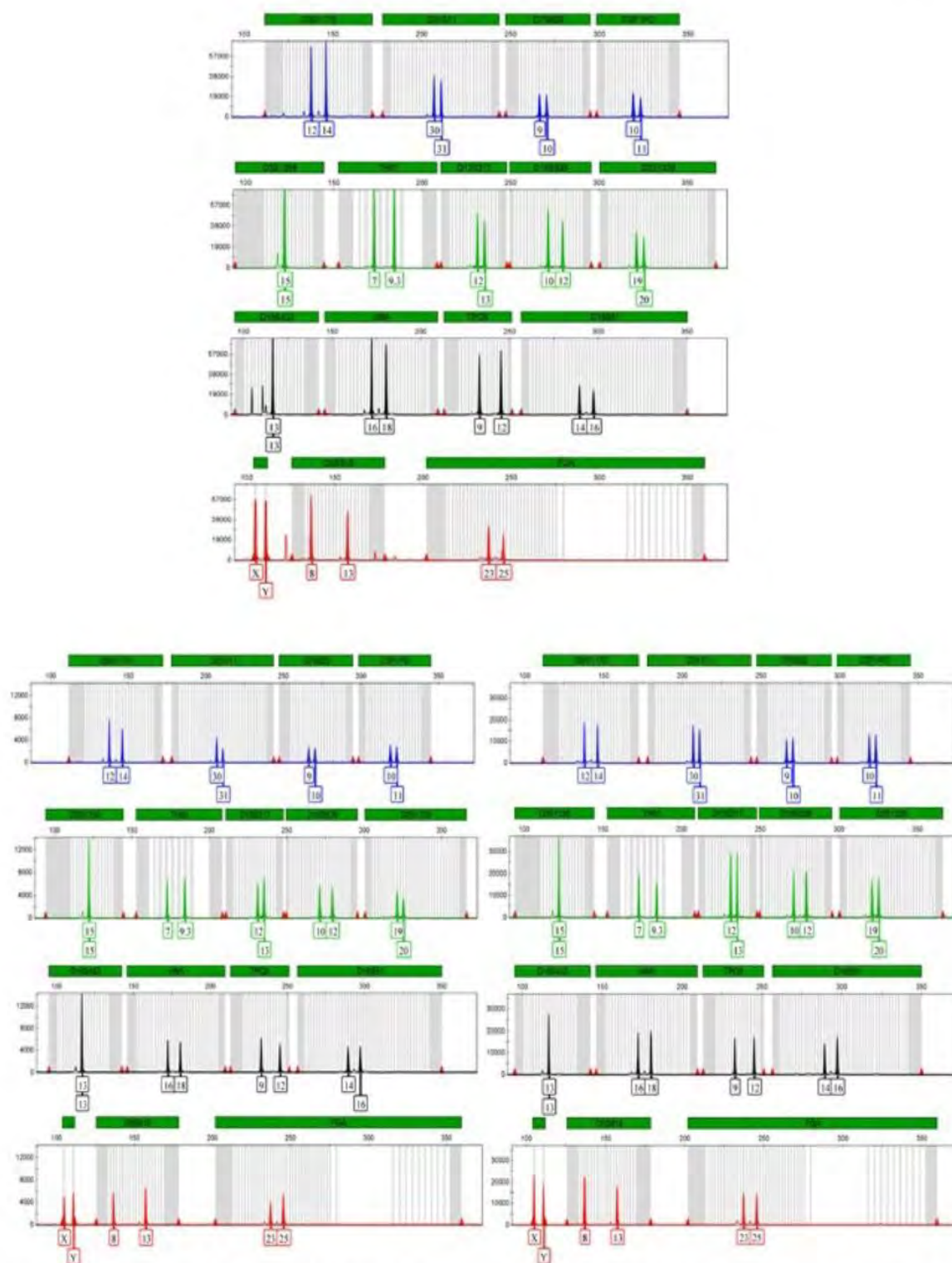


Figure 3. DNA profile of a man whose DNA was detected in blood from two mosquitoes (center, profile of the reference sample; left, profile of human blood extracted from a *Culex quinquefasciatus* mosquito; and right, profile of human blood extracted from an *Aedes aegypti* mosquito). Fifteen STR loci and amelogenin were amplified.

Using 15 STR loci in addition to amelogenin, it was possible to identify the DNA profile of two women in the blood of a female mosquito. The Federal Bureau of Investigation (FBI) recommends a minimum of 13 STR loci for forensic applications (Budowle et al., 1998; Butler, 2005). The authors Haned et al. (2015) reported success in separation and identification of DNA mixture profiles. This type of trace sample has an even greater potential contribution to forensic investigation, because a mosquito could feed on both the victim and offender and both DNA profiles can be analyzed.

DNA extracted from the blood of 11 mosquitoes (Table 1) was amplified and quantified, and the amount of human DNA varied between 0.028203 and 0.329996 ng/ μ L. Mosquitoes 4 and 8 fed on the same woman, and mosquitoes 9 and 10 fed on the same man; however, the quantity of DNA varied among all four mosquitoes (mosquito 4- 0.043155 ng/ μ L; mosquito 8- 0.304895 ng/ μ L; mosquito 9- 0.329996 ng/ μ L; and mosquito 10- 0.133783 ng/ μ L). Mosquito 3, which had a mixture of genetic profiles, had 0.058803 ng/ μ L human blood and fed on two separate women.

Curic et al. (2014) described the possibility to quantify human DNA in all mosquitoes analyzed, which is an important factor when analyzing mosquitoes as forensic evidence. Genetic analysis revealed that it is possible to identify individuals at a crime scene based on the amount of DNA that can be found in mosquitoes collected from a crime scene, which can help save time and resources.

The lowest value observed was the LR of mosquito 6 with 8.43×10^{18} ; this indicates that the likelihood of the genetic profiles of the reference sample obtained from volunteers and the trace sample of human blood found in the digestive tract of hematophagous mosquitoes at the scene of a crime is at least 8.43×10^{18} greater than the chance the DNA came from another person in the population. The posterior probability values were very close to 100% for all samples.

Genetic analysis and interpretation of this kind of criminal evidence is assisted by statistical analysis using the LR (Weir et al., 1997; Hu et al., 2003; González-Andrade et al., 2006; Primorac and Schanfield, 2014), which is the probability of association between possible trace samples (human blood found in the digestive tract of mosquitoes) and references samples. González-Andrade et al. (2006), who reviewed cases of sex offenders and the resulting mixture genetic profiles, the calculation result of LR was one million, whereas the analysis of human blood hematophagous mosquitoes found in the lowest rate was LR approximately eight quintillion on a population; discriminating enough the association between the possible trace and reference samples. Posterior probability, which indicates the percentage of the genetic profile that would be different in any other individual in the population, the values were all close to 100% likelihood of the possible trace and reference samples, taking into consideration the hypothesis of this paper it is a similar environment to the site of closed crime.

CONCLUSIONS

This research confirms that it is possible to analyze human blood found in hematophagous mosquitoes as biological trace evidence and use it as expert evidence. This study revealed that correlation between the reference samples and blood from mosquitoes, regardless of mosquito species analyzed and sex of the individual, can be easily and reliably compared to the obtained laboratory profiles. This facilitates the use mosquitoes as an additional trace for possible biological evidence in closed environments in which crimes were committed. The results of this study also indicate the possibility of identifying DNA profiles from different individuals in the blood mixture of a single female mosquito.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (Recife, PE, Brazil); Andreia da Silva and Vânia Tavares from Laboratório de Endemias/LACEN (Recife, PE, Brazil) for laboratory support; Natália Oliveira for technical support; the volunteers in this study; and members of Laboratório de Perícia e Pesquisa em Genética Forense/Secretaria de Defesa Social (Recife, PE, Brazil) for supporting the genetic analysis.

REFERENCES

- Alaeddini R, Walsh SJ and Abbas A (2010). Forensic implications of genetics analyses from degraded DNA - a review. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4: 148-157.
- Anzai-Kanto E, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, et al. (2005). DNA extraction from human saliva deposited on skin and its use in forensic identification procedures. *Braz. Oral Res.* 19: 216-222.
- Baron H, Fung S, Aydin A, Bahrig S, et al. (1996). Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Nat. Biotechnol.* 14: 1279-1282.
- Brady J (1997). The role of body odours in the relative attractiveness of different men to malarial vectors in Burkina Faso. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91: 121-122.
- Brouwer R (1960). Variations in human body odour as a cause of individual differences of attraction for malaria mosquitoes. *Trop. Geogr. Med.* 12: 182-196.
- Budowle B, Moretti TR, Niezgoda SJ and Brown BL (1998). CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: law enforcement tools. In: *Proceedings of the second European symposium on human identification*, Promega Corporation, Madison, 73-88.
- Butler JM (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier Academic Press, New York.
- Canyon DV, Hii JLK and Muller R (1998). Multiple host-feeding and biting persistence of *Aedes aegypti*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 92: 311-316.
- Chadee DD and Beier JC (1996). Natural variation in blood-feeding kinetics of four mosquito vectors. *J. Vector Ecol.* 21: 150-155.
- Chadee DD and Beier JC (1997). Factors influencing the duration of blood-feeding by laboratory-reared and wild *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Trinidad, West Indies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 91: 199-207.
- Clayton TM, Whitaker JP, Sparkes R and Gill P (1998). Analysis and interpretation of mix forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci. Int.* 91: 55-70.
- Consoli RAGB and de Oliveira RL (1994). *Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil*. Editora FioCruz, Rio de Janeiro.
- Curic G, Hercog R, Vrselja Z and Wagner J (2014). Identification of person and quantification of human DNA recovered from mosquitoes (Culicidae). *Forensic Sci. Int. Genet.* 8: 109-112.
- Edman JD, Scott TW, Costero A, Morrison AC, et al. (1998). *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) movement influenced by availability of oviposition sites. *J. Med. Entomol.* 35: 578-583.
- Forattini OP (2002). *Culicidologia médica*. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Geier M, Sass H and Boeckh J (1996). A search for components in human body odour that attract females of *Aedes aegypti* (Cardew G and Goode J, eds.). In: *Mosquito olfaction and olfactory-mediated mosquito-host interactions*, John Wiley & Sons, New York, 178-183.
- Gill P, Sparkes R and Buckleton J (1998). Interpretation of simple mixtures when artefacts such as a stutters are present with special reference to multiplex STRs used by the Forensic Science Service. *Forensic Sci. Int.* 95: 213-224.
- González-Andrade F, Bolea M, Martínez-Jarreta B and Sánchez D (2006). DNA mixtures in forensic casework resolved with autosomic STRs. *Int. Congr. Ser.* 1288: 580-582.
- Grossman PD, Bloch W, Brinson E, Chang CC, et al. (1994). High-density multiplex detection of nucleic acid sequences: oligonucleotide ligation assay and sequence coded separation. *Nucleic Acids Res.* 22: 4527-4534.

- Haned H, Benschop CCG, Gill PD and Sijen T (2015). Complex DNA mixture analysis in a forensic context: evaluating the probative value using a likelihood ratio model. *Forensic Sci. Int. Genet.* 16:17-25.
- Hu Yue-Qing, Fung WK and Lu J (2003). Interpreting DNA mixtures with the presences of relatives. *Int. J. Legal. Med.* 117: 39-45.
- Mehlhorn H (2008). Encyclopedia of parasitology. Springer, Heidelberg.
- Primorac D and Schanfield M (2014). Forensic DNA applications: An interdisciplinary perspective. CRC Press, New York.
- Riancho JA and Zarrabeitia MT (2003). PATCAN: a Windows-based software for paternity and sibling analyses. *Forensic Sci. Int.* 135: 232-234.
- Rozendaal JA (1997). Vector control: methods for use by individuals and communities. World Health Organization, England.
- Spitaleri S, Romano C, Di Luise E, Ginestra E, et al. (2006). Genotyping of human DNA recovered from mosquitoes found on a crime scene. *Int. Cong. Ser.* 1288: 574-576.
- Sweet D, Lorent M, Lorent JA, Valenzuela A, et al. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J. Forensic Sci.* 42: 320-322.
- Takken W and Verhulst NO (2013). Host preferences of blood-feeding mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 58: 433-453.
- Wallace HM, Jackson AR, Gruber J and Thibedeau AD (2014). Forensic DNA databases - ethical and legal standards: a global review. *Egypt J. Forensic Sci* 4: 57-63.
- Weir BS, Triggs CM, Starling L, Stowell L, et al. (1997). Interpreting DNA mixtures. *J. Forensic Sci.* 42: 213-222.

**ANEXO D - A SENSITIVE AND SELECTIVE LABEL-FREE ELECTROCHEMICAL
DNA BIOSENSOR FOR THE DETECTION OF SPECIFIC DENGUE VIRUS SEROTYPE 3
SEQUENCES**



Artigo publicado na revista *Sensors*.

Fator de impacto: 2,033 (2015)

Article

A Sensitive and Selective Label-Free Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Specific Dengue Virus Serotype 3 Sequences

Natália Oliveira ^{1,*}, Elaine Souza ², Danielly Ferreira ¹, Deborah Zanforlin ¹, Wessulla Bezerra ¹, Maria Amélia Borba ¹, Mariana Arruda ¹, Kennya Lopes ³, Gustavo Nascimento ¹, Danyelly Martins ^{1,4}, Marli Cordeiro ⁴ and José Lima-Filho ^{1,4}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50670-901 Recife, PE, Brazil; E-Mails: daniellylsantos@hotmail.com (D.F.); deborahzanforin@gmail.com (D.Z.); wessullas@yahoo.com.br (W.B.); mariameliaborba@gmail.com (M.A.B.); mariana.s.arruda@gmail.com (M.A.); galvesn23@gmail.com (G.N.); bruneska@prospecmol.org (D.M.); joseluiz60@mac.com (J.L.-F.)

² Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso, 57.309-005 Arapiraca, AL, Brazil; E-Mail: elainevms@yahoo.com.br

³ Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)—Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, 50.670-420 Recife, PE, Brazil; E-Mail: kennya.genne@bol.com.br

⁴ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, CEP: 50670-901 Recife, PE, Brazil; E-Mail: Marli@cpqam.fiocruz.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nataliacybelle.89@gmail.com
Tel: +55-81-2101-2508; Fax: +55-81-2126-8000.

Academic Editor: Stephen Holler

Received: 1 March 2015 / Accepted: 23 June 2015 / Published: 1 July 2015

Abstract: Dengue fever is the most prevalent vector-borne disease in the world, with nearly 100 million people infected every year. Early diagnosis and identification of the pathogen are crucial steps for the treatment and for prevention of the disease, mainly in areas where the co-circulation of different serotypes is common, increasing the outcome of dengue hemorrhagic fever (DHF) and dengue shock syndrome (DSS). Due to the lack of fast and inexpensive methods available for the identification of dengue serotypes, herein we report

the development of an electrochemical DNA biosensor for the detection of sequences of dengue virus serotype 3 (DENV-3). DENV-3 probe was designed using bioinformatics software and differential pulse voltammetry (DPV) was used for electrochemical analysis. The results showed that a 22-m sequence was the best DNA probe for the identification of DENV-3. The optimum concentration of the DNA probe immobilized onto the electrode surface is 500 nM and a low detection limit of the system (3.09 nM). Moreover, this system allows selective detection of DENV-3 sequences in buffer and human serum solutions. Therefore, the application of DNA biosensors for diagnostics at the molecular level may contribute to future advances in the implementation of specific, effective and rapid detection methods for the diagnosis dengue viruses.

Keywords: dengue fever; DNA biosensors; differential pulse voltammetry; electrochemical detection; guanine oxidation

1. Introduction

Dengue fever is the most prevalent vector-borne disease in the world. The World Health Organization (WHO) estimates that some 100 million people are infected every year; however, some studies have predicted that this number could be greatly underestimated, and is actually closer to 390 million [1–3]. The distribution of the disease is mainly in tropical and subtropical regions and recently, it has been increasingly seen in urban and semi-urban areas. All these factors have contributed to reveal dengue fever as a major international public health problem [1,2,4,5].

The infection is caused by a single stranded RNA-virus (DENV) of about 10.7 kb, which belongs to the *Flaviviridae* family, with approximately four antigenically distinct serotypes (DENV-1–DENV-4) [6,7]. The disease exhibits a wide range of symptoms, such as fever, headache and myalgia, which are the most common in classic dengue. Nevertheless, it can also show more severe manifestations, like in dengue hemorrhagic fever (DHF) or dengue shock syndrome (DSS), which present life-threatening symptoms, such as bleeding, thrombocytopenia and vascular leakage [8–10].

Early diagnosis and identification of the pathogen are necessary for the prevention and treatment of patients, as well as for the avoidance of new outbreaks and emergence of severe cases of dengue, since it is known that the co-circulation of different serotypes in an area increases the possibility of DHF and DSS outcomes [11,12].

Methods to confirm dengue virus infection may involve detection of the virion, viral RNA, antigens or antibodies [13]. Virus detection by cell culture, viral nucleic acid or antigen detection (nonstructural protein 1 or NS1 antigen) can be used to confirm dengue infection in the acute phase of the illness (0–7 days following the onset of the symptoms) [14,15]. In the later phase of the disease, serologic tests are more applied and preferred for diagnosis, as the sensitivity of virus isolation and antigen reactivity decreases [16]. Viral antigen (NS1) detection assays are rapid, reliable and easy to perform, however, they cannot allow to distinguish between different viral serotypes [17,18].

Viral isolation, although considered the gold standard diagnostic method, is time-consuming and highly complex compared with other direct virus detection techniques [1,19]. On the other hand, the

RT-PCR assay is widely used, it allows the detection of low copies of viral genes in less than 48 h [20]. However, both techniques are costly and labor-intensive, but they are more specific than serologic methods used for antibody detection and allow one to differentiate between the various dengue virus serotypes [21].

Application of DNA biosensors has emerged as an alternative method to the current molecular biology techniques [22,23]. These devices consist of a single-stranded DNA molecule (ssDNA) attached to a transducing surface that is able to detect a specific nucleic acid sequence, based on DNA hybridization events. Currently, there is a growing interest in developing label-free methods for DNA detection, considering their rapidness, easiness, low cost and minimal sample preparation requirements, compared to labeling methods, where the properties of the modified macromolecules often change, which may result in total loss of bioactivity or stability [24,25]. Label-free approaches rely on the direct detection of intrinsic electrochemical properties of DNA (e.g., oxidation of purine bases, particularly guanine) or on changes in some of the interfacial properties after hybridization. In addition, interference with the biological recognition between DNA molecules is minimized. Nevertheless, in labeling methods, these undesirable effects are more likely to occur due to steric hindrance and blocking of the binding sites [26–28].

Consequently, since biosensors allow to detect and identify DNA sequences in a fast and simple way, herein we report the first step to develop a cost-effective, sensitive and label-free electrochemical DNA biosensor for the detection of DENV-3 sequences in biological samples, as a part of an ongoing research previously published [29].

2. Experimental Section

2.1. Design of a Specific DENV-3 DNA Probe

The complete genomes of dengue virus serotype 3, corresponding to GenBank accession numbers AY099336, AY099337, AY099338S1, AY099338S2, AY099339S1, AY099339S2, AY099340S1, AY099340S2, AY09934S1, AY099342S1 were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. These sequences correspond to strains that were introduced in the American continent, and caused the disease outbreaks in 2002 [30,31]. CLC Main Workbench v.6.0 software was used to analyze common sequences among those dengue genomes, by using an alignment tool. Then, a specific DNA probe for DENV-3 was selected by comparison of the homologous sequences with other organisms, using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). DENV-3 complementary (target) and non-complementary sequences were also designed using the same method.

2.2. Reagents and Materials

All chemicals were of reagent grade quality and were used directly as received without further purification. Tris base was obtained from Promega (Fitchburg, WI, USA) and sodium acetate was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). DENV-3 probes were purchased as lyophilized powder from IDT Technologies (Coraville, IA, USA). The stock and diluted solutions (25 nM) were prepared in 0.5 M acetate buffer (pH 5.0) and kept frozen. Ultrapure RNase/DNase-free water was used in all buffer solutions. After bioinformatics analysis, the following DNA sequences were used in this study:

DENV-3 probe: 5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C-3'

DENV-3 target: 5'-GCT CTG TCT CAT GAT GAT GTT A-3'

Non-complementary sequence: 5'-TCT CTT GTT TAA GAC AAC AGA G-3'

Human serum used in this study was obtained from blood samples provided by the pathogenic virus collection of Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM). Serum solutions were prepared by centrifugation at 3500 rpm for 5 min at 20 °C (3500 rpm for 5 min), in which the obtained supernatant was collected from each sample, and stored at 23 °C until further used for experiments testing.

2.3. Apparatus

Experiments were carried out using a PGSTAT302 potentiostat (METROHM Autolab, Utrecht, The Netherlands) with the GPES 4.9.007 software as a graphic interface. The electrochemical device was composed by a two-electrode system: A pencil graphite electrode (PGE) as a working electrode and silver/chloride silver electrode as a reference electrode. Each measurement consisted of a cycle of activation/immobilization/hybridization/detection by using a fresh PGE surface. All the experiments were performed in triplicate, at room temperature (23 °C).

2.4. Procedure

2.4.1. Preparation of Electrodes and Pre-Treatment of PGE

PGEs were obtained from Mercur (Santa Cruz do Sul, Brazil), as a pencil graphite lead type 4 B. Briefly, PGEs were produced by cutting graphite lead in pieces of 3 cm and polishing them with an emery polishing disc (Dremel, Mount Prospect, IL, USA). The PGEs were then washed with ultrapure water to remove any contaminant present on the surface of the working electrode. The reference electrode was made by immersing a golden pin into an Ag/AgCl ink (Henkel Acheson, Hemel Hempstead, UK) and dried at 40 °C overnight. The polished surface of PGEs was pre-treated by applying a potential of +1.80 V for 5 min in 0.5 M acetate buffer solution (pH 5.0) [32–34].

2.4.2. DNA Probe Immobilization onto PGE Surface

Immobilization of DENV-3 probe onto the PGE surface was performed by immersing the activated PGE in acetate buffer solution, with different concentrations of DENV-3 probes (250–1000 nM), by applying a fixed potential of +0.5 V for 300 s onto the electrode surface.

2.4.3. DNA Hybridization with Complementary and Non-Complementary Sequences

The hybridization of the immobilized DNA probe on the electrode (PGE/DENV-3 probe) was performed by immersing the electrode in an Eppendorf tube containing 70 µL of DENV-3 target sequences diluted in acetate buffer. The hybridization reaction was then carried out in a thermomixer, stirring at 300 rpm, under a specific annealing temperature of 52 °C, for 10 min. This same procedure was adopted to evaluate the hybridization of the PGE/DENV-3 probe with non-complementary sequences, as well as buffer solutions containing a mix of both 75 nM of DENV-3 complementary and non-complementary sequences (mixed DNA solution).

2.4.4. Detection of Complementary and Non-Complementary Sequences in Human Serum

As a way to evaluate the efficiency of the system to detect DENV-3 sequences in biological samples on the electrode surface, the complementary and non-complementary DNA sequences were diluted in human serum (75 nM concentration) and the hybridization assay was conducted using the same conditions described previously. This procedure was also adopted for tests human serum solutions mixed with both target and non-complementary sequences.

2.5. Electrochemical Analysis

Differential pulse voltammetry (DPV) was used for electrochemical analysis in this study. Current peaks were recorded after applying a potential range of +0.5 up to +1.2 V at a scan rate of 0.05 V/s onto the electrode surface, which was immersed in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The raw data obtained with DPV technique was treated using the Savitzky and Golay filter (level 2) of the GPES software, followed by moving the average baseline correction using a peak width of 0.01 V [35].

2.6. Statistical Data Analysis

Experimental data were analyzed with Statistica 8.0 software (StatSoft, Tulsa, OK, USA) using parametric tests; Tukey's test was used to compare multi-independent group data, and a level of $p < 0.05$ was considered significant. The reproducibility of the system was expressed as the coefficient of variation inter-assay (CV), which was calculated over three independent assays on the probe-modified PGEs.

3. Results and Discussion

3.1. Bioinformatics Analysis of DENV-3 DNA Probes

The design of DNA probes is one of the crucial steps in the development of a biosensor, because it determines the specificity of the device [36]. For genosensors, this can be achieved using bioinformatics analysis based on whole genome sequencing, in a way to predict the most specific region that is able to produce a steady double-strand DNA with the pathogen [37,38]. In this work, DNA probes specific for DENV-3 were designed mainly by using CLC Main Workbench software, based on a sequence alignment tool to identify regions of similarity between the dengue strains. After that, DNA sequences from the strains that showed specificity only for DENV-3 were compared with other organism genomes using BLAST tool, in order to exclude any correlations. Finally, the Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calc) software (Northwestern University, IL, USA) was used to provide physical properties information of the selected DENV-3 sequences, in a way to establish the best match of DNA probe for biosensors. Figure 1 shows a flowchart containing the criteria of selection of DENV-3 probes used in this study.

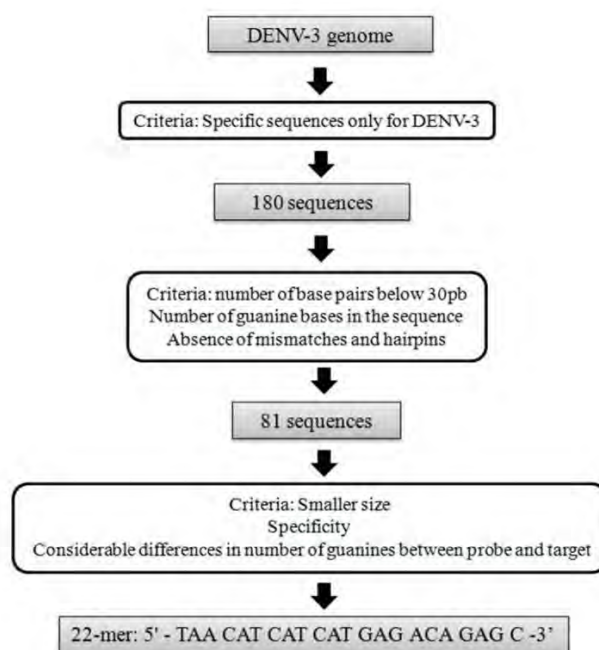


Figure 1. Flowchart of the selection criteria used to design the DENV-3 probe.

First, it was shown that 180 DNA sequences were specific only for dengue virus serotype 3. Among these, 81 were selected as DNA probes, based on the number of base pairs of the sequence, number of guanine bases and the absence of mismatches and hairpins. Finally, a 22-m oligonucleotide was selected to detect DENV-3, with the following sequence: 5'-TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C-3'. This sequence was selected due to its suitable features that are desirable for electrochemical biosensors, such as shorter base pair length, high specificity and a considerable difference in the number of guanine base between the probe and target sequences, which is important to discriminate between ssDNA and dsDNA onto the PGE surface [33,39,40].

In addition, this probe was targeted to detect sequences from the envelope (E) gene, which is responsible for binding and fusion to host cell membranes [4,41]. This particular gene was chosen because of it is highly conserved sequence, which suffers less mutation process rather than other parts of dengue genome. Viral gene regions that interact with specific host cells are evolutionarily constrained, mainly in viruses that infect multiple organisms, like dengue virus. This is important to be considered in the development of DNA biosensors to detect dengue virus, once that it determines the selectivity and specificity of the method, avoiding cross-reactivity with non-related organisms [42–44].

3.2. Effect of DENV-3 Probes Concentration on Immobilization on the PGE

The immobilization of a biological element on the electrode is the first step to be considered in the development of a biosensor [45]. Determination of the optimal probe concentration is crucial to ensure a high performance of DNA biosensors, and reduce any interference in the electrochemical response of the system [46,47]. Thus, the effect of DENV-3 probes concentration was also investigated in this study.

Figure 2 shows current peaks of different DENV-3 probe concentrations on the PGE surface. As the electrochemical analysis in this study relies on label-free oxidation of guanine bases, the acquisition of higher current signals for DNA probes is well-suited for this system [29,48–50]. The results show that the current gradually rises with the increase of the probe concentration from 250 nM up to 500 nM, reaching the highest electrochemical signal of 777 ± 8.6 nA at 500 nM. The result obtained at 500 nM was also statistically different from that obtained at 750 nM ($p = 0.000178$). However, the decrease in the current peaks at higher concentrations of DNA probes after 500 nM could be due to the steric hindrance between the nitrogenous bases and the transducer. This prevents the electrons produced by the oxidation process to access the electrode surface [51–55]. Therefore, a concentration of 500 nM was selected as the optimal probe concentration for DNA immobilization on the PGE.

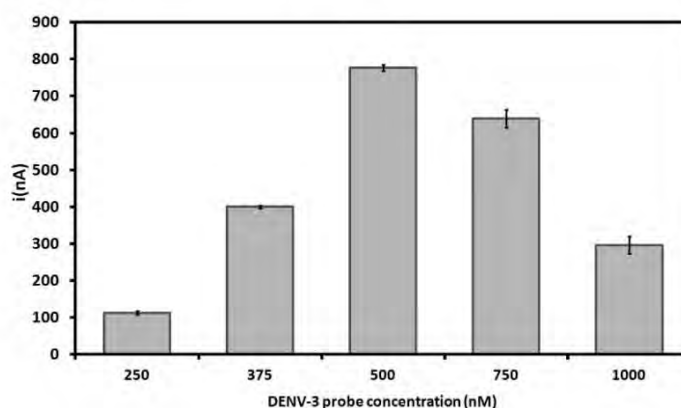


Figure 2. Electrochemical signals of different concentrations of DENV-3 probe onto pencil graphite electrodes (PGE). Differential pulse voltammetry (DPV) was used for electrochemical analysis based on guanine oxidation. Experimental conditions: Scanning potential range between +0.5 V and +1.2 V and scan rate of 0.05 V/s. The results represent the average of triplicates carried out at each DENV-3 probe concentration.

3.3. Electrochemical Analysis of Hybridization Assays

In this study, the biosensor performance was analyzed through the hybridization reaction between the DENV-3 probe and the complementary DENV-3 oligonucleotide. Hybridization was carried out with different amounts of the target sequence and this reaction was performed in an electrochemical cell containing 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0). The electrochemical signals based on guanine oxidation are displayed in Figure 3. The results showed that the current peaks increase with the increasing concentration of the target sequence (10 nM to 500 nM); the highest concentration exhibited the highest current peak of the system (135 ± 2.15 nA). However, at concentrations higher than 500 nM, there is a decrease in the electrochemical signal that could be due to electrostatic hindrance of DNA molecules on the PGE surface [39,53,56].

The linear regression of the current peaks obtained from different concentrations of DENV-3 target is shown in the inset of Figure 3. The calibration curve (described by the equation $y = 0.8962x + 24.979$) is linear between 10 nM and 100 nM, with a correlation coefficient of 0.9883 ($p < 0.00536$, $n = 5$). A detection limit of 3.09 nM could be estimated with the following equation: $3 s/m$, where s is the standard deviation of

most reproducible current peak result (corresponding to 75 nM concentration) and m is the slope of the linear regression [57]. The same experimental conditions were used to estimate the reproducibility of the method, which was 1.01%, indicating, thus, the significant reproducibility of the method.

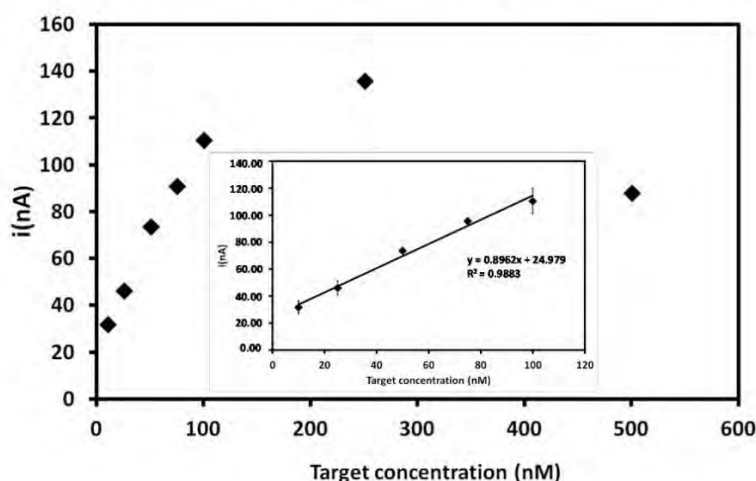


Figure 3. Current signals obtained for different DENV-3 target sequence concentrations after hybridization with probe-modified PGEs. Inset: Related calibration graph at a concentration range of 10–100 nM for the target sequence. Experimental conditions: Scanning potential range between +0.5 V and +1.2 V and scan rate of 0.05 V/s.

Figure 4 displays electrochemical signals of probe-modified PGE before and after hybridization with 250 nM of the target. A decrease of 83% in the current signal was observed after the reaction with the DENV-3 target; this is due to the fact that oxidizable regions of guanine bases in the ssDNA (777 nA) are bound through hydrogen bonds that held the double chain together, thus decreasing the electrochemical signal of the dsDNA (135 nA) on the electrode surface [24,58–60].

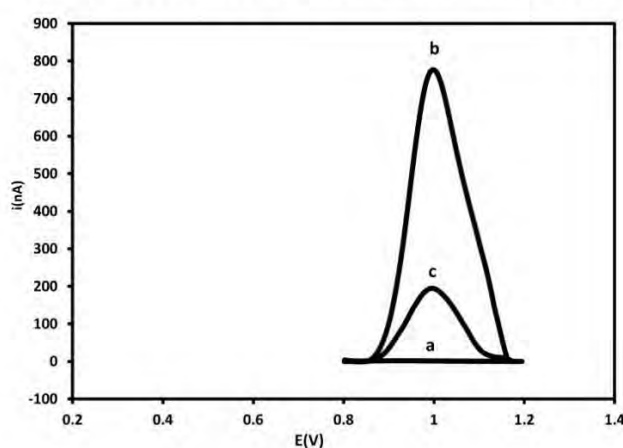


Figure 4. Differential pulse voltammograms corresponding to bare PGE (a), probe-modified PGE before (b) and after hybridization with 250 nM of target sequence (c) in 20mM Tris-HCl buffer solution (pH 7.0). Experimental conditions: Scanning potential range between +0.5 V and +1.2 V and scan rate of 0.05 V/s.

Furthermore, as is seen in Table 1, the present sensor has a lower detection limit (3.09 nM) compared to other electrochemical DNA biosensors.

Table 1. Comparison of the analytical performance of different electrochemical DNA biosensors.

Nucleic Acid Biosensor	Electrode	Electrochemical Method	Linear Range of Hybridization	Detection Limit	Reference
Single-walled carbon nanotubes-polymer modified graphite electrodes for DNA hybridization	PGE ^a	DPV ^d	50–200 µg/mL	5.14 µM	[61]
Hybridization biosensor for detection of hepatitis B virus	GCE ^b	DPV	0.36–1.32 µM	19.4 nM	[62]
Brilliant cresyl blue as electroactive indicator in electrochemical DNA oligonucleotide sensors	CPE ^c	DPV	10 nM–5 µM	9 nM	[63]
Label-free DNA detection based on zero current potentiometry	PGE	LSV ^e	10 nM–1 µM	6.9 nM	[64]
DNA biosensor detection of DENV-3 sequences onto PGE surfaces	PGE	DPV	10–100 nM	3.09 nM	This work

^a Pencil graphite electrode; ^b Glassy carbon electrode; ^c Carbon paste electrode; ^d Differential pulse voltammetry;

^e Linear sweep voltammetry.

3.4. Selectivity Study

In a way to evaluate the selectivity of the DENV-3 biosensor, hybridization tests were performed with a non-complementary sequence. DPV voltammograms for bare PGE, probe-modified PGE before and after hybridization with DENV-3 target and non-complementary sequence are displayed in Figure 5. It was verified that no electrochemical signal was recorded with bare PGE, which is in agreement with the absence of DNA on the electrode surface. Probe-modified PGE presented the highest current peak of the system, whereas the probe-modified PGE after hybridization with target sequence showed a decrease in the current signal, as discussed previously.

As shown in Figure 5, a significant difference in the voltammetric signal was observed after hybridization of DENV-3 probe with the non-complementary sequence (600 nA) when compared with the complementary DNA (135 nA); however, the signal was slightly lower compared to the probe-modified electrode (777 nA). This may be attributed to some unspecific hybridization of non-complementary sequences with the probe. Nevertheless, the target sequence is clearly able to form a steady dsDNA on the electrode surface. Moreover, a decrease in the current peak was also noticed when the probe-modified PGE was added to the mixed DNA solution (~230 nA) when compared with the probe-modified electrode. Therefore, these results can confirm the ability of the PGE-modified biosensor to detect selectively dengue virus serotype 3 [34,61,62].

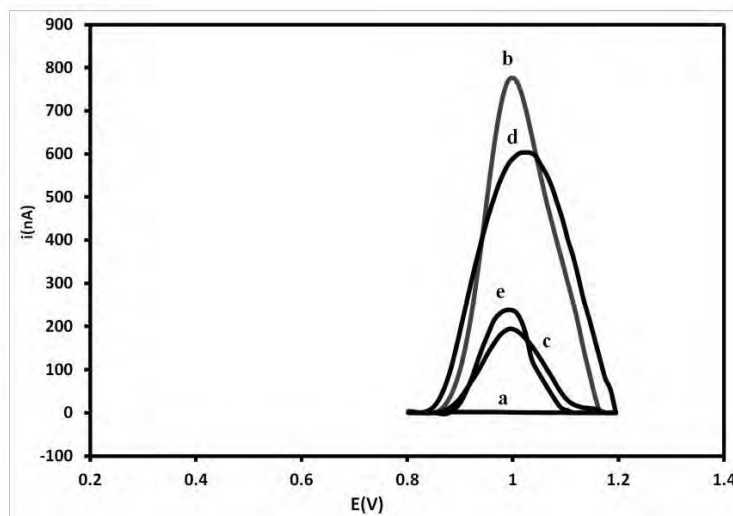


Figure 5. Differential pulse voltammograms for guanine oxidation of (a) bare PGE; (b) probe-modified PGE; (c) probe-modified PGE after hybridization with DENV-3 sequence; (d) non-complementary sequence and (e) a mixed solution of DENV-3 sequence and non-complementary sequence. Experimental conditions: Scanning potential range between +0.5 V and +1.2 V and scan rate of 0.05 V/s.

3.5. Electrochemical Measurement of Target Hybridization in Human Serum Solutions

In order to evaluate the efficiency of the probe surface for biosensing applications and in an attempt to test the performance if the biosensor for the detection DENV-3 in real samples, DPV was used to investigate DNA hybridization on PGE surface using human serum. This assay was tested with 75 nM of target sequence, non-complementary sequences and a solution mixed of both target and non-complementary sequences.

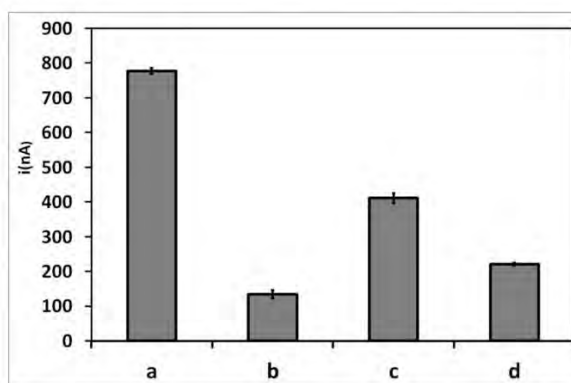


Figure 6. Current peaks related to guanine oxidation of the probe-modified-PGE after (a) and before hybridization with DENV-3 (b); in the presence of non-complementary sequences (c) and in a solution mixed with DENV-3 and non-complementary sequences (d), all diluted in human serum. Experimental conditions: Scanning potential range between +0.5 V and +1.2 V and scan rate of 0.05 V/s.

As shown in Figure 6, the biosensor displays the same electrochemical behavior observed previously in Tris-HCl buffer solutions. However, all the current signals of the probe-modified PGE after hybridization with the complementary, non-complementary sequences and mixed DNA solution diluted in human serum presented a slight decrease (134, 410.8 and 221 nA, respectively) when compared with those diluted in acetate buffer (135, 600 and 230 nA, respectively). This could be due to the hybridization kinetics and the efficiency of the PGE surface, which could be affected by non-specific adsorption of plasma proteins, and this may interfere with the detection of the electrochemical signal [63]. However, such interference with the detection of DNA molecules was observed previously with the optical DNA biosensor developed by Gong *et al.* [64,65]. Thus, these results confirm the high selectivity and sensitivity of the electrochemical DNA biosensor developed herein.

4. Conclusions

A sensitive DNA biosensor based on electrochemistry for the detection of dengue virus serotype 3 was proposed in the present study. A pencil graphite electrode, modified with a probe designed specifically for DENV-3, was able to identify selectively target sequences of the virus, with a low detection limit of 3.09 nM. Moreover, the probe-modified PGE allowed to detect specifically complementary sequences of the target DNA spiked with human serum.

The sensitivity of this assay can be further improved by testing other electrode materials, such as gold, platinum and grapheme electrodes. In addition, screen-printed electrodes could be also used for the implementation of a portable system. Therefore, the application of biosensors for the diagnosis of dengue virus at the molecular level may contribute to the future development and advancement of effective and rapid detection methods.

Acknowledgments

The authors would like to thank Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM) that kindly provided biological samples for this project. In addition, they would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) for providing financial support and Graziella El Khoury for reviewing of the manuscript for English language.

Author Contributions

N.O. designed and performed the majority of the experiments. D.Z. performed bioinformatics analysis. W.B. and M.B. prepared PGEs, buffer solutions and performed part of electrochemical experiments. M.T. and K.T. were responsible for selecting and supplying biological samples for the experiments. D.M. processed human serum samples. G.N. and D.F. were responsible for statistical data analysis. N.O., E.S., M.A. and J.L.-F. drafted and revised critically the manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. WHO. *Dengue—Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2009; p. 147.
2. Sariol, C.A.; White, L.J. Utility, limitations, and future of non-human primates for dengue research and vaccine development. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 452, doi:10.3389/fimmu.2014.00452.
3. Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; Drake, J.M.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G.; Sankoh, O.; Myers, M.F.; *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507.
4. Vasilakis, N.; Cardoso, J.; Hanley, K.A.; Holmes, E.C.; Weaver, S.C. Fever from the forest: Prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 532–541.
5. Chien, L.C.; Yu, H.L. Impact of meteorological factors on the spatiotemporal patterns of dengue fever incidence. *Environ. Int.* **2014**, *73*, 46–56.
6. Cedillo-Barrón, L.; García-Cordero, J.; Bustos-Arriaga, J.; León-Juárez, M.; Gutiérrez-Castañeda, B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect.* **2014**, *16*, 711–720.
7. Rovida, F.; Percivalle, E.; Campanini, G.; Piralla, A.; Novati, S.; Muscatello, A.; Baldanti, F. Viremic Dengue virus infections in travellers: Potential for local outbreak in Northern Italy Dengue-1 Dengue-4. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50*, 76–79.
8. Ashley, E.A. Trends in Anaesthesia and Critical Care Dengue fever. *Trends Anaesth. Crit. Care* **2011**, *1*, 39–41.
9. Qing, X.; Sun, N.; Yeh, J.; Yue, C.; Cai, J. Dengue fever and bone marrow myelofibrosis. *Exp. Mol. Pathol.* **2014**, *97*, 208–210.
10. Halstead, S.B. Dengue. *Lancet* **2007**, *370*, 1644–1652.
11. Arora, P.; Sindhu, A.; Dilbaghi, N.; Chaudhury, A. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *28*, 1–12.
12. Chakravarti, A.; Arora, R.; Luxemburger, C. Fifty years of dengue in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *106*, 273–282.
13. Verma, R.; Sahu, R.; Holla, V. Neurological manifestations of dengue infection: A review. *J. Neurol. Sci.* **2014**, *346*, 26–34.
14. Pechansky, F.; Duarte, P.D.C.A.V.; de Boni, R.; Leukefeld, C.G.; von Diemen, L.; Bumaguin, D.B.; Kreische, F.; Hilgert, J.B.; Bozzetti, M.C.; Fuchs, D.F.P. Predictors of positive Blood Alcohol Concentration (BAC) in a sample of Brazilian drivers. *Rev. Bras. Psiquiatr.* **2012**, *34*, 277–285.
15. Ferraz, F.O.; Bomfim, M.R.Q.; Totola, A.H.; Ávila, T.V.; Cisalpino, D.; Pessanha, J.E.M.; da Glória de Souza, D.; Teixeira Júnior, A.L.; Nogueira, M.L.; Bruna-Romero, O.; *et al.* Evaluation of laboratory tests for dengue diagnosis in clinical specimens from consecutive patients with suspected dengue in Belo Horizonte, Brazil. *J. Clin. Virol.* **2013**, *58*, 41–46.
16. Peeling, R.W.; Artsob, H.; Pelegrino, J.L.; Buchy, P.; Cardoso, M.J.; Devi, S.; Enria, D.A.; Farrar, J.; Gubler, D.J.; Guzman, M.G.; *et al.* Evaluation of diagnostic tests: Dengue. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, S30–S37.
17. Wattal, C.; Goel, N. Infectious Disease Emergencies in Returning Travelers—Special Reference to Malaria, Dengue Fever and Chikungunya. *Med. Clin. North Am.* **2012**, *96*, 1225–1255.

18. Korhonen, E.M.; Huhtamo, E.; Virtala, A.M.K.; Kantele, A.; Vapalahti, O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *J. Clin. Virol.* **2014**, *61*, 353–358.
19. Shenoy, B.; Menon, A.; Biradar, S. Science Direct Diagnostic utility of dengue NS1 antigen. *Pediatr. Infect. Dis.* **2014**, *6*, 110–113.
20. Hapugoda, M.D.; de Silva, N.R.; Khan, B.; Damsiri Dayanath, M.Y.; Gunesena, S.; Prithimala, L.D.; Abeyewickreme, W. A comparative retrospective study of RT-PCR-based liquid hybridization assay for early, definitive diagnosis of dengue. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *104*, 279–282.
21. Back, A.T.; Lundkvist, A. Dengue viruses—An overview. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2013**, *1*, 1–21.
22. Siddiquee, S.; Rovina, K.; Yusof, N.A.; Rodrigues, K.F. Nanoparticle-enhanced electrochemical biosensor with DNA immobilization and hybridization of *Trichoderma harzianum* gene. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2014**, *2*, 16–22.
23. Teles, F.S.R.R. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *687*, 28–42.
24. Lucarelli, F.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Marrazza, G.; Mascini, M. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *609*, 139–159.
25. Souada, M.; Piro, B.; Reisberg, S.; Anquetin, G.; Noël, V.; Pham, M.C. Label-free electrochemical detection of prostate-specific antigen based on nucleic acid aptamer. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *68C*, 49–54.
26. Tosar, J.P.; Keel, K.; Laíz, J. Two independent label-free detection methods in one electrochemical DNA sensor. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3036–3042.
27. Sadik, O.A.; Aluoch, A.O.; Zhou, A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 2749–2765.
28. Conde, J.; Edelman, E.R.; Artzi, N. Target-responsive DNA/RNA nanomaterials for microRNA sensing and inhibition: The jack-of-all-trades in cancer nanotheranostics? *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *81C*, 169–183.
29. Souza, E.; Nascimento, G.; Santana, N.; Ferreira, D.; Lima, M.; Natividade, E.; Martins, D.; Lima-Filho, J. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. *Sensors* **2011**, *11*, 5616–5629.
30. Lourenço-de-Oliveira, R.; Honório, N.A.; Castro, M.G.; Schatzmayr, H.G.; Miagostovich, M.P.; Alves, J.C.R.; Silva, W.C.; Leite, P.J.; Nogueira, R. Dengue Virus Type 3 Isolation from *Aedes aegypti* in the Municipality of Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 799–800.
31. Peyrefitte, C.N.; Couissinier-Paris, P.; Mercier-Perennec, V.; Bessaud, M.; Martial, J.; Kenane, N.; Durand, J.P.A.; Tolou, H.J. Genetic Characterization of Newly Reintroduced Dengue Virus Type 3 in Martinique (French West Indies). *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 5195–5198.
32. Ensafi, A.A.; Heydari-bafrooei, E.; Amini, M. DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 376–381.
33. Hejazi, M.S.; Alipour, E.; Pournaghi-Azar, M.H. Immobilization and voltammetric detection of human interleukine-2 gene on the pencil graphite electrode. *Talanta* **2007**, *71*, 1734–1740.

34. Pournaghi-Azar, M.H.; Alipour, E.; Zununi, S. Direct and rapid electrochemical biosensing of the human interleukin-2 DNA in unpurified polymerase chain reaction (PCR)-amplified real samples. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *24*, 524–530.
35. Özcan, A.; Yücel, S. A novel approach for the determination of paracetamol based on the reduction of *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine formed on the electrochemically treated pencil graphite electrode. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *685*, 9–14.
36. Ermini, M.L.; Scarano, S.; Bini, R.; Banchelli, M.; Berti, D.; Mascini, M.; Minunni, M. A rational approach in probe design for nucleic acid-based biosensing. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 4785–4790.
37. Huang, J.; Yang, X.; He, X.; Wang, K.; Liu, J.; Shi, H.; Wang, Q.; Guo, Q.; He, D. Design and bioanalytical applications of DNA hairpin-based fluorescent probes. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2014**, *53*, 11–20.
38. O'Brien, B.; Zeng, H.; Polyzos, A.A.; Lemke, K.H.; Weier, J.F.; Wang, M.; Zitzelsberger, H.F.; Weier, H.U.G. Bioinformatics tools allow targeted selection of chromosome enumeration probes and aneuploidy detection. *J. Histochem. Cytochem.* **2013**, *61*, 134–147.
39. Campos-Ferreira, D.S.; Souza, E.; Nascimento, G.; Zanforlin, D.; Arruda, M.; Beltrão, M.; Melo, A.; Bruneska, D.; Lima-Filho, J.L. Electrochemical DNA biosensor for the detection of human papillomavirus E6 gene inserted in recombinant plasmid. *Arab. J. Chem.* **2014**, doi:10.1016/j.arabjc.2014.05.023.
40. Corrigan, D.K.; Schulze, H.; McDermott, R.A.; Schmüser, I.; Henihan, G.; Henry, J.B.; Bachmann, T.T.; Mount, A.R. Improving electrochemical biosensor performance by understanding the influence of target DNA length on assay sensitivity. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, *732*, 25–29.
41. Soares, R.O.S.; Caliri, A. Stereochemical features of the envelope protein Domain III of dengue virus reveals putative antigenic site in the five-fold symmetry axis. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 221–230.
42. Weaver, S.C.; Brault, A.C.; Kang, W.; John, J. Genetic and Fitness Changes Accompanying Adaptation of an Arbovirus to Vertebrate and Invertebrate Cells Genetic and Fitness Changes Accompanying Adaptation of an Arbovirus to Vertebrate and Invertebrate Cells. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4316–4326.
43. Bennett, S.N.; Holmes, E.C.; Chirivella, M.; Rodriguez, D.M.; Beltran, M.; Vorndam, V.; Gubler, D.J.; McMillan, W.O. Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: Positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 885–893.
44. Weaver, S.C.; Vasilakis, N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 523–540.
45. Wang, Q.; Ding, Y.; Gao, F.; Jiang, S.; Zhang, B.; Ni, J.; Gao, F. A sensitive DNA biosensor based on a facile sulfamide coupling reaction for capture probe immobilization. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *788*, 158–164.
46. Zhang, L.; Wang, Y.; Chen, M.; Luo, Y.; Deng, K.; Chen, D.; Fu, W. A new system for the amplification of biological signals: RecA and complimentary single strand DNA probes on a leaky surface acoustic wave biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *60*, 259–264.

47. Mohamadi, M.; Mostafavi, A.; Torkzadeh-Mahani, M. Electrochemical determination of biophenol oleuropein using a simple label-free DNA biosensor. *Bioelectrochemistry* **2015**, *101C*, 52–57.
48. Erdem, A.; Muti, M.; Karadeniz, H.; Congur, G.; Canavar, E. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Electrochemical monitoring of indicator-free DNA hybridization by carbon nanotubes—Chitosan modified disposable graphite sensors. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *95*, 222–228.
49. Paleček, E.; Fojta, M.; Tomschik, M.; Wang, J. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. **1998**, *13*, 621–628.
50. Wang, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1887–92.
51. Campos-Ferreira, D.S.; Nascimento, G.A.; Souza, E.V.M.; Souto-maior, M.A.; Arruda, M.S.; Zanforlin, D.M.L.; Ekert, M.H.F.; Bruneska, D.; Lima-filho, J.L. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus 16 detection in real samples. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *804*, 258–263.
52. Gao, Z.; Yang, W.; Wang, J.; Yan, H.; Yao, Y.; Ma, J.; Wang, B.; Zhang, M.; Liu, L. Electrochemical synthesis of layer-by-layer reduced graphene oxide sheets/polyaniline nanofibers composite and its electrochemical performance. *Electrochim. Acta* **2013**, *91*, 185–194.
53. Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Palchetti, I.; Cesaretti, S.; Mascini, M. Coupling of an indicator-free electrochemical DNA biosensor with polymerase chain reaction for the detection of DNA sequences related to the apolipoprotein E. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *469*, 93–99.
54. Teles, F.R.R.; Fonseca, L.P. Trends in DNA biosensors. *Talanta*, **2008**, *77*, 606–623.
55. Tichoniuk, M.; Ligaj, M.; Filipiak, M. Application of DNA Hybridization Biosensor as a Screening Method for the Detection of Genetically Modified Food Components. *Sensors* **2008**, *8*, 2118–2135.
56. Liu, X.; Fan, Q.; Huang, W. DNA biosensors based on water-soluble conjugated polymers. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2154–2164.
57. Gumustas, M.; Ozkan, S.A. The Role of and the Place of Method Validation in Drug Analysis Using Electroanalytical Techniques. *Open Anal. Chem. J.* **2011**, *5*, 1–21.
58. Nascimento, G.A.; Souza, E.V.M.; Campos-ferreira, D.S.; Arruda, M.S.; Castelletti, C.H.M.; Wanderley, M.S.O.; Ekert, M.H.F.; Bruneska, D. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *38*, 61–66.
59. Aydoğdu, G.; Günendi, G.; Zeybek, D.K.; Zeybek, B.; Pekyardımcı, Ş. A novel electrochemical DNA biosensor based on poly-(5-amino-2-mercapto-1,3,4-thiadiazole) modified glassy carbon electrode for the determination of nitrofurantoin. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *197*, 211–219.
60. Wang, J.; Kawde, A. Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *431*, 219–224.
61. Sehatnia, B.; Golabi, F.; Sabzi, R.E.; Hejazi, M.S. Modeling of DNA Hybridization Detection Using Methylene Blue as an Electroactive Label. *J. Iran. Chem. Soc.* **2011**, *8*, 115–122.
62. Souza, E.; Nascimento, G.; Santana, N.; Campos-ferreira, D.; Bibiano, J.; Arruda, M.S. Electrochemical DNA Biosensor for Sequences Related to the Human Papillomavirus Type 16 using Methylene Blue. *Biosens. J.* **2014**, *3*, 3–7.

63. Ren, Y.; Deng, H.; Shen, W.; Gao, Z. A Highly Sensitive and Selective Electrochemical Biosensor for Direct Detection of MicroRNAs in Serum. *Anal. Chem.* **2013**, *9*, 4784–4789.
64. Auer, S.; Nirschl, M.; Schreiter, M.; Vikholm-Lundin, I. Detection of DNA hybridisation in a diluted serum matrix by surface plasmon resonance and film bulk acoustic resonators. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 1387–1396.
65. Gong, P.; Lee, C.; Gamble, L.J.; Castner, D.G.; Grainger, D.W.; Chem, L.J. A. Hybridization Behavior of Mixed DNA/Alkylthiol Monolayers on Gold: Characterization by Surface Plasmon Resonance and ³²P Radiometric Assay resonance intensity measurements reported in a related. **2006**, *78*, 3326–3334.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).