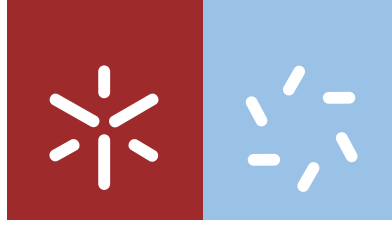


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Stephanie Lopes Morais

**Desenvolvimento de genossensores
eletroquímicos para a deteção de
microalgas *Alexandrium spp.***



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Stephanie Lopes Morais

**Desenvolvimento de genossensores
eletroquímicos para a deteção de
microalgas *Alexandrium spp.***

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Biofísica e Bionanossistemas

Trabalho efetuado sob a orientação da
Doutora Andreia Ferreira de Castro Gomes
e da
Doutora Maria de Fátima de Sá Barroso

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição: CC BY

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Agradecimentos

Antes de mais, queria agradecer ao Dr. João Miguel da Rocha e à Dr.^a Maria de Fátima Barroso pela a oportunidade de desenvolver este tema. Agradeço também à Dr.^a Andreia Gomes por ter aceite ser minha co-orientadora. À Dr.^a Fátima e à Dr.^a Andreia, agradeço profundamente ainda toda a orientação e o apoio incondicional que me forneceram ao longo deste projeto.

Gostaria de agradecer igualmente à equipa do Grupo de Reações e Análises Químicas | Rede de Química e Tecnologia (GRAQ | REQUIMTE) do Instituto Superior de Engenharia do Porto por me receberem de braços abertos e por todo o apoio e cumplicidade oferecida.

Um especial agradecimento à Dr.^a Piedade Barros e à Dr.^a Marlene Santos do Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) da Escola Superior de Saúde (ESS) do Politécnico do Porto pela ajuda na escolha, cultivo, extração e amplificação dos organismos em estudo.

E, sem deixar de ser, quero agradecer à minha família e amigos que, mesmo nos piores dias e entre as dúvidas e incertezas, ouviram-me e deram-me força para seguir em frente, especialmente a minha avó e a minha mãe a quem não me seria possível ter chegado a este momento, assim como, aos meus irmãos, Ricardo e Miguel que, da sua forma muito peculiar, me incentivam e inspiram a dar o melhor de mim mesma.

Muito obrigada!

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração. Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Desenvolvimento de genossensores eletroquímicos para a detecção de microalgas *Alexandrium spp.*

Resumo

A aquacultura é uma atividade agropecuária em crescimento, cuja finalidade é aumentar a quantidade de alimentos, de origem aquática, disponíveis no mercado. Porém, como outras práticas agrícolas, a aquacultura também está sujeita a ameaças externas. Uma das possíveis ameaças para estes sistemas são as contaminações pelas florações nocivas de algas (HAB) – evento resultante do aparecimento em grande escala de microalgas e/ou cianobactérias potencialmente tóxicas.

Em Portugal, os bivalves são dos organismos mais cultivados em aquacultura, pelo que apresentam um risco acrescido quando em contato com uma HAB, pois existem espécies, como a *Alexandrium minutum*, com a capacidade de produzir toxinas suficientes para representar uma ameaça para a saúde pública. Tendo em conta o aumento das HAB nas últimas décadas, surgiu a necessidade de desenvolver meios de detecção capazes de os antecipar, de maneira a prevenir ou, pelo menos, limitar a perda económica e biológica, incluindo a humana.

Nesta dissertação foi desenvolvido e otimizado um genossensor eletroquímico para a detecção da *A. minutum* – microalga produtora de toxinas prejudiciais para a aquacultura portuguesa. Este dispositivo baseia-se na detecção eletroquímica da reação de hibridação de duas cadeias de ADN complementares.

Analisando bases de dados públicas, selecionou-se e desenhou-se sequências de ADN específicas (70 pb) capazes de detetar inequivocamente o material genético proveniente da *A. minutum*.

A construção do genossensor foi efetuada em várias etapas (i) Fase sensorial: criação de uma monocamada auto-organizada (SAM) mista constituída pelo ADN tiolado e o mercapto-hexanol (MCH) na superfície do eléctrodo descartável de ouro (SPGE); (ii) Promoção da reação de hibridação do ADN em formato “sandwich” (para aumentar a seletividade) e; (iii) Detecção eletroquímica da reação de hibridação através da avaliação da reação de redução do substrato tetrametilbenzidina/peróxido (TMB/H₂O₂).

Após a otimização de todos os parâmetros analíticos, fizeram-se curvas de calibração. Obteve-se uma correlação linear entre a corrente eletroquímica e a concentração de ADN alvo no intervalo de 0,12 e 1 nM. Os genossensores desenvolvidos apresentaram uma repetibilidade e reprodutibilidade de 5,4 % e 4,1 % respetivamente, e ainda um limite de detecção (LD) e um limite de quantificação (LQ) de 0,03 e 0,08 nM, respetivamente.

ADN extraído e amplificado de amostras biológicas distintas (*A. minutum*, *Lingulodinium polyedrum* e células do epitélio oral) permitiram validar e confirmar a seletividade do genossensor. Este dispositivo também detetou o ADN complementar proveniente da *A. minutum* (a várias concentrações) e não registou nenhum sinal para as restantes amostras de ADN não complementares (*L. polyedrum* e as células do epitélio oral) às sondas de ADN usado na construção do sensor.

Confirma-se assim que os genossensores são uma ferramenta analítica promissora e de baixo custo para monitorizar a presença de *A. minutum* em culturas puras, no mar e em tanques de aquacultura.

Palavras chave: *Alexandrium minutum*; Cronoamperometria; Dinoflagelados; Hibridação em formato em sandwich; Genossensores eletroquímicos.

Development of electrochemical genosensors for the detection of microalgae *Alexandrium spp.*

Abstract

Aquaculture is a fast-growing activity of agricultural character; whose purpose is to increase the amount of aquatic food available on the market. Like other farming practices, aquaculture is also subject to external threats. One possible threat to these systems is the contamination by harmful algae blooms (HAB) – a large-scale event resulting from the appearance of potentially toxic microalgae and/or cyanobacteria.

In Portugal, shellfish are the most cultivated organisms in aquaculture, thus representing an increased risk when in contact with a HAB because there are species, like *Alexandrium minutum*, with the ability to produce enough toxins to pose a threat to public health. In view of the increase phenomena of HAB, the need to develop means of detection capable of anticipating these threats, in order to prevent economic and human loss, has emerged.

In this thesis, an electrochemical genosensor for the detection of *Alexandrium minutum* – a microalgae that produces harmful toxins for portuguese aquaculture – was developed and optimized. This device is based on the electrochemical detection of the hybridization reaction between two complementary DNA sequences.

Analyzing public databases, a specific DNA probe (70 bp) capable of unequivocally detecting the genomic material of *A. minutum* was selected and designed.

The construction of the genosensor was obtained in various steps (i) Sensorial phase: creation of the thiolated DNA and mercapto-hexanol mixed self-assembled monolayer (SAM) on the screen-printed gold electrode (SPGE) surface; (ii) Promotion of the DNA hybridization reaction in a sandwich format (to increase the selectivity) and; (iii) Electrochemical detection of the hybridization reaction by evaluating the reduction reaction of tetramethylbenzidine/peroxide (TMB/H₂O₂) substrate.

After the optimization of all the analytical parameters, the calibration curve was determined. A linear correlation between the analytical signal (electrochemical current) and the DNA target concentration was obtained in the 0,12 and 1 nM range. The developed genosensor presents a repeatability and reproducibility of 5,4 % and 4,1 % respectively and a detection and quantification limit of 0,03 and 0,08, respectively.

The extracted and amplified DNA from the different biological samples (*A. minutum*, *Lingulodinium polyedrum* and oral epithelium cells) validated and confirmed the selectivity of the genosensor. This device also detected the *A. minutum* complementary DNA (at various concentrations) and didn't record any signal for the other non-complementary DNA samples (*L. polyedrum* and the oral epithelium cells) to the artificial probes used during the genosensors design.

It is therefore confirmed that genosensors are a promising and low-cost analytical tool to monitor the presence of *A. minutum* in pure cultures, in the sea and in aquaculture tanks.

Keywords: *Alexandrium minutum*; Chronoamperometry; Dinoflagellate; Electrochemical genosensors; Sandwich format hybridization.

Índice

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros	ii
Agradecimentos	iii
Declaração de integridade	iv
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de abreviaturas	x
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xv
Capítulo 1 – Contextualização	1
1. Enquadramento	1
2. Motivação e objetivos	2
3. Organização da tese	3
Capítulo 2 – Estado de arte	5
1. Introdução	5
2. Aquacultura	8
2.1. Aquacultura em Portugal.....	11
3. Cianobactérias.....	17
4. Microalgas	18
4.1. Diatomáceas	19
4.2. Dinoflagelados	21
4.3. <i>Alexandrium spp.</i>	21
4.3.1. Taxonomia e filogenia de <i>Alexandrium</i>	22
4.4. <i>Alexandrium minutum</i>	24
4.5. <i>Alexandrium ostenfeldii</i>	25
4.6. Toxinas.....	26
4.6.1. Iminas cíclicas de ação rápida	28
4.6.1.1. Espirolidos	28
4.6.2. Saxitoxinas	29
4.6.2.1. Intoxicações parálitica causada por moluscos.....	30
5. Biossensores	32
5.1. Constituintes de um biossensor	32
5.2. História dos biossensores	33
5.3. Tipos de biossensores.....	33
5.4. Aplicações dos biossensores	34
6. Genossensores	35
7. Design do genossensor	36

7.1.	Seleção e desenho do elemento de bioreconhecimento	36
7.2.	Seleção do eletrodo	37
7.3.	Imobilização da cadeia simples de ADN captura	37
7.3.1.	Adsorção	37
7.3.1.1.	Monocamadas auto-organizadas	38
7.3.2.	Ligação por afinidade	39
7.3.3.	Ligação covalente	39
7.4.	Hibridização da cadeia complementar de ADN	39
7.4.1.	Estratégias de hibridização	40
7.4.1.1.	Hibridização em formato "sandwich"	40
7.5.	Deteção do sinal eletroquímico	41
7.5.1.	Voltametria	42
7.5.1.1.	Voltametria cíclica	43
7.5.1.2.	Cronoamperometria	44
Capítulo 3 – Materiais e métodos		46
1.	Materiais	46
1.1.	Design experimental	46
1.2.	Crescimento de células	47
1.3.	Extração do material genético	47
1.4.	Amplificação do ADN	48
2.	Reagentes	49
3.	Sondas de ADN	49
4.	Procedimento experimental	52
4.1.	Desenvolvimento do genossensor eletroquímico	52
4.1.1.	Pré-tratamento dos eletrodos	52
4.1.2.	Fase sensorial	52
4.1.3.	Hibridação em formato sandwich	52
4.1.4.	Deteção eletroquímica	53
4.2.	Amostras reais	54
4.2.1.	Alexandrium minitum	54
4.2.2.	Lingulodinium polyedrum	55
4.2.3.	Células animais do epitélio oral	55
4.3.	Extração de ADN genómico	55
4.3.1.	Quantificação do ADN extraído	56
4.4.	Amplificação do ADN	57
4.5.	Validação do genossensor eletroquímico	58
Capítulo 4 – Resultados e discussão		59

1.	Seleção do eletrodo descartável de ouro.....	59
2.	Procedimentos analíticos	62
2.1.	Otimização dos parâmetros analíticos associados à construção do genossensor	62
2.1.1.	Caracterização eletroquímica do genossensor desenvolvido	69
2.2.	Preparação das amostras reais	70
2.2.1.	Extração e quantificação do ADN extraído.....	70
2.2.2.	Amplificação da sequência do ADN de interesse específico	71
2.3.	Avaliação do genossensor eletroquímico na detecção de ADN de amostras reais	73
3.	Comparação com a literatura	75
	Capítulo 5 – Conclusões	76
1.	Conclusões	76
2.	Limitações	76
3.	Perspetivas futuras	77
	Bibliografia	78
	Anexos 1	89
	Anexo 2.....	90
	Anexo 3.....	91
	Anexo 4.....	92
	Anexo 5.....	93

Lista de abreviaturas

ΔG – Variação da energia livre de Gibbs	IPMA – Instituto português do mar e atmosfera
1' – Primeira placa apical	IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada
AD – Ácido domoico	LD – Limite de deteção
ADN – Ácido desoxirribonucleico	LQ – Limite de quantificação
Ag – Prata	LSUrADN – Gene da grande subunidade ribossomal
ANP – Ácido nucleico peptídico	MCH – 6-mercaptop-1-hexanol
APA – Associação Portuguesa de Aquicultores	MEV – Microscópio eletrónico de varrimento
ARN – Ácido ribonucleico	MPC – MPC protein precipitation reagent
ASP – Intoxicação amnésica causada por moluscos	Na⁺ – Cátion de sódio
AT – Alta temperatura	NP – Nanopartículas
Au – Ouro	NSP – Intoxicação neurotóxica causada por moluscos
BMAA – β -metilamina-L-alanina	pb – Pares de base
BSA – Albumina de soro bovino	PBS – Tampão fosfato-salino com caseína
BT – Baixa temperatura	PCR – Reação em cadeia da polimerase
Ca²⁺ – Cátion de cálcio	PSP - Intoxicação paralítica causada por moluscos
CFP – Intoxicação ciguatérica causada pelo consumo de peixes	Q – Carga
CV – Voltametria cíclica	SAM – Monocamadas auto-organizadas
DGRM – Direção-geral de recursos naturais, segurança e serviços marítimos	SHA - Sandwich hybridisation assay
dNTP – PCR Nucleotide Mix	SNMB - Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos e Bivalves
DPV – Voltametria de pulso diferencial	SPGE – Screen-printed gold electrodes
dsADN – ADN de cadeia dupla	ssADN – ADN de cadeia simples
DSP – Intoxicação diarreica causada por moluscos	SSPE – Sódio-fosfato de sódio-EDTA
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática	STX – Saxitoxinas
FAO – Food and Agriculture Organization	SWV – Voltametria de onda quadrada
FISH – Hibridação <i>in situ</i> fluorescente	tADN – ADN alvo
HAB – Harmful algal bloom	Taq – ADN polimerase
I – Corrente elétrica	TBE – TBE buffer
IC – Imina cíclicas	TCL – Tissue and Cell Lysis Solution
I_c – Intensidade de corrente	TMB – Tetrametilbenzidina
INE – Instituto Nacional de Estatística	UE – União Europeia
IOC-UNESCO – Intergovernmental Oceanographic Commission of United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization	UV – Ultravioleta
	WHOI - Woods Holes Oceanographic Institution

Lista de figuras

Figura 1 – Percentagem e origem dos produtos aquáticos colhidos pela pesca e aquacultura, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).	8
Figura 2 – Representação dos organismos mais cultivadas em 2016. Massa em mil toneladas de peso vivo (adaptado de Eurostat, 2018).	9
Figura 3 – Principais organismos cultivados na União Europeia, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).	9
Figura 4 – Representação do consumo per capita anual dos países europeus (adaptado de European Commission, 2018).	11
Figura 5 – Representação do consumo anual de pescado dos 10 países mais consumidores da europa, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).	11
Figura 6 – Volume total de organismos produzidos pela UE, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).	12
Figura 7 – Esquema simplificado dos tradicionais métodos de cultivo da aquacultura portuguesa.	13
Figura 8 – Distribuição regional dos produtos de aquacultura em Portugal, em 2012 (adaptado do DGRM, 2014).	16
Figura 9 – Comparação morfológica entre algumas espécies do género <i>Alexandrium</i> , incluindo as espécies <i>Alexandrium minutum</i> e <i>Alexandrium ostenfeldii</i> (extraído de Nézan et al., 2010).	22
Figura 10 – Árvore filogenética construída a partir das análises de proximidade do rAND da grande subunidade ribossomal (LSU) das espécies do género <i>Alexandrium</i> . Os estudos filogenéticos foram realizados por PhyML no programa Geneious 5.4.4 descrito em (Guindon & Gascuel, 2003). Os círculos verde, azul e laranja salientam os complexos <i>Alexandrium ostenfeldii</i> , <i>Alexandrium minutum</i> e <i>Alexandrium tamarense</i> , respetivamente (adaptado de Lilly et al., 2005; Anderson et al., 2012).	23
Figura 11 – Distribuição das microalgas <i>Alexandrium minutum</i> (extraído de Lewis et al., 2018)	24
Figura 12 – Imagens de <i>Alexandrium minutum</i> ao microscópio eletrónico de varrimento. Setas evidenciam (A) o núcleo elíptico e (D) o poro ventral na primeira placa apical (extraído de Hansen et al., 2003).	25
Figura 13 – Célula viva de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> obtida por microscopia ótica de contraste. Seta branca indica a mucilagem à volta da célula e a laranja evidencia um dos seus flagelos. Barra = 20 µm (extraído de Kremp et al., 2009).	26
Figura 14 – Células de <i>Alexandrium ostenfeldii</i> ao microscópio eletrónico de varrimento, em que se observa (A) a placa tecal ventral, (B) o Po, (C) a l', (D) as placas sulcais e (E) a placa tecal dorsal (extraído de Almandoz et al., 2014).	26
Figura 15 – Estrutura química da 13-desmetil C.	29
Figura 16 – Estrutura química da saxitoxina.	30
Figura 17 – Distribuição global dos casos relatados de intoxicações por saxitoxinas, especificamente as intoxicações paralíticas causadas por moluscos, em 2015. Os pontos vermelhos indicam as regiões onde ocorrem os surtos (extraído de Harmful Algae, 2017).	30
Figura 18 – Estrutura geral da PSP.	31
Figura 19 – Esquema de um biossensor (adaptado de Bhalla et al., 2016).	33
Figura 20 – Classificação do biossensor segundo os transdutores (adaptado de Malhotra et al., 2017).	34
Figura 21 – Esquema geral da montagem de um genossensor. (i) imobilização da sonda de ADN numa superfície metálica; (ii) hibridização da cadeia complementar de ADN; (iii) deteção do sinal (adaptado de Manzanares-Palenzuela et al., 2015).	36

Figura 22 – Esquema de SAM sob uma superfície de ouro (adaptado de Love et al., 2005).	38
Figura 23 – Exemplificação das estratégias sem marcador (à esquerda) e com marcador (à direita). As sequências a vermelho representam as sondas de captura e as sequências a verde o tADN complementar (adaptado de Tosar et al., 2010).	40
Figura 24 – Esquema genérico da reação de hibridização em formato sandwich.....	41
Figura 25 – Aplicação do potencial de voltametria cíclica de potencial de varrimento a) linear e b) em forma de escada.	43
Figura 26 – Voltograma de um sistema reversível, evidenciando as medições dos picos de corrente e os picos de potencial (adaptado de Pacheco et al., 2013; Harvey, 2017).	44
Figura 27 – Respostas cronoamperométricas da variação da concentração de um analito em função do tempo (extraído de Yu & Akolkar, 2017).	44
Figura 28 – Respostas cronoamperométricas (A) do potencial e (B) da corrente em função do tempo.	45
Figura 29 – Potenciostato/galvanostato utilizado para a aquisição dos registos voltamétricos.	46
Figura 30 – Eléttodos de ouro de alta (à esquerda) e baixa (à direita) temperatura.	47
Figura 31 – Imagem do NanoDrop (à esquerda) e do termociclador (à direita).	48
Figura 32 – Possíveis dobramentos da estrutura dos oligonucleotídeos. Temperatura = 25,0°C; [Na ⁺] = 0,298 M; [Mg ²⁺] = 0 M. (Fonte: unafold.rna.albany.edu)	51
Figura 33 – Procedimento geral para o desenvolvimento do genossensor eletroquímico.....	53
Figura 34 – Esquema geral da hibridação em formato sandwich. A sonda de captura está representada a azul claro, a sonda alvo a cinzento, a sonda sinalizadora a laranja, o MCH a preto e a fluoresceína a amarelo.	54
Figura 35 – Esquema geral da distribuição das células de <i>Alexandrium minutum</i>	55
Figura 36 – Legenda dos poços do primeiro ensaio de eletroforese. L = Ladder; Z8 _x = réplica x do meio Z8; RX _y = réplica y da cópia X do frasco 4 do meio f/2; B _x = réplica x do branco.	58
Figura 37 – Tina e fonte de eletroforese (A) e o transiluminador de fluorescência ultravioleta (B)	58
Figura 38 – Voltamograma cíclico do TMB/H ₂ O ₂ em eléttodos descartáveis de ouro (SPGE).	59
Figura 39 – Respostas cronoamperométricas obtidas no estudo da influência do tipo de eléttrodo (AT ou BT) à concentração de 1 nM de tADN, mas a distintas concentrações de ADN de captura. Eléttrodo (a) BT na ausência de tADN e (b) AT na ausência de tADN (ensaio em branco), (c) AT com 1 μM, (d) BT com 1 μM, (e) AT com 10 μM e (f) BT com 10 μM de ADN de captura. As respostas obtidas são o resultado da média de três ensaios.	60
Figura 40 – Influência do tipo de eléttrodo e da concentração de 1 nM e 10 μM de ADN de captura na intensidade de corrente (I _{n,c}). Valores de I _{n,c} dos ensaios em brancos, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.	61
Figura 41 – Imagens MEV da superfície dos eléttodos de ouro de alta e baixa temperatura (Fonte: ΩMetrohm).	62
Figura 42 – Efeito da concentração da sonda de ADN de captura na resposta cronoamperométrica. Valores de I _{n,c} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.	63
Figura 43 – Resposta cronoamperométrica obtida quando se estudou a influência da concentração e do tempo de incubação do MCH. Valores de I _{n,c} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.	64

Figura 44 – Respostas cronoamperométricas obtidas nos ensaios de otimização do tempo de reação da hibridação da solução homogénea. Valores de $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN de captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μ M. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 65

Figura 45 – Respostas cronoamperométricas obtidas na otimização da concentração da sonda de ADN sinalizadora. Valores de $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 65

Figura 46 – Resposta cronoamperométrica obtida na otimização da temperatura da reação da hibridação homogénea. Valores da $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μ M, durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 66

Figura 47 – Respostas cronoamperométricas obtidas na presença e ausência de BSA na reação da hibridação homogénea. Valores da $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, e dos ensaios com sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN de captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μ M, durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 67

Figura 48 – Respostas cronoamperométricas obtidas na otimização do tempo da reação da hibridação heterogénea. Valores da $I_{n,c}$ dos ensaios em brancos, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração e tempo de atuação do ADN sinalizador = 0,25 μ M, durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 67

Figura 49 – Respostas cronoamperométricas obtidas na otimização da **(A)** concentração do anticorpo anti-FITC-POD e **(B)** tempo de incubação do anti-FITC-POD. Valores de $I_{n,c}$ dos ensaios em brancos, B, a azul escuro, e dos ensaios com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μ M, durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 68

Figura 50 – Curvas cronoamperométricas obtidas nas condições experimentais ótimas na (a) ausência e à concentração de (b) 0,06; (c) 0,12; (d) 0,25; (e) 0,50; (f) 1,00; (g) 2,00; (h) 3,00 e (i) 6,25 nM de tADN; **B** Relação linear entre a concentração do ADN alvo e a I_c ; e **C** a curva de calibração correspondente ao intervalo de concentração de tADN 0,12 a 1,00 nM. As respostas obtidas são o resultado da média de três ensaios. 69

Figura 51 – Escala da marcação do ADN padrão **(A)** do padrão de 50 pb e **(B)** das bandas resultantes da eletroforese do ADN amplificado, a 0,08s de emissão. 72

Figura 52 – Detecção eletroquímica do ADN proveniente de amostras reais, Valores da $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, e dos ensaios da sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro, das amostras reais a laranja e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de incubação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração e tempo de atuação da

sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM , durante 30 min e concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-FITC-POD = 1,5 U/mL, a 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 74

Figura 53 – Influência da diluição do ADN amplificado das culturas *Alexandrium minutum* no sinal eletroquímico obtido. Valores da $I_{n,c}$ dos ensaios em brancos, B, a azul escuro, dos ensaios com o ADN amplificado a azul claro e da razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de incubação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM , durante 30 min e concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-FITC-POD = 1,5 U/mL, a 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 75

Figura 54 – Respostas cronoamperométricas obtidas na estuda da influência da da concentração do MCH a **(A)** 7,5 min, **(B)** 15 min, **(C)** 30 min e **(D)** 60 min de incubação. Valores de $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, da sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM, concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM . Barras representam o erro padrão derivado das réplicas. 91

Figura 55 – Amplificação da **figura 50 B e C**. 93

Lista de tabelas

Tabela 1 – Técnicas de diagnóstico molecular (Fonte: Biometrics, 2017).	7
Tabela 2 – Massa e valor dos organismos produzidos por aquacultura na EU-28, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).	10
Tabela 3 – Principais espécies produzidas na UE, 2013 (adaptado de European Commission, 2016).	10
Tabela 4 – Nome comum e científico das principais espécies cultivadas em aquacultura, por tipo de água e sistema, em Portugal.....	14
Tabela 5 – Produção derivada da aquacultura, em Portugal, entre 2000 e 2017. Valores expresso em toneladas. Informação obtida pela INE/DGRM, 2001 – 2018.	15
Tabela 6 – Número de empresas com práticas aquícolas nos diversos distritos e ilhas portuguesas.	16
Tabela 7 – Cianobactérias potencialmente tóxicas (adaptado de WHO, 1999; Marques, 2006).	18
Tabela 8 – Exemplo dos impactos de alguns géneros de diatomáceas. Os nomes a negrito representam os organismos de maior risco ambiental (adaptado de Procopiak, 2006).	20
Tabela 9 – Classificação das toxinas mais comuns (adaptado de WHO, 1999; Hallegraeff, 2003; Codd et al., 2005; Naves, 2008; Demirel & Sukatar, 2012; Vilariño et al., 2013; Zanchett & Oliveira-Filho, 2013).	27
Tabela 10 – Oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do genossensor eletroquímico.	50
Tabela 11 – Primers utilizados para a amplificação da sequência de ADN de interesse.	57
Tabela 12 – Condições ótimas obtidas para a amplificação no PCR.	57
Tabela 13 – Variáveis analíticas otimizadas na construção do genossensor eletroquímico.	62
Tabela 13 – Variáveis analíticas otimizadas na construção do genossensor eletroquímico. Continuação.	63
Tabela 14 – Valores selecionados para a construção do genossensor eletroquímico.	68
Tabela 15 – Caracterização dos parâmetros analíticos do genossensor desenvolvido.	70
Tabela 16 – Resultados obtidos da quantificação do ADN extraído pelo kit comercial MasterPure™. A5 = réplica 5 das células cultivadas em meio Z8; A7 = réplica 7 das células cultivadas em meio Z8; Alg7 = amostra 7 do dinoflagelado da costa algarvia; H = amostra 1 das células do epitélio oral. Os valores apresentados resultam da média de 4 leituras no Nanodrop para a quantificação do ADN extraído.	71
Tabela 17 – Parâmetros analíticos testados e otimizados durante a etapa de amplificação da sequência de ADN por PCR.	72
Tabela 18 – Receita do meio de cultura f/2 (adaptado de Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975).	89
Tabela 19 – Receita do meio de cultura Z8.	90
Tabela 20 – Tabela completa da quantificação das amostras extraídas. Valores representam média obtida após 4 leituras. Valores a negrito indicam quais as amostras escolhidas para validar o genossensor desenvolvido. ...	92

Capítulo 1 – Contextualização

Os resultados experimentais desta dissertação foram obtidos no laboratório de eletroquímica do Grupo de Reações e Análises Químicas | Rede de Química e Tecnologia (GRAQ | REQUIMTE), do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA), da Escola Superior de Saúde (ESS) do Politécnico do Porto.

A dissertação está dividida em 5 capítulos, designados de 1) Contextualização, 2) Estado de arte, 3) Materiais e métodos, 4) Resultados e discussão e 5) Conclusões.

1. Enquadramento

A súbita expansão demográfica no fim do século XIX levou a um aumento na procura de materiais e produtos (metalúrgicos, têxteis, alimentares, ...). Dessa procura surgiram novas estratégias e tecnologias de maneira a satisfazer as necessidades populacionais (Santos, 2015). Uma das estratégias adotadas no campo da alimentação foi o desenvolvimento da aquacultura, também designada de agricultura aquática (Naylor et al., 2001).

De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO) das Nações Unidas, a aquacultura é a área do setor alimentar dedicada à criação e cultivo controlado de organismos aquáticos, em zonas costeiras ou continentais. Apesar dos registos históricos, que nos remete para o antigo Egito, esta atividade só se expandiu realmente nos últimos 30 anos, contribuindo atualmente por 50% do peixe disponível no mercado (Stanford University, 2009; FAO, 2018).

Com uma biodiversidade atual de aproximadamente 585 espécies, a aquacultura surge então como uma das novas práticas de aumento da produção de vários organismos – peixes, crustáceos, moluscos, répteis (e.g. tartarugas e jacarés), anfíbios e até algumas plantas aquáticas, nomeadamente algas – com fins alimentares e de elevado rendimento económico (FAO, 2018).

Em 2015, foram produzidas mundialmente mais de 76,6 toneladas de organismos – maioritariamente peixes – num valor aproximado de 137 mil milhões de euros (157 mil milhões de dólares), pelo que a aquacultura é considerada o setor alimentar com a maior taxa de crescimento mundial. A atração desta prática resume-se à sua acessibilidade, sendo explorada tanto por agricultores com poucos rendimentos como por empresas multinacionais – uma das razões pela qual mais de 88% da produção global deriva do Pacífico asiático (FAO, 2018).

Com uma receita anual de aproximadamente 50 milhões de euros (e em crescimento) e uma produção de 10 a 11 toneladas de organismos, a aposta na aquacultura, em Portugal, é residual e relativamente recente, apesar do elevado potencial geográfico do país para a expansão desta prática. Segundo a empresa Terras D'Ouro, Portugal é o terceiro país com o maior consumo de pescado *per capita* a nível mundial e o primeiro a nível europeu. Este valor deve-se, sobretudo, ao consumo de bacalhau, ainda que, 70% da produção nos sistemas de aquacultura portugueses sejam de bivalves, isto é, de moluscos (Instituto Nacional de Estatística, 2014).

Todavia, como qualquer outra atividade agrícola, os organismos cultivados em aquacultura também estão sujeitos a ameaças externas, tanto abióticas (tempestades marinhas, variações de temperatura, pH e salinidade das águas, entre outros) como bióticas, nomeadamente as microalgas e

cianobactérias responsáveis pelas florações nocivas de algas (HAB, do inglês, harmful algal bloom). Estes fatores tornam a monitorização e controlo destes sistemas imprescindíveis para uma produção mais rentável, de melhor qualidade e segura para o consumo humano, visto que a maior dificuldade na prevenção das proliferações de HAB é não saber onde, quando e a que escala ocorrerá o fenómeno nocivo.

Nos últimos anos, com o aumento destes eventos nefastos e das alergias alimentares, geraram-se preocupações quanto à segurança alimentar que apressaram o progresso (bio)tecnológico e a melhoria nos cuidados e higiene dos bens alimentares (El Goumi, 2017; Martín-Fernández et al., 2017; McPartlin et al., 2017). Assim sendo, os genossensores eletroquímicos – pequenos dispositivos com a capacidade de detetar, registar e converter a reação (bio)química da hibridação de duas cadeias de oligonucleotídeos complementares num sinal quantificável – surgem como uma alternativa bastante promissora (pelo seu baixo custo, capacidade de miniaturização, deteção em tempo real e fácil manuseamento) para monitorizar o aparecimento e/ou aumento da biomassa de microrganismos potencialmente perigosos nas redes hídricas naturais (rios, lagos, lagoas, etc...) ou artificiais (barragens, sistemas de aquacultura, etc...) de maneira a evitar ou, no mínimo, limitar as manifestações da HAB, pois caso um dos sistemas de aquacultura estejam contaminados, originará problemas agronómicos e ecológicos, podendo contaminar culturas inteiras ou mesmo levar à morte de toda a população produzida (Alves et al., 2016; El Goumi, 2017).

2. Motivação e objetivos

O aumento dos incidentes nefastos provocados por microrganismos tem originado uma constante preocupação na população – sobretudo nas áreas da saúde e na segurança alimentar – quanto ao bem-estar e qualidade da vida humana, pelo que é necessário o desenvolvimento de dispositivos analíticos capazes de fornecer informações confiáveis e em tempo real sobre ambientes contaminados.

Com o progresso tecnológico, vários campos científicos como a medicina, física, química, biologia, engenharia e (bio)tecnologia uniram-se para desenvolver técnicas e metodologias que permitem o desenvolvimento de dispositivos mais rápidos, versáteis, eficientes e de baixo custo para o diagnóstico e monitorização clínica e ambiental. Os biossensores são um dos dispositivos que surgiram dessa união, proporcionando sistemas portáteis simples, confiáveis, seletivos e de rápida deteção em comparação aos métodos analíticos convencionais (e.g. microscopia de fluorescência, reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês Polymerase chain reaction), espectroscopia, hibridização *in situ* fluorescente (FISH, do inglês Fluorescence *in situ* hybridization), cromatografia, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês Enzyme-linked immunosorbent assay), entre outros) que possuem limitações na análise dos analitos. Estas restrições podem incluir o custo e tempo do ensaio, o espaço de bancada do equipamento e a qualificação do profissional operacional, visto que cada metodologia molecular requer reagentes e equipamentos específicos que podem decorrer em mais de que um passo e necessitarem de técnicos especializados para os operar. Por exemplo, as técnicas de amplificação de ácido desoxirribonucleico (ADN) exigem locais específicos e esterilizados, assim como, um profissional qualificado para diminuir o risco de contaminação do material.

O grande interesse nos biossensores advém do baixo custo de produção, à versatilidade da funcionalização das suas características – precisão, especificidade, sensibilidade, tempo de deteção e

manuseamento – e da sua capacidade para realizar análises *in situ*. Portanto, este trabalho experimental teve como finalidade o desenvolvimento e otimização de um genossensor eletroquímico – enquanto ferramenta expedita e versátil – capaz de detetar antecipadamente a contaminação de meios aquáticos, nomeadamente os sistemas de aquacultura industriais de bivalves ibéricos, por estirpes de microalgas e cianobactérias potencialmente perigosas. Para tal, serão exploradas diferentes estratégias para a construção de genossensores eletroquímicos, capazes de detetar e identificar o crescimento de populações nocivas de microalgas e cianobactérias.

Assim, este trabalho teve como principal objetivo desenvolver um novo “design” capaz de detetar e quantificar o sinal elétrico resultante da hibridação das sondas complementares das microalgas dinoflageladas *Alexandrium minutum* para ser incorporado num genossensor eletroquímico. Para alcançar este resultado foi necessário:

1. Desenhar sequências específicas para a deteção da microalga *Alexandrium minutum*,
2. Desenvolver um genossensor eletroquímico capaz de detetar as sequências de ADN escolhidas;
3. Otimizar, caracterizar e avaliar as variáveis experimentais envolvidas na construção do sensor;
4. Analisar ADN proveniente de amostras reais (amostras ambientais);
5. Validar o desempenho dos genossensores com os métodos de deteção de referência, tais como o PCR.

3. Organização da tese

Capítulo 1 – Contextualização

Neste capítulo descreve-se, sucintamente, a situação atual do tema da dissertação e ainda uma visão geral sobre a aquacultura, os efeitos das HAB – nomeadamente a existência de cianobactérias e microalgas nesta prática de cultivo de peixes e moluscos – e a mais valia da utilização dos genossensores eletroquímicos para a monitorização destas florações. No final, encontram-se os objetivos deste trabalho.

Capítulo 2 – Estado de arte

Este capítulo está dedicado aos conceitos dos elementos chave desta dissertação. O capítulo inicia-se com uma pequena introdução à HAB e a sua relevância. De seguida, descrevem-se as cianobactérias e as microalgas – especificamente as microalgas dinoflageladas *Alexandrium minutum* e *Alexandrium ostenfeldii* – e faz-se uma síntese sobre os biossensores – a sua evolução, as suas aplicações e os seus diferentes constituintes – os genossensores e as técnicas eletroquímicas de voltametria.

Capítulo 3 – Materiais e métodos

Nesta secção são descritos os materiais utilizados e os procedimentos experimentais efetuados ao longo de toda a atividade experimental.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

Este capítulo dedica-se à apresentação e discussão dos resultados obtidos em cada procedimento efetuado e nas diversas etapas do projeto, assim como as otimizações realizadas no desenvolvimento do sensor.

Capítulo 5 – Conclusões

O último capítulo apresenta as principais conclusões adquiridas nesta investigação e as perspetivas futuras neste tema.

Capítulo 2 – Estado de arte

1. Introdução

A Terra tem sido o lar de milhões de microrganismos que evoluíram ao longo do tempo e, tal como os organismos macroscópicos, apresentam relações complexas e muito diversificadas, tanto para com os outros seres vivos como com o ambiente (Locey & Lennon, 2016; Walter et al., 2017). O fitoplâncton (microrganismos aquáticos fotossintéticos), por exemplo, compõe a base da teia alimentar dos seres aquáticos, contribui para a fixação de metade do carbono do planeta e, ainda, regula o ciclo dos nutrientes marinhos graças às suas interações com o zooplâncton (microrganismos aquáticos heterotróficos) (Behrenfeld & Falkowski, 1997; Falkowski et al., 1998; Bergkvist et al., 2012; Selander et al., 2015). No entanto, nem todas as relações estabelecidas são benéficas para os organismos (e.g. predação, parasitismo ou antibiose), podendo mesmo desencadear efeitos indesejados na dinâmica da teia alimentar. Um exemplo desta convivência contraprodutiva são as HAB e o seu efeito sob os organismos aquáticos e, conseqüentemente, no Homem.

As HAB são o fenómeno (comum e de frequência crescente) resultante da rápida proliferação de microrganismos nocivos (e.g. algumas espécies de microalgas e cianobactérias) em ecossistemas aquáticos. O seu aparecimento pode prejudicar a (bio)sustentabilidade local devido às toxinas naturais que produzem, como as intoxicações por moluscos (do inglês, shellfish poisoning), ou pela acumulação de biomassa planctónica, que provoca a diminuição ou dissipação da quantidade de oxigénio (O₂) da água quando se decompõe (Heisler et al., 2008; Ferris, 2016). Contudo, os impactos negativos não se limitam aos ecossistemas; os setores da saúde e da economia também são influenciados pelo aparecimento das HAB.

As contaminações provocadas por estes organismos podem levar a perdas económicas significativas para as comunidades, ora pela morte dos peixes, aves e mamíferos litorais, o que leva à diminuição da atividade turística, das atividades portuárias e da pesca comercial, ora pelos prejuízos derivados da limpeza e descontaminação das águas e/ou costas e dos custos associados aos cuidados do serviço de saúde, resultado da exposição direta – quando pessoas ou animais nadam em águas contaminadas – ou indireta – pela ingestão de água, peixes ou bivalves contaminados – às toxinas produzidas (CDC, 2018).

Estes eventos são facilmente reconhecidos pela coloração que conferem à água (doce, estuarina ou marinha), que varia entre verde, vermelho e castanho, dependendo da pigmentação e concentração da população de fitoplâncton – fenómeno cuja ocorrência tornou-se comum, ao longo dos anos, nas águas litorais e, como consequência, incentivou muitos investigadores a procurar e/ou identificar a razão do seu acréscimo, permitindo-nos hoje consultar uma extensa bibliografia de estudos comparativos, cuja finalidade é identificar as causas por detrás desta proliferação e desenvolver protocolos para o seu controlo (Anderson, 1989; Hallegraeff, 1993; GEOHAB, 2001; Vila et al., 2005).

Portanto, para descobrir o(s) motivo(s) por detrás da expansão geográfica e aumento na frequência e intensidade das HAB e, assim, prevenir futuros riscos (como o consumo de alimentos contaminados) e prejuízos económicos e ambientais (resultante da perda massiva de seres vivos costeiros e de aquacultura, por exemplo) foram desenvolvidas ou adaptadas algumas técnicas de deteção (e.g. microscopia ótica, FISH, espectroscopia, PCR, entre outras...).

Na União Europeia (UE) a maioria dos métodos analíticos usam os princípios da biologia molecular – em particular, quanto à atividade e interações biológicas entre as macromoléculas – tornando os estudos genómicos e os bioensaios, testes promissores para o avanço biotecnológico, pois possibilitam a distinção entre espécies morfologicamente semelhantes e avalia os seus comportamentos e relações nos diversos ecossistemas (Pividori, et al., 2000; Subirós, 2009; Alberts et al., 2015). A **tabela 1** identifica alguns dos métodos mais usuais da biologia molecular, bem como, as vantagens e desvantagens associadas a cada técnica molecular.

Contudo, e apesar de abundantes, estas técnicas não são suficientes para acompanhar o crescimento da HAB, pelo que procuram-se metodologias analíticas alternativas que permitam uma deteção fiável e, ao mesmo tempo, rápida, seletiva, de custo reduzido e *in situ*. Deste modo, a deteção das sequências nucleicas específicas de cada organismo (de humanos, plantas, vírus e bactérias) e/ou da sua população torna-se cada vez mais imprescindível em diversas áreas científicas, cujas aplicações vão desde a deteção de doenças e organismos causadores de contaminações alimentares a investigações forenses e ambientais (Pividori, et al., 2000). Assim, os genossensores – dispositivos analíticos que detetam com elevada precisão e eficácia sequências nucleicas – são a nova aposta destes ramos científicos para a rápida deteção de HAB.

Tabela 1 – Técnicas de diagnóstico molecular (Fonte: Biometrics, 2017).

Técnicas	Aplicações	Sensibilidade	Seletividade	Vantagens	Desvantagens
Convencionais baseadas em células	Microscopia Coloração de Gram Ensaio bioquímico	Bom a excelente	Bom	Baixo custo; Fornecer dados quantitativos e qualitativos	Amostras têm de ser colhidas em ambientes artificiais; Trabalho intensivo e demorado
Imunológicas	ELISA Ensaio sorológico Microensaio	Moderado a bom	Moderado a bom	Rápido; Barato; Fácil de operar; Fornecer dados quantitativos e qualitativos; alto rendimento	Apresenta limite mínimo de detecção; Dificuldades em gerar anticorpos seletivos
Baseadas em ácidos nucleicos	PCR	Excelente	Excelente	Rápido; Fácil de operar; funciona com reduzido número de amostras ou a baixas concentrações; fornece dados quantitativos e qualitativos	Não deteta espécies desconhecidas; Reduzida capacidade para a multiplexagem
	Sequenciação	Bom a excelente	Excelente	Providencia informação detalhada e imparcial; indica novas espécies	Apresenta limite mínimo de detecção; Dispendioso e demorado
	Microensaio de ADN/ARN	Bom	Excelente	Fácil de utilizar; Alto rendimento	Apresenta limite mínimo de detecção; Espécies desconhecidas não podem ser detetadas; Ligeiramente dispendioso e demorado
	Hibridação	Moderada a bom	Excelente	Rápido; Fácil de utilizar	Necessidade de pré-cultivar as amostras/organismos; Apresenta limite mínimo de detecção e um limite máximo de sondas Espécies desconhecidas não são detetadas
Outros	Espetroscopia	Bom	Bom	Alto rendimento; Rápido; Gera espectros interpretáveis; Reduzido custo	Apresenta limite mínimo de detecção; Pode ocorrer sobreposição de amostras no espectro; Investimentos e manutenção iniciais dispendiosas; Não diferencia espécies semelhantes

2. Aquacultura

A aquacultura (ou aquícultura) é o agro-negócio dedicado à produção de peixes e outros organismos aquáticos (e.g. algas, moluscos e crustáceos) em ambientes controlados. Segundo a direção-geral de recursos naturais, segurança e serviços marítimos (DGRM) esta prática “consiste na criação ou cultura de organismos aquáticos, aplicando técnicas concebidas para aumentar, para além das capacidades naturais do meio, a produção dos referidos organismos”. Esta produção pode ocorrer tanto em água doce – lagoas, rios, lagos, tanques artificiais – como em águas marinhas – estuários, oceanos, mares, desde que, em pelo menos uma fase de vida destes organismos, haja intervenção humana (Mestre, 2008; Fróis, 2016).

Embora haja muitas críticas aos modos de cultivo destes organismos, o número de países e empresas com práticas de aquacultura tem aumentado nos últimos anos graças aos benefícios socioeconómicos que a atividade apresenta (e.g. criação de novos postos de trabalho, aumento dos nutrientes disponíveis no mercado, controlo do preço do pescado, etc...). Com este súbito crescimento a consciência ambiental das populações também aumentou e contribuiu para a implementação das técnicas de monitorização da segurança e controlo da qualidade na produção dos organismos, pelo que, desde 1976, a qualidade dos alimentos produzidos em aquacultura aumentou mais de 500% (FAO, 2018).

Atendendo aos valores apresentados pela comissão europeia, em 2015, a China foi o país-produtor que mais recorreu a esta atividade (**figura 1**), sendo responsável por 17,06% do volume total de organismos cultivados, enquanto, os 28 países da UE, em conjunto, contribuíram com apenas 1,23% para o volume total. Porém, esses 1,23% representaram uma produção de 1,3 milhões de toneladas em volume de organismos, correspondendo a uma receita de aproximadamente 4,4 mil milhões de euros (European Commission, 2018).

Comparando os volumes de organismos obtidos mundialmente pelos dois métodos de captura (pesca e aquacultura) verifica-se que atualmente, perto de metade do pescado disponível no mercado tem origem em aquacultura (**figura 1**). Devido à reduzida adaptabilidade de Portugal à aquacultura, o seu contributo é desprezável em comparação às percentagens dos principais países-produtores.

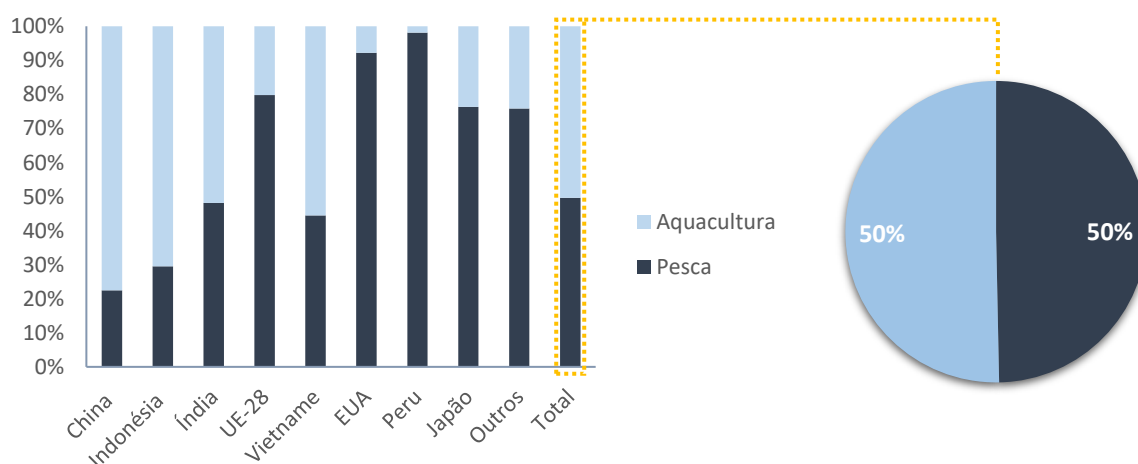


Figura 1 – Percentagem e origem dos produtos aquáticos colhidos pela pesca e aquacultura, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).

Desde a implementação desta prática, a diversidade dos organismos produzidos tem aumentando, diferenciando-se hoje mais de cinco centenas de espécies produzidas nos diversos sistemas aquícolas. Dos organismos produzidos a grande predominância ainda são os peixes (de água doce e salgada), apesar de nos últimos anos haver um aumento na produção de algas, moluscos e crustáceos (**figura 2**). No entanto, graças à geografia da Europa, os principais organismos produzidos são os moluscos, nomeadamente os mexilhões, ostras e outros bivalves, que compõem cerca de um quarto do volume total cultivado na UE, enquanto o salmão atlântico e a truta arco-íris representam mais de um terço do valor total (**figura 3**). Os países europeus que mais apostam na aquacultura são o Reino Unido, a França, a Espanha, a Grécia e a Itália. A **tabela 2** e **3** expressam a produção derivada de aquacultura dos 28 países da UE e os dez organismos mais cultivados em 2015, respetivamente (FAO, 2018).

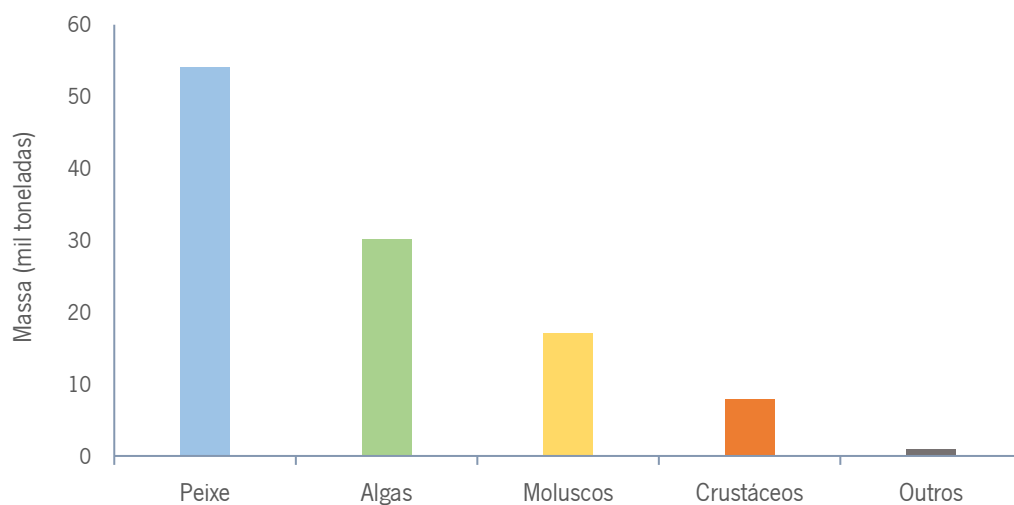


Figura 2 – Representação dos organismos mais cultivadas em 2016. Massa em mil toneladas de peso vivo (adaptado de Eurostat, 2018).

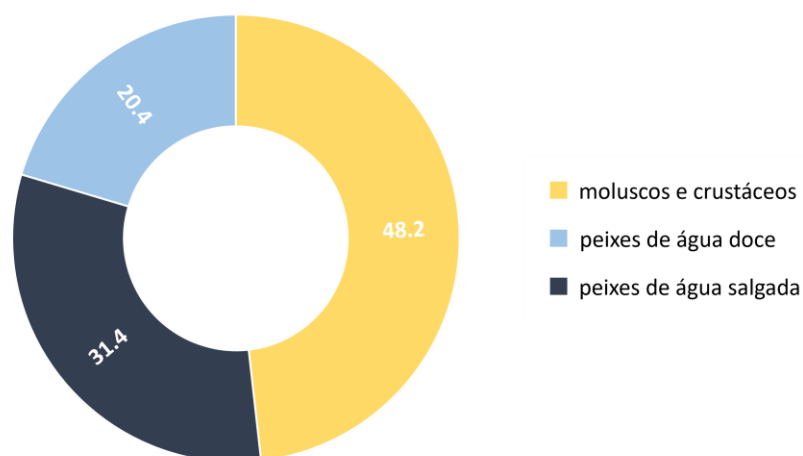


Figura 3 – Principais organismos cultivados na União Europeia, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).

Tabela 2 – Massa e valor dos organismos produzidos por aquacultura na EU-28, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).

País	Massa (t)	Valor (€)	País	Massa (t)	Valor (€)
Reino Unido (UK)	211568	995335	Suécia (SE)	12277	43112
França (FR)	206800	736400	República Checa (CZ)	20200	35049
Espanha (ES)	293510	513397	Chipre (CY)	5459	32295
Grécia (EL)	106038	464053	Hungria (HU)	17337	30634
Itália (IT)	148763	366309	Bulgária (BG)	10652	22766
Irlanda (IE)	37581	136482	Roménia (RO)	11016	21773
Malta (MT)	10800	127925	Áustria (AT)	3495	19570
Dinamarca (DK)	36010	110154	Lituânia (LT)	4083	9330
Croácia (HR)	16875	102662	Eslováquia (SK)	1248	3575
Holanda (NL)	62204	94682	Estónia (ET)	799	3390
Polónia (PL)	33560	86603	Eslovénia (SI)	1434	3327
Alemanha (DE)	30167	77164	Letónia (LV)	863	2376
Portugal (PT)	9320	53160	Bélgica (BE)	82	540
Finlândia (FI)	14879	49399	EU-28	1307020	4141462

Tabela 3 – Principais espécies produzidas na UE, 2015 (adaptado de European Commission, 2018).

Espécie	Massa (t)
Mexilhões	405654
Truta	193444
Salmão	172679
Dourada	110150
Ostras	92609
Carpa	79473
Robalo	77470
Moluscos	30000
Atum rabilho	11642
Pregado	9360

2.1. Aquacultura em Portugal

Portugal é o país europeu com maior consumo *per capita* de pescado (55,9 kg/ano per capita) (**figuras 4 e 5**) e o terceiro país a nível mundial, ultrapassado apenas pela Islândia e o Japão. Todavia, continua a ser um dos países que menos explora alternativas sustentáveis, como a aquacultura, à pesca tradicional (**figura 6**) (Ciência Viva, 2018).

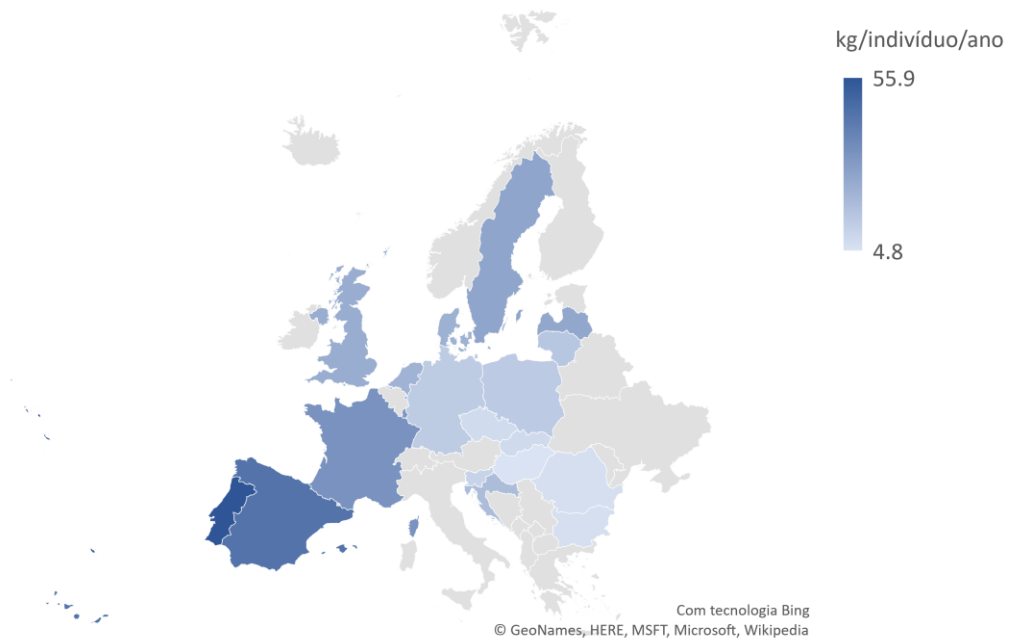


Figura 4 – Representação do consumo per capita anual dos países europeus (adaptado de European Commission, 2018).

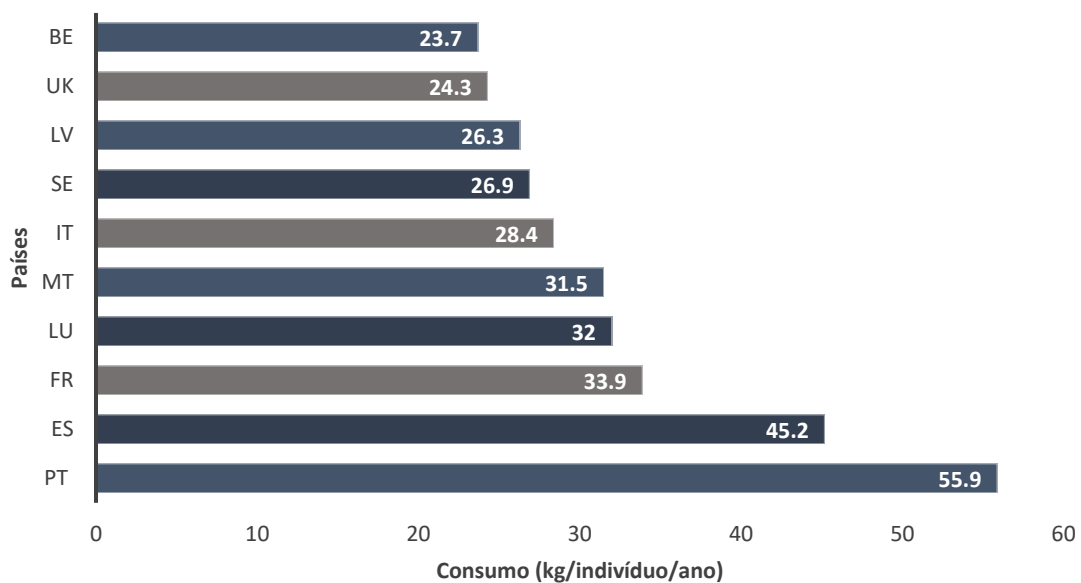


Figura 5 – Representação do consumo anual de pescado dos 10 países mais consumidores da Europa, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).

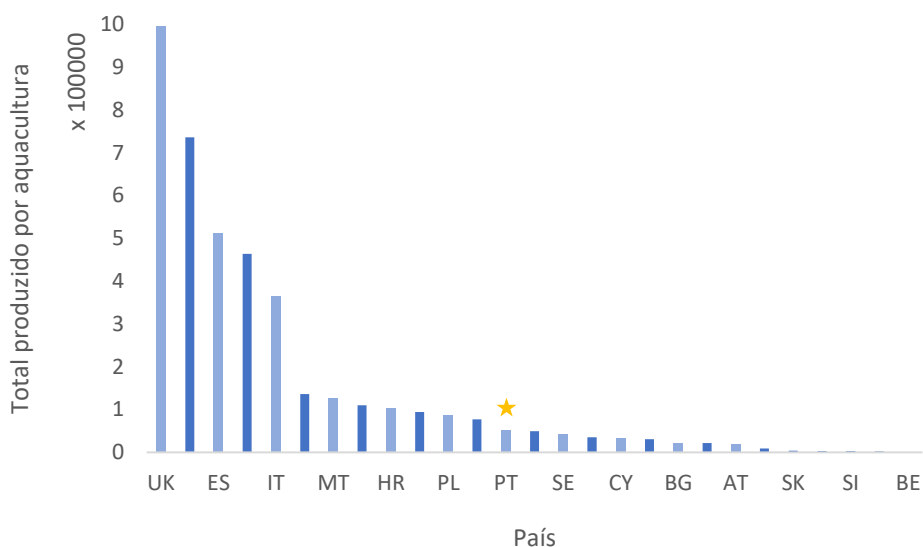


Figura 6 – Volume total de organismos produzidos pela UE, em 2015 (adaptado de European Commission, 2018).

Até 1990, as práticas aquícolas portuguesas limitavam-se à produção de trutas em regime intensivo, nas águas interiores, e dourada, robalo e bivalves (em particular amêijoas) em regime extensivo, nas zonas estuarinas e marinhas (European Commission, 2018). Desde então, Portugal diversificou os seus recursos, produzindo atualmente mais de uma dezena de espécies diferentes (incluindo algas, cefalópodes e crustáceos) nos três sistemas de cultivo: regime intensivo, extensivo e semi-intensivo (Gonçalves, 2014). A **figura 7** esquematiza os métodos de cultivo adotados na produção aquícola portuguesa.

De acordo com a Associação Portuguesa de Aquicultores, a microprodução de bivalves advém do regime extensivo, tendo a maior produção na Ria Formosa (Algarve) e na Ria de Aveiro (Baixo Vouga, Aveiro). A produção de robalos e dourada em regime extensivo e semi-intensivo e o cultivo em regime intensivo aplica-se, essencialmente, nas águas interiores para a produção de peixes planos (linguado e pregado) e trutas (Gonçalves, 2014).

O regime extensivo utiliza exclusivamente os recursos naturais disponíveis, ou seja, neste regime o(s) organismo(s) de interesse é capturado diretamente do meio onde cresceu ou de uma unidade de reprodução e a sua alimentação efetua-se atendendo ao que se encontra disponível no meio natural. No regime semi-intensivo os organismos são reproduzidos artificialmente. A alimentação, isto é, a fase de engorda dos ovos e juvenis obtidos, é conseguida recorrendo a recursos naturais e suplementos artificiais e o seu crescimento frequentemente testado para aumentar a produção. O regime intensivo é fruto da monitorização constante das espécies. As etapas de reprodução e crescimento recorre a exames e calibragens sucessivas. A alimentação neste regime é exclusivamente efetuada artificialmente (Relatório do Estado do Ambiente, 2019).

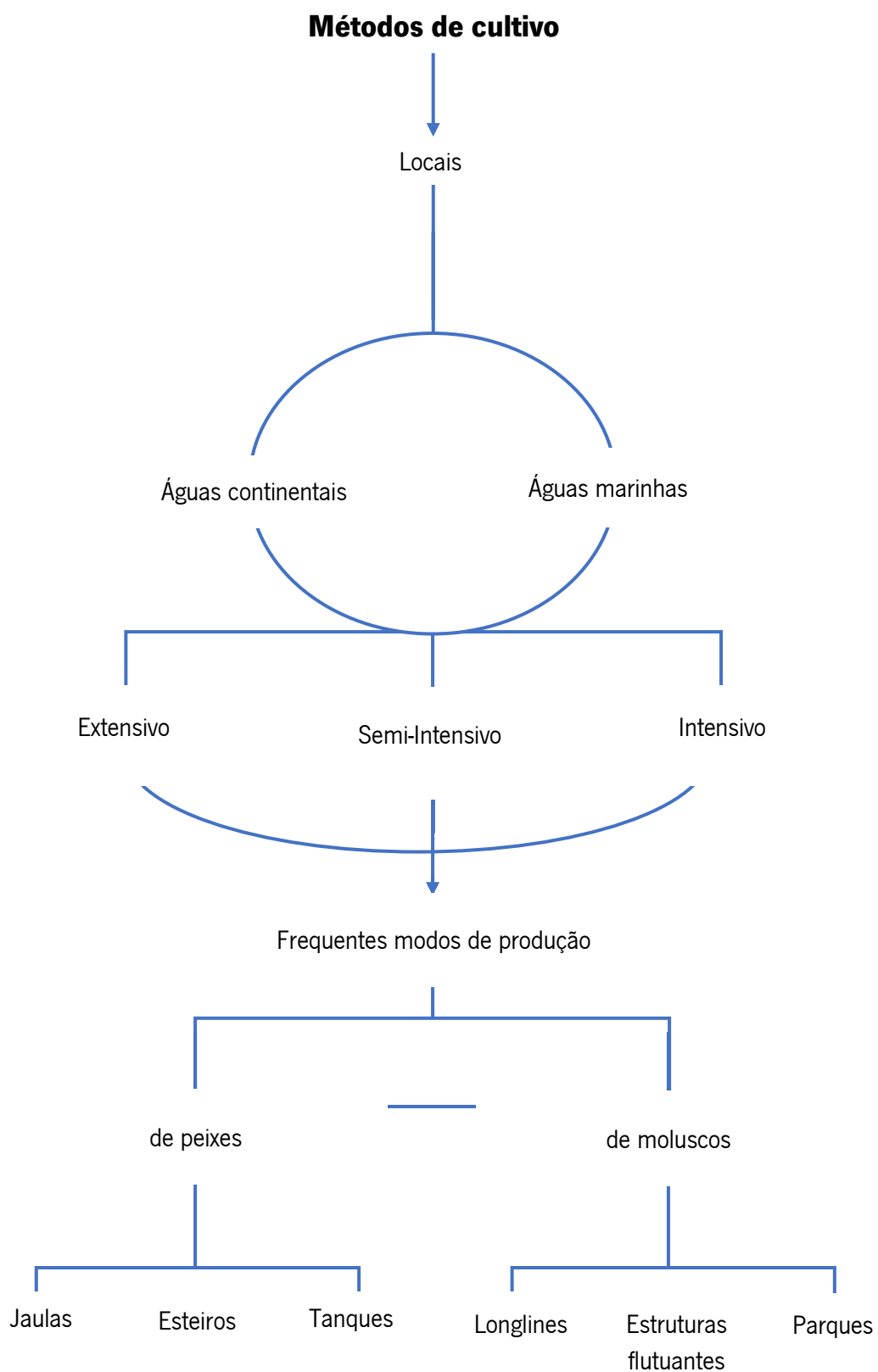


Figura 7 – Esquema simplificado dos tradicionais métodos de cultivo da aquacultura portuguesa.

Segundo o Instituto Nacional de Estatística (INE) e a DGRM, em 2016, Portugal produziu 11,259 toneladas de organismos por aquacultura, gerando uma receita de aproximadamente 75,2 milhões de euros. Em comparação a 2015, estes valores evidenciam um aumento na produção de 17,8% e um acréscimo de 38,9% em receitas. A maioria destes organismos provém da prática em águas salobras e marinhas (94% da produção total), tendo como produto principal a produção de moluscos e crustáceos (56,4%), seguido dos peixes marinhos (37,6%), enquanto os peixes de água doce apenas representam 6,0% da produção total de 2016. A **tabela 4** representa as principais espécies cultivadas em Portugal, enquanto a **tabela 5** expressa a quantidade e a diversidade de organismos produzidos em Portugal desde 2000 a 2017.

Embora a fraca adesão à aquacultura, em Portugal, podemos encontrar, desde 2018, 1010 empresas que utilizam ou investem em práticas aquícolas. Dessas 1010 empresas, 985 trabalham exclusivamente em águas salgadas ou salobras, enquanto as restantes 25 exercem funções sobre águas doces. A **tabela 6** expressa o número de empresas dedicadas à aquacultura por distrito e a **figura 8** ilustra a quantidade de organismos produzidos por região.

Tabela 4 – Nome comum e científico das principais espécies cultivadas em aquacultura, por tipo de água e sistema, em Portugal.

Principais espécies	Sistemas preferências		
	Nome comum	Nome científico	
Peixes de água doce	Truta arco-iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Intensivo
	Truta fário	<i>Salmo trutta</i>	Intensivo
	Pregado*	<i>Psetta maxima</i>	Intensivo
Moluscos	Amêijoia boa	<i>Ruditapes decussatus</i>	Extensivo
	Amêijoia macha	<i>Venerupis pullastra</i>	Extensivo
	Berbigão	<i>Cerastoderma edule</i>	Extensivo ou semi-intensivo
	Choco	<i>Sepia officinalis</i>	Extensivo
	Mexilhão	<i>Mytilus spp.</i>	Extensivo
	Ostra	<i>Ostrea spp.</i>	Extensivo
	Ostra portuguesa	<i>Crassostrea spp.</i>	Extensivo
	Peixes de água marinhas	Dourada	<i>Sparus aurata</i>
Enguia		<i>Anguilla anguilla</i>	Extensivo
Linguado*		<i>Solea spp.</i>	Extensivo ou semi-intensivo
Robalo		<i>Disentrarchus labrax</i>	Extensivo, intensivo ou semi-intensivo
Sargo		<i>Diplodus argus</i>	Extensivo ou semi-intensivo
Tainha		<i>Mugil spp./Liza spp.</i>	Extensivo ou semi-intensivo

* Cultivo pode ocorrer tanto em água doce como em água salgada.

Tabela 5 – Produção derivada da aquacultura, em Portugal, entre 2000 e 2017. Valores expresso em toneladas. Informação obtida pela INE/DGRM, 2001 – 2018.

ESPÉCIES \ ANO	ANO																	
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
PREGADO	379	343	386	323	275	214	185	167	351	1276	2424	3197	4406	2353	3588	2302	2388	2745
ROBALO	653	925	808	1386	1234	1530	1584	1205	1069	444	396	460	556	455	400	297	427	701
DOURADA	1814	1762	1855	1449	1685	1519	1623	1930	1635	1383	851	828	895	1201	1071	1099	1196	1038
AMÉIJOAS	2417	2724	3093	3186	2014	1647	2335	2021	2299	2347	2539	2339	2394	2372	2252	2300	3716	3870
MEXILHÕES	273	213	424	279	193	276	372	290	269	304	157	250	338	1547	1244	1315	1474	1722
OSTRAS	547	956	421	415	432	522	679	712	1037	944	548	864	736	1093	1085	1034	1014	1185
TRUTAS	1293	1213	1233	954	916	845	943	936	941	936	950	1115	479	772	788	890	676	665
OUTRAS	379	75	67	41	52	142	172	187	573	359	148	113	513	162	363	687	368	623
TOTAL	7536	8211	8287	8033	6801	6695	7893	7448	7987	7993	8013	9166	10317	9955	10791	9561	11259	12549

Tabela 6 – Número de empresas com práticas aquícolas nos diversos distritos e ilhas portuguesas.

Aveiro	71	Ilha de São Miguel (Ponta Delgada)	2
Beja	11	Ilha da Terceira (Angra do Heroísmo)	2
Braga	14	Leiria	28
Bragança	7	Lisboa	80
Castelo Branco	9	Portalegre	2
Coimbra	36	Porto	24
Évora	2	Santarém	13
Faro	632	Setúbal	104
Guarda	5	Viana do Castelo	20
Ilha da Madeira (Funchal)	10	Vila real	1
Ilha de São Jorge (Angra do Heroísmo)	1	Viseu	7

Informação obtida no site da diretoria de empresas einforma, Portugal. Disponível em: https://www.infoempresas.com.pt/A032_AQUICULTURA.html

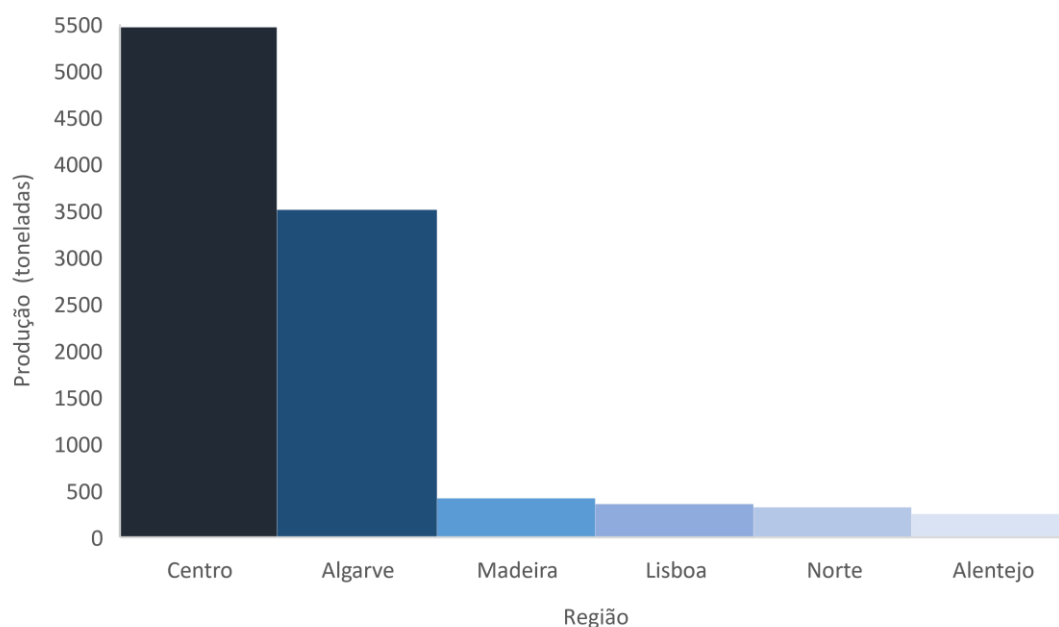


Figura 8 – Distribuição regional dos produtos de aquacultura em Portugal, em 2012 (adaptado do DGRM, 2014).

3. Cianobactérias

As cianobactérias (também conhecidas por “microalgas azuis” ou cianófitas) compõem um conjunto de procariontes fotossintéticos que emergiram há cerca de 3,5 mil milhões de anos, evoluindo até à data para um dos filos mais diversificados e dispersos no mundo (Schirmer et al., 2011; Walter et al., 2017).

Estes organismos habitam predominantemente em sistemas aquáticos de água doce (onde compõem o fitoplâncton), mas também podem habitar ecossistemas marinhos e salobros (ambientes estuarinos e/ou costeiros onde a água doce se mistura com a água salgada), pois são capazes de tolerar elevadas pressões osmóticas, assim como, condições hipertérmicas, alguns mesmo por extensos períodos de tempo. Recentemente, as cianobactérias têm surgido em sistemas terrestres, em particular em lagos e águas superficiais, representando uma potencial ameaça para a saúde pública (Berger et al., 2008).

As cianobactérias podem ser fotossintéticas unicelulares ou multicelulares, simbióticas, tóxicas ou predadoras e ainda apresentam características metabólicas (são capazes de fixar nitrogénio) e uma pigmentação azul-esverdeado (ciano) semelhantes às algas eucarióticas. Para além de produzirem O₂, tal como as plantas e algas eucarióticas, algumas cianófitas enriquecem os solos com compostos orgânicos, prevenindo a sua erosão – função extremamente importante no meio ambiente (Pelczar et al., 1986; Prescott et al., 1999; Tortora et al., 2001).

Porém, nem todas apresentam benefícios para o ambiente. Algumas dessas espécies são capazes de produzir toxinas, designadas de cianotoxinas. Estas toxinas são um mecanismo de defesa das cianobactérias contra predadores. À semelhança das microalgas, em condições ideais – elevadas concentrações de nitratos e fosfatos, temperaturas elevadas e uma ampla disponibilidade de luz – as cianobactérias reproduzem-se descontroladamente, causando as florações, que estão frequentemente relacionadas com processos de eutrofização. A proliferação das cianobactérias e, conseqüentemente, das cianotoxinas na água representam um risco de grau incerto para a sustentabilidade ecológica, económica e para a própria saúde pública, pois proliferam durante todo o ano, com maior intensidade no verão, em vários regimes aquáticos – rios, albufeiras e lagos de norte a sul do país – e com uma tendência acrescida para o seu aparecimento (Berger et al., 2008; Paerl & Paul, 2012). A **tabela 7** indica as citotoxinas produzidas por alguns géneros encontrados nas diferentes ordens de cianobactérias, assim como a morfologia característica de cada ordem.

Os sintomas da ingestão destas toxinas podem variar muito e vão desde simples irritações na pele e gastrointestinais até, eventualmente, doenças neurodegenerativas (por exemplo, esclerose lateral amiotrófica derivada das neurotoxinas β-metilamina-L-alanina, BMAA) ou mesmo resultar na morte do indivíduo (Berger et al., 2008; Paerl & Paul, 2012).

Tabela 7 – Cianobactérias potencialmente tóxicas (adaptado de WHO, 1999; Marques, 2006).

Ordem	Morfologia básica	Gêneros * característicos	Toxinas características
Chroococcales	Unicelulares/Coloniais	<i>Aphanocaspa</i>	Microcistinas Saxitoxinas Lipopolisacaridos
		<i>Eucapsis</i>	
		<i>Gloeobacter</i>	
		<i>Hydrococcus</i>	
		<i>Merismopedia</i>	
		<i>Microcystis</i>	
		<i>Placoma</i>	
Oscillatoriales	Filamentosas	<i>Radaisia</i>	Microcistinas Lipopolisacaridos Lingbiatoxina Cilindrospermopsinas
		<i>Anabaenopsis</i>	
		<i>Aphanizomenon</i>	
		<i>Lyngbya</i>	
		<i>Oscillatoria</i>	
		<i>Planktothrix;</i>	
		<i>Pseudanabaena</i>	
Nostocales	Filamentosas	<i>Schizothrix</i>	Anatoxinas Cilindrospermopsinas Microcistinas Nodularinas Saxitoxinas Lipopolisacaridos Neosaxitoxinas GTX3
		<i>Yonedaella</i>	
		<i>Anabaena</i>	
		<i>Anabaenopsis</i>	
		<i>Cylindrospermopsis</i>	
		<i>Dolichospermum</i>	
		<i>Nodularia</i>	
<i>Nostoc</i>			
Stigonematales	Filamentosas ramificadas	<i>Rhaphidiopsis</i>	Lipopolisacaridos
		<i>Wollea</i>	
		<i>Baradlaia</i>	
		<i>Chlorogloeopsis</i>	
		<i>Desmosiphon</i>	
		<i>Fischerella</i>	
		<i>Stigonema</i>	
<i>Symphyonemopsis</i>			
<i>Thalpophila</i>			
<i>Umezakia</i>			

* Nem todas as cianobactérias mencionadas apresentam toxinas.

4. Microalgas

As microalgas representam um conjunto de organismos aquáticos unicelulares ou multicelular simples cujas células compreendem tamanhos entre 2 e 200 µm, capazes de converter a luz solar em energia química através da fotossíntese. Este processo é essencial para a preservação da vida na Terra pois, para além de constituírem a base da teia alimentar, produzem O₂, consumindo, ao mesmo tempo, dióxido de carbono (CO₂) (Chapman, 2010; Alaswad et al., 2015). Muitas destas aparecem como células únicas (ou seja, são unicelulares), outras formam cadeias (filamentosas) ou talos (corpo vegetativo de uma alga multicelular) e ainda podem ser endofíticas, isto é, vivem no interior de outros organismos –

tais como protozoários, moluscos, esponjas e corais – como endossimbióticos ou associados a fungos para formar líquenes. No entanto, estas algas são todas eucariontes fotossintéticas que não possuem tecidos vegetais (e.g. raízes, caule e folhas) (Pelczar et al., 1986; Prescott et al., 1999; Tortora et al., 2001).

Estes organismos podem ainda ser autotróficos ou heterotróficos e são capazes de se reproduzir rapidamente, originando grandes aglomerados de biomassa em diversos ecossistemas aquáticos e possibilitando a sua sobrevivência sob condições e regimes rigorosos. Esta resiliência deve-se à sua estrutura celular simples que, num meio aquoso, facilita o seu acesso à água, CO₂ e a outros nutrientes para realizarem a fotossíntese (Mata et al., 2010; John et al., 2011; Alaswad et al., 2015; Velazquez-Lucio et al., 2018). Portanto, as microalgas são seres complexos, apesar da simplicidade da sua estrutura (Tomaselli, 1997).

Em geral, as microalgas são taxonomicamente classificadas com base no tipo de pigmentos, reprodução, flagelos e material de armazenamento, bem como pela sua estrutura, morfologia celular (parede e arranjo celular) e habitat. A sua reprodução pode ser assexuada ou sexuada e ainda podem possuir flagelos, mas todas encontram meios de mobilidade e possuem pigmentos lipossolúveis – clorofila (existente em todas as algas) e carotenoides (carotenos e xantofilas) – e algumas possuem pigmentos hidrossolúveis, as ficobilinas (ficobiliproteínas). Tais pigmentos são responsáveis pela coloração encontrada nas algas (Pelczar et al., 1986; Prescott et al., 1999; Tortora et al., 2001). As microalgas podem ocupar diferentes níveis tróficos, principalmente com base na autotrofia e heterotrofia. As possíveis vias nutricionais destes seres são a fotoautotrofia (obrigatória ou facultativa), fotoheterotrofia, auxotrofia e mixotrofia. Sob o crescimento mixotrófico, uma mudança definitiva entre autotrofia e heterotrofia não ocorre, exceto na ausência de luz (Grobbelaar, 2004; Brennan & Owende, 2010).

Os dois principais grupos de microalgas são as diatomáceas e os dinoflagelado (CDC, 2018). Neste caso, foi estudado uma espécie de dinoflagelados do género *Alexandrium* conhecida pelas suas toxinas marinhas e que frequentemente se agregam para formar os eventos de HAB ao longo das costas mediterrânicas e atlânticas.

4.1. Diatomáceas

Diatomáceas são pequenas algas fotossintéticas unicelulares, revestidas por uma camada silicatada designada frústula (Gross, 2012; Uthappa et al., 2018). Muito biodiversas as diatomáceas, cujos tamanhos variam entre os 10 – 200 µm de diâmetro, constituem um dos, senão o, grupo de fitoplâncton mais relevantes, pois constituem a base da teia alimentar de muitos ecossistemas aquáticos – contribuem para 45% da produção primária marinha e 25% da produção global total – e, ainda, são um dos principais intervenientes na (bio)reciclagem de carbono, nitrogénio, fósforo e sílica (Werner, 1977; Mann, 1999; Sarthou et al., 2005; Bates & Trainer, 2006).

As diatomáceas encontram-se frequentemente em regimes costeiras, onde a atividade humana é mais significativa, porque requerem locais luminosos e ricos em nutrientes (e.g. carbono, nitrogénio, fósforo e sílica) para crescerem/proliferarem, bem como águas turbulentas para se manter em suspensão. A maioria destes organismos são considerados benignos, porém existem espécies conhecidos por causar danos ora pela depleção de O₂ local ora pela produção da neurotoxina ácido

domoico (AD). A primeira espécie conhecida por produzir AD pertence ao género *Pseudo-nitzschia* (Bates & Trainer, 2006).

Até à data foram registadas mais de dez mil espécies de diatomáceas (5,500 vivas e 4,500 fósseis, aproximadamente). A **tabela 8** exemplifica os principais géneros (e a respetiva ordem) das famílias de diatomáceas que apresentam um risco ecológico.

Tabela 8 – Exemplo dos impactos de alguns géneros de diatomáceas. Os nomes a negrito representam os organismos de maior risco ambiental (adaptado de Procopiak, 2006).

Ordem	Família	Exemplo de géneros vivos	Impacto
Thalassiosirales	Lauderiaceae		
	Skeletonemataceae	<i>Schroedrella</i> ; <i>Skeletonema</i> ;	Coloração das águas
	Thalassiosiraceae	<i>Skeletonemopsis</i>	Intoxicação de organismos filtradores
Coscinodiscales	Trochosiraceae		
	Aulacodiscaceae		
	Coscinodiscaceae	<i>Coscinodiscopsis</i> ; <i>Cymatodiscus</i> ;	
	Heliopeltaceae	<i>Haynaladella</i> ; <i>Kozloviella</i> ;	Intoxicação de organismos filtradores
	Hemidiscaceae	<i>Microsolenia</i> ; <i>Palmeria</i> ;	
	Hemipeltaceae	<i>Phacodiscus</i> ; <i>Stoschia</i> ;	Depleção do O ₂ da água
Hemiaulales	Lobodisceae	<i>Symbolophora</i> ; <i>Veniaminia</i>	
	Rocellaceae		
	Hemiaulaceae	<i>Ailuretta</i> ; <i>Arcus</i> ; <i>Baxteriopsis</i> ;	
	Isthmiaceae	<i>Bonea</i> ; <i>Cerataulina</i> ;	Intoxicação de organismos filtradores
	Sheshukoviaceae	<i>Climacodium</i> ; <i>Dextradonator</i> ;	Depleção do O ₂ da água
Chaetocerotales		<i>Monile</i> ; <i>Pseudorutilaria</i> ;	
		<i>Rymaiopsis</i> ; <i>Sphynctoletus</i> ;	
		<i>Syringidium</i> ; <i>Trinacria</i>	
Chaetocerotales	Chaetocerataceae	<i>Acanthoceras</i> ; <i>Bacteriastrum</i> ;	
		<i>Chaetoceros</i> ; <i>Chasea</i> ; <i>Dossetia</i> ;	Intoxicação de organismos filtradores
		<i>Epithelion</i> ; <i>Hercotheca</i> ;	
		<i>Monoceros</i> ; <i>Periptera</i> ;	
		<i>Syndendrium</i>	
	Leptocylindraceae	<i>Leptocylindrus</i> ; <i>Tenuicylindrus</i>	
Fragilariales		<i>Asteroplanus</i> ; <i>Brandinia</i> ;	
		<i>Ceratoneis</i> ; <i>Desikaneis</i> ; <i>Fossula</i> ;	
		<i>Fragilariforma</i> ; <i>Frankophila</i> ;	
		<i>Gedaniella</i> ; <i>Hyaloneis</i> ;	
		<i>Koernerrella</i> ; <i>Martyana</i> ;	
		<i>Neofragilaria</i> ; <i>Odontidium</i> ;	
		<i>Pseudoeunotia</i> ; <i>Pteroncola</i> ;	
		<i>Rimoneis</i> ; <i>Syrinx</i>	
Thalassiophysales	Catenulaceae	<i>Amphora</i> ; <i>Catenula</i>	Potencialmente tóxicas
	Thalassiophysaceae		
Bacillariales		<i>Allonitzschia</i> ; <i>Alveus</i> ; <i>Bacillaria</i> ;	
		<i>Cylindrotheca</i> ; <i>Cymatonitzschia</i> ;	
		<i>Denticula</i> ; <i>Fragilariopsis</i> ; <i>Giffenia</i> ;	
		<i>Grunowia</i> ; <i>Hantzschia</i> ; <i>Mediaria</i> ;	Produção de toxinas
		<i>Nitzschia</i> ; <i>Perrya</i> ;	
		<i>Pseudo-nitzschia</i> ; <i>Sigmatella</i> ;	
	<i>Simonsenia</i> ; <i>Trybilonella</i>		

Fonte: <http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/>

4.2. Dinoflagelados

Um dinoflagelado é constituído por uma célula com dois flagelos diferentes e/ou possuem um dinocarion – núcleo único, em que os cromossomas se mantêm condensados e visíveis durante a mitose (Sousa et al., 1999). Atendendo a esta definição, estima-se que 75% a 80% das espécies planctónicas são dinoflagelados (Cembella, 2003).

Estes organismos incluem-se no reino Protista, divisão *Dinoflagellata* e encontram-se, maioritariamente, em ambientes aquáticos (e.g. marinhos, estuarinos, continentais, bentónicos e em glaciares marinhos). Aproximadamente metade são fotossintéticos autotróficos, enquanto a outra metade são heterotróficos e alimentam-se via osmotrofia ou fagotrofia, atuando como predadores, endosimbiontes ou parasitas, pelo que são um dos constituintes mais importantes do fitoplâncton marinhos e de água doce (Gaines & Elbrächter 1987; Sousa et al., 1999; New World Encyclopedia, 2008).

Estes seres geralmente vivem isolados, pois a maioria são células móveis devido aos seus flagelos capazes de locomoção, mas, por vezes, formam colónias. Morfologicamente, são organismos bastante diversos, complexos e com múltiplos organelos especializados. As suas células têm dimensões compreendidas entre os 5 e 100 µm, apesar de existirem espécies registadas com 2 mm de diâmetro (Sousa et al., 1999).

Os seus géneros mais conhecidos são *Alexandrium*, *Gonyaulax* e *Gymnodium* e as suas toxinas são das biotoxinas mais potentes, pelo que estes organismos são os principais constituintes das HAB, cujas consequências já foram descritas.

4.3. *Alexandrium spp.*

De entre todos os organismos responsáveis pelas HAB, os dinoflagelados do género *Alexandrium* são, indiscutivelmente, dos mais importantes e mais estudados graças à sua ampla diversidade e distribuição (que se tem expandido nos últimos anos), assim como, pela gravidade dos surtos de intoxicação causados pelas neurotoxinas excretadas por estes dinoflagelados (Anderson et al., 2012; Fabro et al., 2017).

A capacidade destes procariontes colonizar diferentes e extensas regiões (águas polares, temperadas ou subtropicais) evidencia a sua adaptabilidade e resiliência e, com mais de 30 espécies morfológicamente definidas, algumas das quais produtoras de toxinas ou provocam efeitos nocivos sob a fauna e flora local, este género desempenha um enorme papel nas teias alimentares aquáticas e ecológicas, constituindo, portanto, uma ameaça para o ambiente – contaminação de águas e de organismos aquáticos – assim como para a saúde pública – intoxicações por exposição direta ou indireta às suas neurotoxinas (Sournia, 1995; Anderson et al., 2012; Fabro et al., 2017).

As neurotoxinas produzidas pelas diferentes espécies de *Alexandrium* são particularmente interessantes, pois este é o único género de microalgas que produz toxinas do tipo saxitoxinas (STX) – toxinas com poder analgésico, responsáveis pelos surtos de intoxicação parálitica causada por moluscos (PSP, do inglês paralytic shellfish poisoning) (Fabro et al., 2017). Todavia, a diversidade toxigénica não se limita às STX. As *Alexandrium spp.* segregam toxinas de três famílias diferentes – saxitoxinas, espirolidos e goniodomios – característica peculiar deste género (Anderson et al., 2012).

Apesar da sua vasta distribuição global, a taxa de crescimento das *Alexandrium spp.* normalmente não é rápida, pelo que, quando distribuídas numa maior escala espacial (inferior a 100 km), coexistem numa percentagem moderada de biomassa em conjunto com outras espécies, tendo o fenómeno uma duração de dias ou, em certos casos, semanas (Anderson et al., 2012).

4.3.1. Taxonomia e filogenia de *Alexandrium*

O género *Alexandrium* foi formalmente estabelecido com a descrição da espécie *Alexandrium minutum* por Halim em 1960 (Halim, 1960). No entanto, as tentativas para definir as diversas espécies dentro deste género nem sempre foram bem-sucedidas, tendo muitas delas sido incluídas originalmente noutros géneros como o *Gonyaulax*, *Protogonyaulax*, *Gessnerium*, *Goniodoma* e *Pirodinium* (Balech & Tangen, 1985; Anderson et al., 2012; John et al., 2014; Fabro et al., 2017). A dificuldade na classificação taxonómica e na identificação destas espécies deve-se à variabilidade de caracteres distintivos que cada uma apresenta (Balech & Tangen, 1985; Anderson et al., 2012).

Do ponto de vista morfológico, as espécies do género *Alexandrium* são bastante homogéneas, pelo que para uma análise detalhada e correta identificação das espécies deste género são consideradas várias características tais como o tamanho e forma da célula, a formação de cadeias, a orientação das placas tecais, a forma do complexo de poros apicais, a posição da primeira placa apical (1'), a presença/ausência do poro ventral, entre outros (Balech 1995; Gu et al., 2013; John et al., 2014; Fabro et al., 2017). Geralmente, estes seres aparentam-se como pequenas a médias células (entre 17 a 54 µm) ovais ou elípticas sem espinhos. A placa apical do poro é grande, os seus sulcos rasos e as paredes tecais finas. Algumas ainda apresentam um retículo muito fraco, irregular e incompleto na placa sulcal posterior e 1' (Balech, 1989). A **figura 9** ilustra as diferenças entre algumas das espécies do género *Alexandrium*.

Com o avanço das técnicas moleculares, a classificação de espécies de *Alexandrium* foram revistos por vários autores (Anderson et al. 2012; Fabro et al., 2017). Estas análises estabeleceram (segundo as análises às sequências parciais do gene da grande subunidade ribossomal (LSUrADN do inglês large subunit ribossomal DNA)) três complexos de espécies: o complexo *Alexandrium ostentfeldii*, o complexo *Alexandrium minutum* e o complexo *Alexandrium tamarense*, esboçado na **figura 10** (John et al., 2003a, Lilly et al., 2005; Lilly et al., 2007; Anderson et al., 2012; Fabro et al., 2017). Cada complexo estabelecido pode ainda ser dividido em grupos, compostos por espécies geneticamente semelhantes.

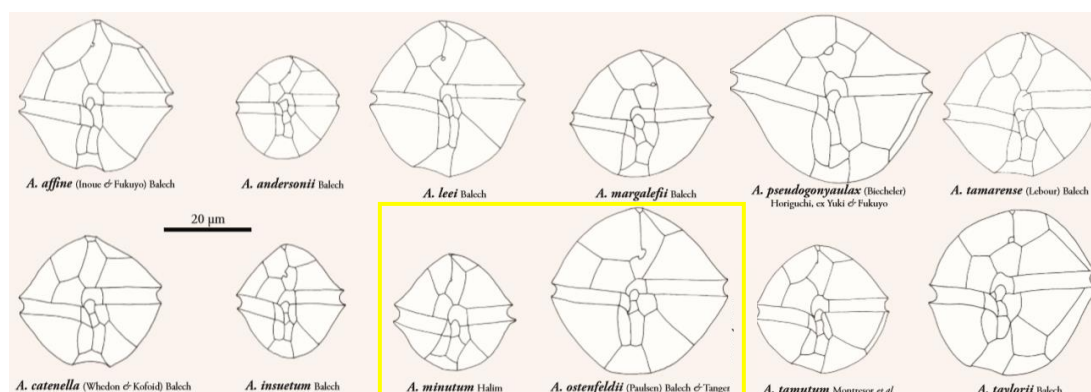


Figura 9 – Comparação morfológica entre algumas espécies do género *Alexandrium*, incluindo as espécies *Alexandrium minutum* e *Alexandrium ostentfeldii* (extraído de Nézan et al., 2010).

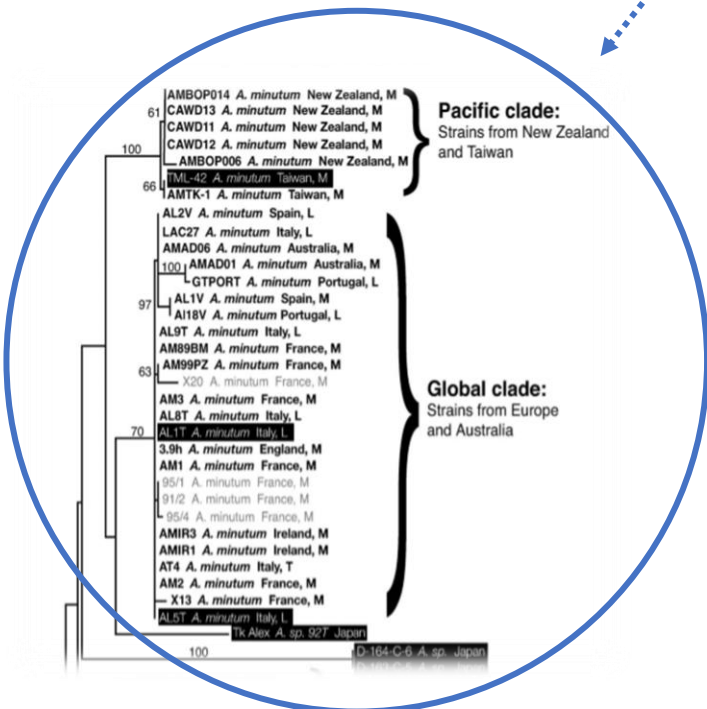
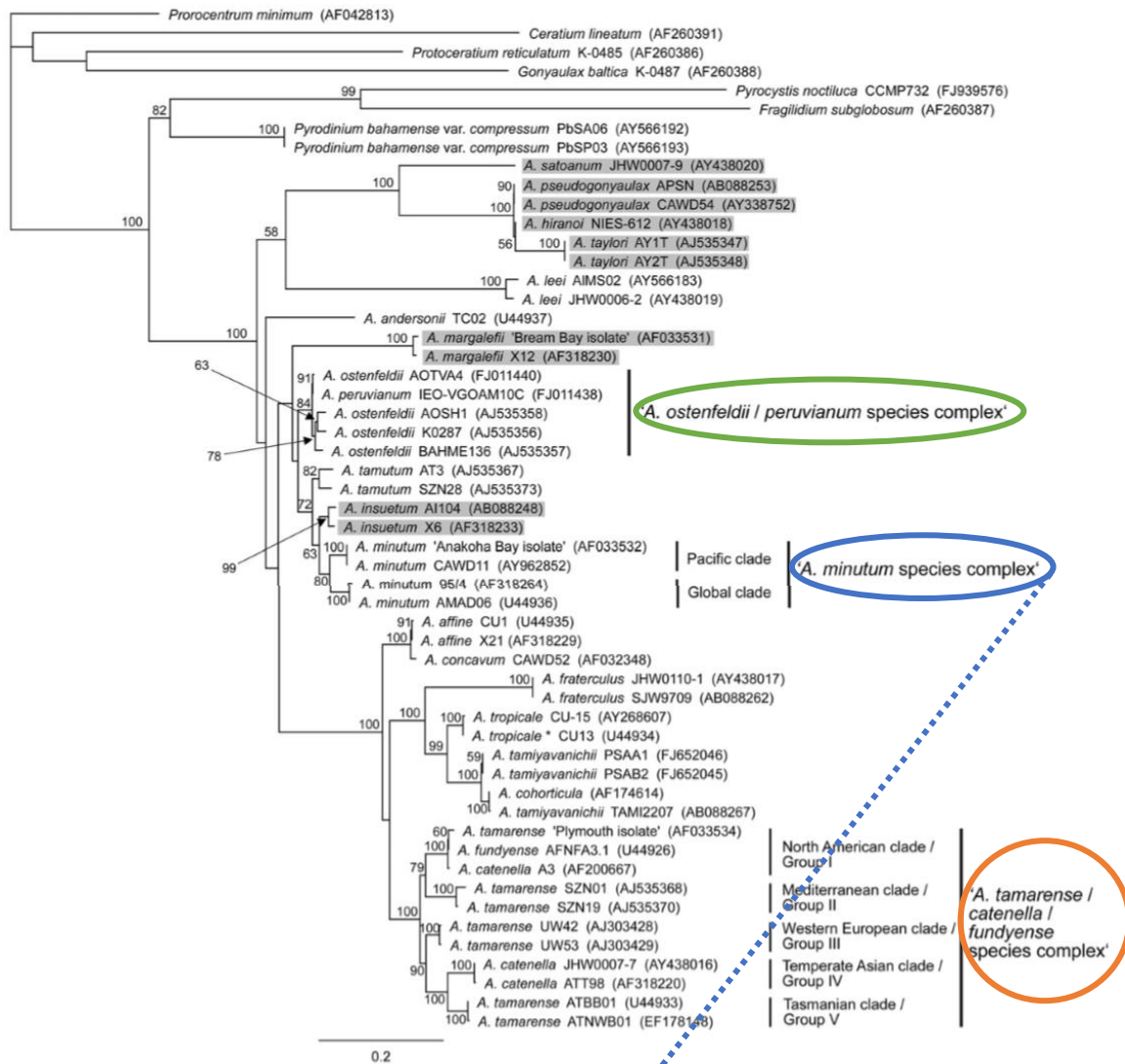


Figura 10 – Árvore filogenética construída a partir das análises de proximidade do rAND da grande subunidade ribossomal (LSU) das espécies do género *Alexandrium*. Os estudos filogenéticos foram realizados por PhyML no programa Geneious 5.4.4 descrito em (Guindon & Gascuel, 2003). Os círculos verde, azul e laranja salientam os complexos *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium minutum* e *Alexandrium tamarense*, respetivamente (adaptado de Lilly et al., 2005; Anderson et al., 2012).

4.4. *Alexandrium minutum*

Alexandrium minutum é uma das espécies tóxicas do género *Alexandrium* que podem originar eventos nocivos de PSP. Esta espécie (descrita, em 1960, após a contaminação das águas portuárias de Alexandria (Egito)) apresenta-se como um pequeno dinoflagelado blindado que possui uma distribuição alargada (**figura 11**) ao longo de vários regimes costeiros enriquecidos – portos, estuários ou lagoas – sobretudo, nas costas mediterrâneas (Halim, 1960; Hallegraef et al., 1988; Belin, 1993; Giacobbe & Maimone, 1994; Tahri-Joutei et al., 2000; Maguer et al., 2000; Yoshida et al., 2000; Vila et al., 2001; Yahia et al., 2001; Usup et al., 2002; Vila et al., 2005).

A. minutum é uma espécie fotossintética de vida livre e com um núcleo elíptico, cujas características morfológicas encontram-se bem descritas no trabalho de Balech (1995). Normalmente, reproduz-se assexuadamente por fissão binária, mas também possui um ciclo de reprodução sexuada, do qual resulta um cisto (Balech, 1989; Hallegraef, 1991; Balech, 1995; Taylor et al., 1995; Steidinger & Tangen, 1996; Hwang et al., 1999).

Como se observa na **figura 12**, *A. minutum* é uma célula esférica ou ligeiramente elipsoidal, com paredes tecais finas, algumas ornamentadas com pequenos poros espaçados entre si e um único poro ventral na 1'.



Figura 11 – Distribuição das microalgas *Alexandrium minutum* (extraído de Lewis et al., 2018)

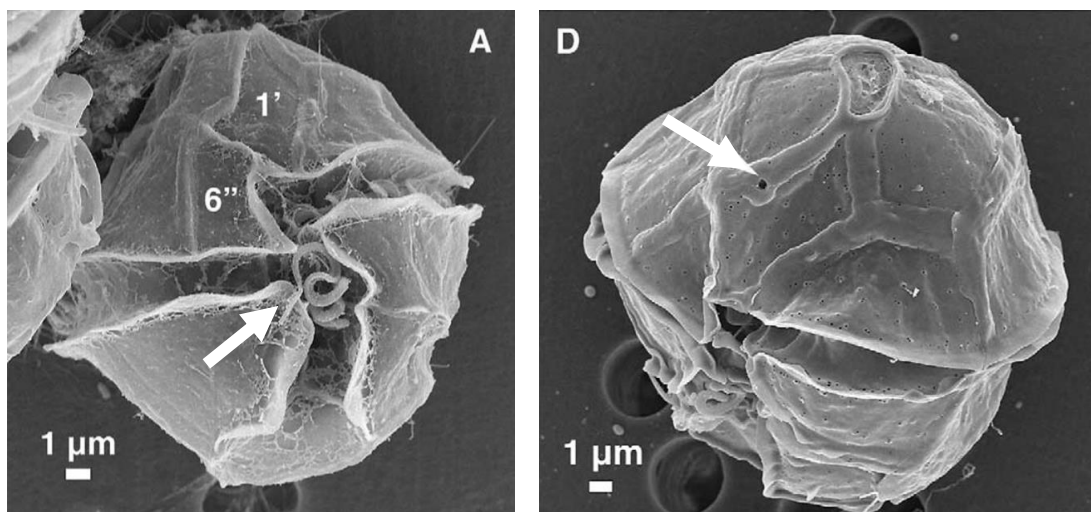


Figura 12 – Imagens de *Alexandrium minutum* ao microscópio eletrónico de varrimento. Setas evidenciam **(A)** o núcleo elíptico e **(D)** o poro ventral na primeira placa apical (extraído de Hansen et al., 2003).

4.5. *Alexandrium ostenfeldii*

Alexandrium ostenfeldii é um dinoflagelado blindado tóxico com uma larga distribuição geográfica em litorais de águas temperadas ou frias por todo o mundo. Esta espécie foi primeiro descrita, em 1904, na costa da Islândia, mas habita preferencialmente na costa oeste da Europa, nomeadamente as costas espanholas (Braarud, 1945; Balech & Tangen, 1985; Fraga & Sánchez, 1985; Moestrup & Hansen, 1988; John et al., 2003b; Kremp et al., 2009; Smithsonian Institute, 2017).

A. ostenfeldii é conhecida por ser a espécie menos toxica de todos as *Alexandrium spp.* e pela sua natureza mixotrofica (isto é, podem tanto ser autotróficas como heterotrófica), assim como, pelas interações aleloquímicas que estabelecem com outros procariontes (Jacobson & Anderson, 1996; Hansen et al., 1992; Gribble et al., 2005; Tillmann et al., 2007).

Morfologicamente são indivíduos singulares (i.e., possuem uma única célula) de tamanho médio (entre 35 a 50 µm de diâmetro), mas podem aparecer em colónia de duas células. As suas paredes tecais são finas com alguns pequenos poros irregularmente distribuídos e um único poro ventral na 1'. Essas paredes ainda são revestidas por uma camada de muco (mucilagem) e o seu núcleo, em forma de U, dispõe-se na região equatorial da célula (Balech & Tangen, 1985; Larsen & Moestrup, 1989; Konovalova, 1993; Balech, 1995; Taylor et al., 1995; Mackenzie et al., 1996; Steidinger & Tangen, 1996; Jensen & Moestrup, 1997).

A reprodução é assexuada, habitualmente por fissão binária, mas também possui um ciclo de reprodução isogâmica – reprodução sexuada que envolve a fusão de gametas morfologicamente semelhantes – da qual resulta um zigoto móvel devido ao flagelo (Jensen & Moestrup, 1997; Dusenbery, 2009). As **figuras 13** e **14** representam algumas das características morfológicas referidas anteriormente.

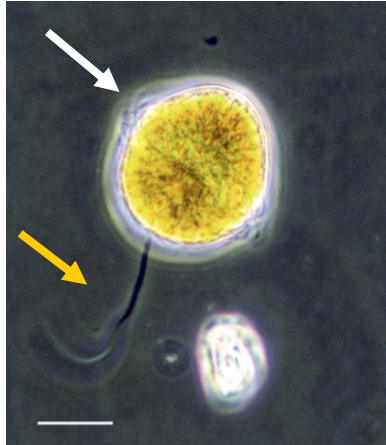


Figura 13 – Célula viva de *Alexandrium ostenfeldii* obtida por microscopia ótica de contraste. Seta branca indica a mucilagem à volta da célula e a laranja evidencia um dos seus flagelos. Barra = 20 μm (extraído de Kremp et al., 2009).

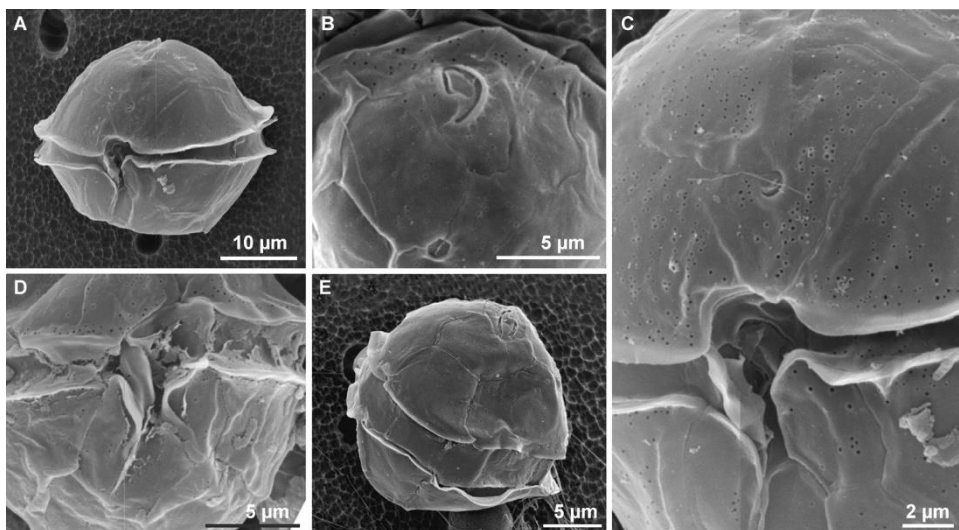


Figura 14 – Células de *Alexandrium ostenfeldii* ao microscópio eletrónico de varrimento, em que se observa (A) a placa tecal ventral, (B) o Po, (C) a 1', (D) as placas sulcais e (E) a placa tecal dorsal (extraído de Almandoz et al., 2014).

4.6. Toxinas

Ao longo da evolução da Terra, as diferentes espécies tiveram que se adaptar e evoluir de maneira a se acomodarem ao meio. Para tal, diversas estratégias e mecanismos de defesa foram adquiridas e/ou adotadas para garantir a sua sobrevivência. Um dos mecanismos foi a produção de toxinas.

Toxinas são um produto natural sintetizado, sobretudo, pelo fitoplâncton (e.g. microalgas e cianobactérias), que podem ter impactos negativos ou mesmo letais sobre outras espécies, como, por exemplo, peixes, bivalves e humanos, através da ingestão subsequente de alimentos ou águas contaminadas (Batoréu et al., 2005; Subirós, 2009; Munday et al., 2013; Vasconcelos, et al., 2014). Os sintomas típicos destas intoxicações passam pela sensação de formiguelo nos lábios, face ou extremidades (dedos das mãos e pés), dores de cabeça, falta de coordenação, e, em casos extremos, insuficiência respiratória (o que pode levar à morte) pelo que, estas toxinas são habitualmente classificadas conforme a sua sintomatologia: PSP; intoxicação diarreica causada por moluscos (DSP);

intoxicação amnésica causada por moluscos (ASP); intoxicação neurotóxica causada por moluscos (NSP) e intoxicação ciguatérica causada pelo consumo de peixes (CFP).

Contudo, com a descoberta de novas espécies tóxicas e os avanços na biologia molecular, investigadores da FAO/Woods Holes Oceanographic Institution/Intergovernmental Oceanographic Commission of United Nations Educational, Scientific, and Cultural Organization (FAO/WHO/IOC-UNESCO) recomendaram, em 2004, a reclassificação destas toxinas em função da sua estrutura química, resultando nos grupos tóxicos indicado na **tabela 9** (Toyofuku, 2006; Subirós, 2009; Vasconcelos, et al., 2014).

Tabela 9 – Classificação das toxinas mais comuns (adaptado de WHO, 1999; Hallegraef, 2003; Codd et al., 2005; Naves, 2008; Demirel & Sukatar, 2012; Vilariño et al., 2013; Zanchett & Oliveira-Filho, 2013).

Toxinas	Origem	Distribuição	Espécies características	Efeitos
Ácido domóico	Diatomáceas	Global	<i>Pseudo-nitzschia australis</i> <i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	Estimulador dos recetores de glutamato
Ácido ocadaico	Dinoflagelados	Global	<i>Dinophysis acuminata</i> <i>Prorocentrum lima</i> <i>Prorocentrum rhathymum</i>	Inibidor de proteínas do tipo fosfatases
Anatoxinas	Cianobactérias	Global	<i>Anabaena circinalis</i> <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> ; <i>Microcystis spp.</i> <i>Planktothrix sp.</i>	Inibição irreversível da acetilcolinesterase
Azaspirácidos	Dinoflagelados	Global	<i>Protoperidinium crassipes</i>	Sob investigação
Brevetoxinas	Dinoflagelados	México; Estados Unidos da América; Nova Zelândia	<i>Gymnodinium breve</i> <i>Karenia brevis</i> <i>Ptychodiscus brevis</i> <i>Trichodesmium spp.</i>	Abertura dos canais de Na ⁺
Ciguatoxinas	Dinoflagelados	Águas tropicais e subtropicais	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	Abertura dos canais de Na ⁺
Cilindrospermopsinas	Cianobactérias	Global	<i>Aphanizomenon ovalisporium</i>	Síntese da proteína glutatona
lessotoxinas	Dinoflagelados	Global	<i>Prorocentrum gracile</i> <i>Prorocentrum mexicanum</i>	Ativação de fosfodiésteres
Iminas cíclicas (Espirolidos)	Dinoflagelados	Global	<i>Alexandrium ostenfeldii</i>	Inibidor dos recetores da acetilcolina nicotínica
Microcistinas	Cianobactérias	Global	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis viridis</i> <i>Anabaena sp.</i> <i>Oscillatoria agardhii</i>	Inibidor de proteínas do tipo fosfatases
Palitoxinas	Corais Dinoflagelados Esponjas	Águas tropicais e subtropicais	<i>Ostreopsis spp.</i>	Abertura dos canais Na ⁺ /K ATPase
Pectenotoxinas	Dinoflagelados	Global	<i>Dinophysis spp.</i>	Ligação à actina
Saxitoxinas	Dinoflagelados Cianobactérias	Global	<i>Alexandrium minutum</i> <i>Gymnodinium catenatum</i> <i>Pyrodinium bahamense</i>	Bloqueio dos canais de Na ⁺ (dos axónios)

Dentro das cinco mil (5000) espécies de microalgas que compõem o fitoplâncton, apenas 1% tem a capacidade de libertar (neuro)toxinas. Todavia, todos os anos, são reportados casos de intoxicações por parte destes microrganismos com consequências graves a nível económico, ambiental e na saúde, resultantes das perdas significativas de peixes, aves, mamíferos marinhos (ao longo das costas) ou mesmo de humanos (Van Dolah, 2000; Daranas et al., 2001; Landsberg, 2002; Scatasta et al., 2003; Shumway et al., 2003; Van Dolah et al., 2003; Hoagland & Scatasta, 2006; Molgó et al., 2007; Subirós, 2009). Os dinoflagelados dos géneros *Gymnodinium*, *Pyrodinium* e *Alexandrium* são as microalgas com o maior número de espécies tóxicas, sendo as *Alexandrium spp.* o género com a maior variedade de toxinas marinhas: PSP, saxitoxinas e imina cíclicas (IC) de rápida ação, como os espirolides. (Batoréu et al., 2005; Subirós, 2009; Jaeckisch et al., 2011; Cusick & Saylor, 2013; Gu et al., 2013; Qiu et al., 2018).

Neste trabalho de dissertação iremos desenvolver métodos analíticos baseados em genossensores para capazes de detetar quatro espécies do género *Alexandrium* – *Alexandrium minutum*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Alexandrium tamarense* e *Alexandrium insuetum* – pelo qual mencionamos sucintamente as IC de ação rápida, as STX, as espirolides e as PSP.

4.6.1. Iminas cíclicas de ação rápida

As IC de ação rápida compõem um grupo de toxinas formadas por um conjunto heterogéneo de compostos macrocíclicos que apresentam um radical imina – grupo funcional produto de uma reação de condensação, cuja estrutura geral é $RR'C=NR''$, em que o radical R'' pode ser um hidrogénio ou um grupo orgânico (Moss et al., 1995; Subirós, 2009).

As principais toxinas que constituem este grupo são as gimnodiminas, espirolidos, pinatoxinas, pteriatoxinas, prorocontrolidos e as espiro-prorocontrolinas (Subirós, 2009). Porém, só são mencionados os espirolides – toxina exclusiva das *A. ostenfeldii*.

4.6.1.1. Espirolidos

Os espirolidos são neurotoxinas que, até à data, foram encontradas exclusivamente na microalga dinoflagelada *A. ostenfeldii*. Esta toxina foi descoberta acidentalmente em 1991, na leitura de falsos positivos de testes de controlo de toxinas lipofílicas de rotina no Canadá e, desde então, este foram detetadas em moluscos de todo o mundo (Richard et al., 2001; Aasen et al., 2006; Subirós, 2009).

O seu nome “espirolidos” provém do espiro-átomo que une o anel cíclico dos (sete) membros que possuem o radical imina ao cicloexano e ao sistema cíclico triéster. Atualmente esta toxina possui doze análogos – espirolidos A, B, C, D, E, F, G, 13-desmetil C, 13,19-didesmetil C, 27-hidroxi-13,19-didesmetil C, 13-desmetil D e 20-metil G – sendo o 13-desmetil C o análogo mais conhecido, cuja estrutura química está representado na **figura 15** (Hu et al., 1995; Hu et al., 1996; James et al., 2000; Hu et al., 2001; Aasen et al., 2005; Cembella et al., 2008; Subirós, 2009).

Este tipo de toxina atua como um inibidor dos recetores colinérgicos muscarínicos (recetores acoplados à proteína G nas terminais neuromusculares), o que resulta no bloqueio da transmissão de estímulos nervosos, inibindo a ligação à acetilcolina e, recentemente, acredita-se que também possam atuar sobre os recetores colinérgicos nicotínicos (Richard et al., 2001; Gill et al., 2003; Brunton et al., 2012; Aasen et al., 2006; Subirós, 2009).

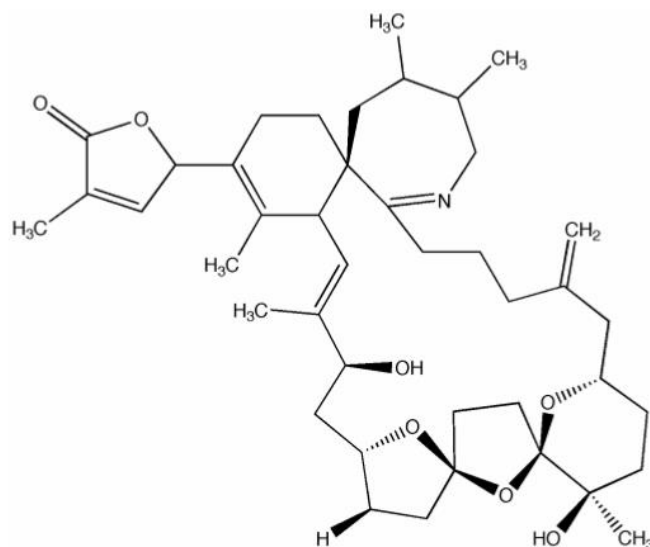


Figura 15 – Estrutura química da 13-desmetil C.

4.6.2. Saxitoxinas

A STX são uma neurotoxina com poder analgésico, produzida por alguns dinoflagelados (e.g. *Alexandrium catenella*, *Alexandrium tamarense*, *Alexandrium minutum*, *Alexandrium ostenfeldii*, *Gymnodinium catenatum*, *Pyrodinium bahamense*, entre outros) e cianobactérias (como, por exemplo, *Cylindropermopsis raciboskii*, *Anabaena circinalis*, *Lyngbya wollei*, etc...) (Hansen et al., 1992; Laycock et al., 1994; Onodera et al., 1997; Lagos et al., 1999; Ferreira et al., 2001; Ciminiello et al., 2003; Hallegraef, 2003; Negri et al., 2003; Beppu et al., 2008; Subirós, 2009).

Esta toxina atualmente agrupa mais de 50 derivados, isto é, compostos quimicamente relacionados, encontrados na natureza que coletivamente são conhecidos como PSP, visto que atua principalmente sobre o canal de sódio (Na^+) dependente do potencial elétrico das células nervosas e musculares, onde se ligam (com elevada afinidade) e impedem a transmissão do impulso nervoso, inibindo, assim, a passagem de íons através do canal. A interrupção deste impulso conduz à paralisia respiratória e, se não tratada, à morte do indivíduo infetado (Cusick & Slayer, 2013; Thottumkara et al., 2014; Vasconcelos, et al., 2014).

Para além do canal de Na^+ , a saxitoxina também pode interagir com os canais de potássio (K^+) – neste caso, em vez de impedir a transmissão do impulso, ela modifica o canal, despolarizando-o, o que faz com que ele permaneça aberto – e com o canal do cálcio (Ca^{2+}), parcialmente inibindo-o, pois, ao contrário do que ocorre com o canal de Na^+ , a saxitoxina não consegue interromper completamente a transmissão dos impulsos pelos canais de Ca^{2+} (Cusick & Slayer, 2013; Vasconcelos, et al., 2014). A **figura 16** mostra a estrutura geral de uma saxitoxina.

Entre 1970 e 1990, as HAB cuja composição maior eram os dinoflagelados do género *Alexandrium*, apenas ocorriam nas águas europeias, da América do Norte e do Japão, porém nas últimas décadas estes eventos têm vindo a amplificar-se, tanto em densidade como em dispersão geográfica, como se observa na **figura 17** (Miotto, 2011; Vasconcelos, et al., 2014).

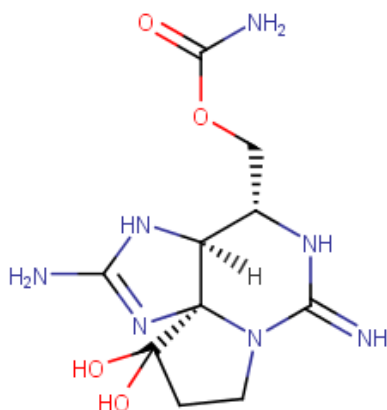


Figura 16 – Estrutura química da saxitoxina.

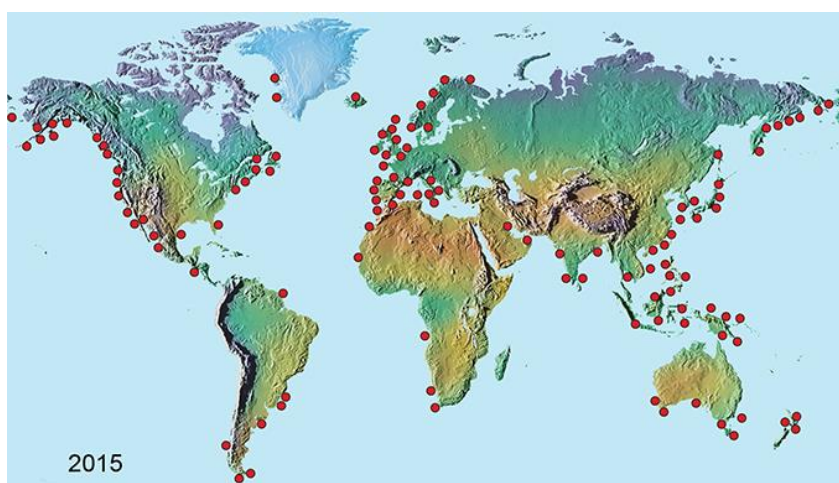


Figura 17 – Distribuição global dos casos relatados de intoxicações por saxitoxinas, especificamente as intoxicações paralíticas causadas por moluscos, em 2015. Os pontos vermelhos indicam as regiões onde ocorrem os surtos (extraído de Harmful Algae, 2017).

4.6.2.1. Intoxicações parálítica causada por moluscos

As PSP são derivadas de saxitoxinas alcaloides produzidas por algumas algas microscópicas tóxicas, como é o caso das diatomáceas e dos dinoflagelados (sobretudo, do género *Alexandrium*), e ainda por cianobactérias durante as HAB. Estas neurotoxinas, primeiro descritas em 1975, apresentam cerca de 21 compostos diferenciados e são reconhecidas como uma das quatro toxinas resultantes das intoxicações por moluscos, isto é, por bivalves como os mexilhões, ameijoas, berbigões, ostras e vieiras (Bower et al., 1981; Clark et al., 1999; Davidson et al., 2011; Alaska, 2012; Sing, 2017).

Estas toxinas são indicadas globalmente como uma doença perigosa resultante do consumo de marisco contaminado (Clark et al., 1999; Alaska, 2012). A contaminação destes seres advém do seu metabolismo; visto que todos os bivalves mencionados são filtradores, ao ingerirem as microalgas e cianobactérias presentes na água vão acumulando as toxinas no seu organismo. Assim sendo, a grande preocupação com a sua contaminação deve-se ao seu consumo, uma vez que podem provocar efeitos nefastos ou mesmo letais a humanos e a outros animais (e.g. caranguejos, peixes e aves marinhas) (Acres & Gray, 1978; Clark et al., 1999; Backer & McGillicuddy, 2006; Alaska, 2012; Brosnahan et al., 2014; Sing, 2017).

Os primeiros sintomas de intoxicação incluem formigamento nos lábios e língua, minutos ou mesmo umas horas após ingestão, que pode progredir num formigamento nas extremidades do corpo (dedos das mãos e pés) e, se não tratado imediatamente, avançará para os sintomas mais comuns das PSP, nomeadamente a perda de sensibilidade nos braços e pernas, tonturas, fraqueza, sonolência, fala incoerente, dores de cabeça e, a mais grave, dificuldades em respirar. Existem ainda casos reportados de pessoas que se sentiram leves (i.e., ficaram com a sensação de estarem a flutuar) e com náuseas. Todos os sintomas anteriores foram descritos para indivíduos expostos a concentrações baixas a moderadas de PSP. Porém, quando um mamífero, como um humano, ingere uma dose elevada destas toxinas a morte ocorre em pouco mais de duas horas (2h) devido à paralisia dos pulmões (Acres & Gray, 1978; Backer & McGillicuddy, 2006; Alaska, 2012; Sing, 2017).

Alguns dos dinoflagelados do género *Alexandrium* conhecidos por libertarem toxinas tipo PSP são: *A. catenella*, *A. fundyense*, *A. tamarense*, *A. ostenfeldii* e a espécie *A. minutum* (que é alvo de estudo neste trabalho). Na **figura 18** observa-se a estrutura geral de uma PSP.

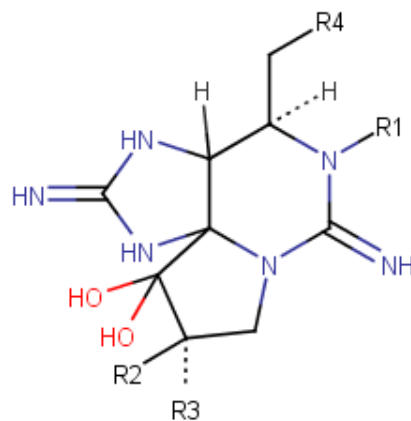


Figura 18 – Estrutura geral da PSP.

Todas as toxinas mencionadas aparecem em Portugal com maior frequência do que se esperaria. Para garantir a segurança das águas e dos alimentos de origem aquática colhidos para o consumo humano, o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) e o Sistema Nacional de Monitorização de Moluscos e Bivalves (SNMB) realizam, mensalmente, testes de controlo às águas do território português. Os resultados dessas análises encontram-se disponíveis no site do IPMA sobre duas vertentes: (i) quantidade de biotoxinas marinhas encontradas em organismos (moluscos e bivalves) por região de produção (<http://www.ipma.pt/pt/bivalves/biotox/>) e; (ii) quantidade de fitoplâncton nocivo por zona de produção (<http://www.ipma.pt/pt/bivalves/fito/>).

Os resultados da quantificação do fitoplâncton nocivo, por exemplo, são obtidos pelo método de Utermohl – método de quantificação baseado na contagem dos organismos presentes num volume conhecido. Ora, testes mensais, realizados através da contagem de microrganismos numa câmara de contagem, ao longo de todo o território português são demorados, pelo que os biossensores tornam-se uma boa alternativa para identificar e quantificar os organismos potencialmente nocivos que vão aparecendo por Portugal.

5. Biossensores

Biossensores são dispositivos analíticos capazes de reconhecer e converter as reações (bio)químicas de moléculas biológicas – normalmente enzimas, anticorpos, peptídeos, ácidos nucleicos, entre outros – ou mesmo por microrganismos e células inteiras, designado elemento de bioreconhecimento ou biorreceptor, num sinal mensurável, obtendo-se informações semi- ou quantitativas do meio (Theâvenot et al., 1999; Nascimento et al., 2012; Hayat et al., 2014; Sin et al., 2014; Bhalla et al., 2016).

O princípio fundamental de um biossensor baseia-se na conversão de uma resposta analítica, obtida através das ações biológicas de varias substâncias, num signal quantificável. Para tal, o analito liga-se ao biorreceptor imobilizado, por métodos convencionais (lgações covalentes, não-covalentes ou adsorção física) ao elétrodo, o que produz uma resposta eletrônica que é convertido num sinal elétrico, amplificado e depois quantificado. Os sinais obtidos são registados e transferidos para um dispositivo de armazenamento de dados e, posteriormente, processados (Grieshaber et al., 2008; Hayat & Marty, 2014a). O desempenho do biossensor depende maioritariamente da sua especificidade e sensibilidade à reação biológica, além da estabilidade da biomolécula.

A vantagem destes dispositivos, em relação a todas as outras técnicas de deteção é que podem ser miniaturizados, permitindo análises em tempo real e *in situ*, para além de serem mais sensíveis, seletivos, fáceis de manusear e sem a necessidade de pessoal especializado (Luz et al., 2013; Alves et al., 2016; Malhotra et al., 2017).

5.1. Constituintes de um biossensor

Os biossensores são constituídos essencialmente por uma componente biológica – o sistema de reconhecimento molecular – o transdutor e a unidade processadora de sinal, conforme o esquema da **figura 19** (Lee et al., 2008; Bhalla et al., 2016). A finalidade destes sensores é identificar/quantificar um analito com o mínimo de intervenção humana.

A componente biológica corresponde ao analito – substância de interesse a detetar (e.g. glucose, sangue, urina, etc...) – e ao bioreceptor – molécula que reconhece especificamente o analito (e.g. enzimas, células, aptâmeros, ADN e anticorpos). O processo de aquisição de sinal (sob a forma de luz, calor ou variação de pH, carga, massa, etc.), é designado de bioreconhecimento e resulta da interação dos bioreceptores com os analitos, visto que esses reagentes são imobilizados no sistema (Pathak et al., 2007; Chambers et al., 2008; Lee et al., 2008; Bhalla et al., 2016).

O transdutor funciona como uma interface, pois é o segmento de um biossensor que converte (medindo as variações físicas ou químicas que ocorrem durante a interação entre o analito com o biorreceptor) o evento do bioreconhecimento num sinal (de massa, carga, calor ou luz) mensurável – processo conhecido como sinalização. A maioria dos transdutores produzem sinais óticos ou elétricos que geralmente são proporcionais à concentração de analito. Enquanto a unidade processadora atua como um detetor que filtra, amplia e analisa o sinal obtido (pelo transdutor). Esta unidade é composta por circuitos eletrônicos complexos que convertem o sinal análogo num digital e, posteriormente, o transfere para um monitor ou armazena-no no computador (Raiteri et al., 2002; Pathak et al., 2007; Bhalla et al., 2016).

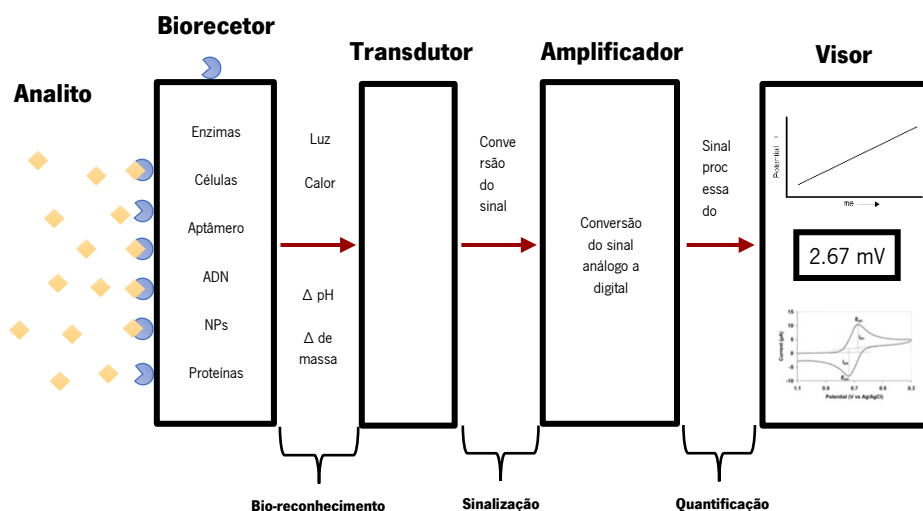


Figura 19 – Esquema de um biossensor (adaptado de Bhalla et al., 2016).

5.2. História dos biossensores

O conceito de biossensor não é recente. Há anos que os biossensores têm sido estudados como uma técnica alternativa aos métodos tradicionais (e.g. microscopia de fluorescência, FISH, espectroscopia, cromatografia, PCR, biologia molecular, etc...) para a análise de analitos (Nascimento et al., 2012; Hayat et al., 2014; Bhalla et al., 2016).

O primeiro biossensor comercial foi desenvolvido em 1975, pela empresa Yellow Spring Instruments. Porém, antes da sua construção foram propostas e testadas os princípios por detrás destes dispositivos. Estes fundamentos remetem-nos para 1906 quando M. Cremer demonstrou que a concentração de um ácido num líquido é proporcional ao potencial elétrico que surge entre partes do fluido localizado em lados opostos numa membrana de vidro e 1922 quando Griffin e Nelson imobilizaram enzimas invertidas sob hidróxido de alumínio e carvão (Cremer, 1906; Griffin & Nelson, 1916; Nelson & Griffin, 1916; Bhalla et al., 2016).

No entanto, o primeiro “verdadeiro” biossensor só foi desenvolvido em 1956 por L.C. Clark, Jr. com a finalidade de detetar O_2 (Heineman & Jensen, 2006). A partir desta data e com o desenvolvimento das novas tecnologias foram construídos e otimizados inúmeros sensores com diversos fins, pois para além de proporcionarem melhores meios para o diagnóstico clínico, não só pela especificidade na deteção do evento, como também, pela sua rapidez na tradução do sinal, estes dispositivos apresentam ainda uma maior versatilidade e sensibilidade na tradução dos eventos e sinais (Alves et al., 2016; Bhalla et al., 2016).

5.3. Tipos de biossensores

Ao longo dos anos, foram desenvolvidos vários tipos de biossensores, todos eles com fins muito variáveis, podendo-se considerar três grandes grupos conforme o transdutor utilizado: os biossensores (i) óticos, (ii) eletroquímicos e (iii) piezoelétricos (ou de massa), como se verifica na **figura 20**.

Dentro destes três grupos de transdutores, o eletroquímico é o mais atraente para a monitorização e diagnósticos clínicos, devido ao seu reduzido/moderado custo, à simplicidade, estabilidade, alta sensibilidade e portabilidade (Gaua et al., 2005; Song et al., 2006).

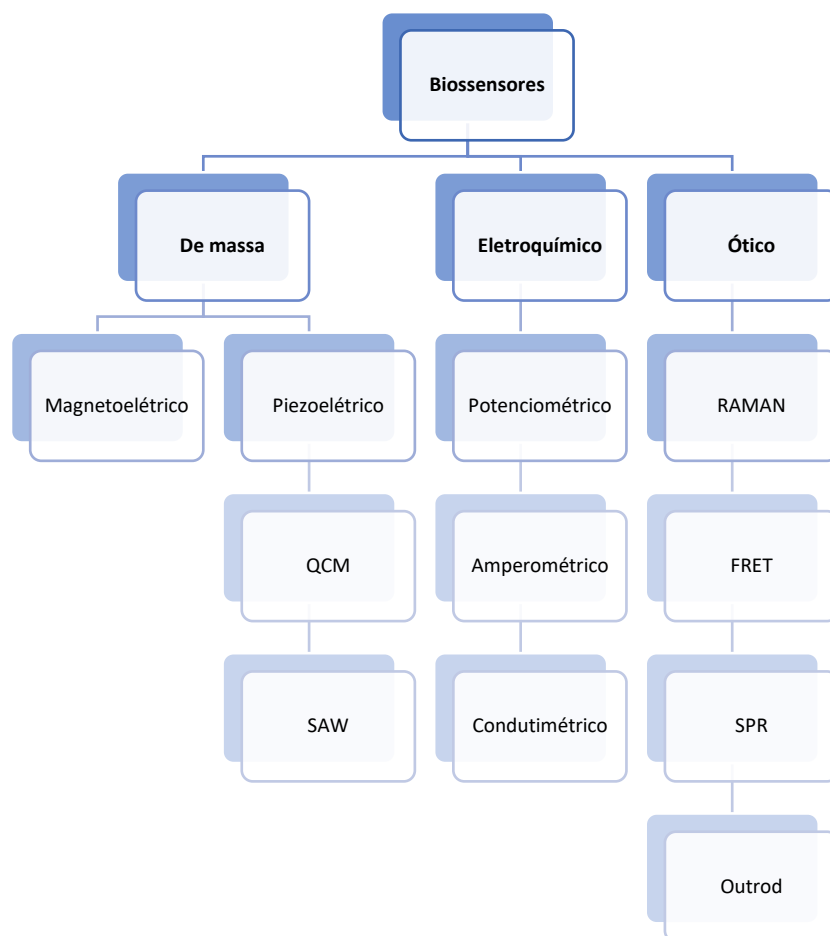


Figura 20 – Classificação do biossensor segundo os transdutores (adaptado de Malhotra et al., 2017).

5.4. Aplicações dos biossensores

Com o desenvolvimento de novas tecnologias e materiais surgiram novos métodos de funcionalização e miniaturização de componentes, o que permitiu a criação de dispositivos mais complexos e sensíveis com uma grande variedade de aplicações em diversas áreas – monitorização ambiental, deteção de doenças, segurança alimentar, análise e desenvolvimento de fármacos, entre outros – todas elas dedicadas a melhorar a qualidade da vida humana (Van Dorst et al., 2010; Monteiro, et al., 2011; Sharma et al., 2015; Bhalla et al., 2016).

O exemplo mais comum é a utilização de biossensores de glucose para monitorizar os níveis glicémicos dos diabéticos, mas o mercado tem expandido e possibilitado a utilização de biossensores no processamento industrial. Por exemplo, na segurança alimentar os biossensores podem servir de plataformas para avaliar a qualidade, validade e valor nutricional de alimentos (Bhalla et al., 2016; Malhotra et al., 2017).

Todavia, a área da saúde é o setor em que os biossensores são mais aplicados, sendo a detecção de biomoléculas como indicador de doenças ou alvos para fármacos. As técnicas eletroquímicas são um ótimo exemplo da utilização de biossensores para o diagnóstico clínico (Formisano et al., 2015; Jolly et al., 2015a; Jolly et al., 2015b; Bhalla et al., 2016).

6. Genossensores

Genossensores (também conhecidos por biossensores de ADN) são dispositivos analíticos que detetam, com uma elevada eficiência e especificidade, a sequência alvo durante a reação de hibridação entre duas cadeias polinucleotídicas complementares (Teles & Fonseca, 2008; Tosar et al., 2010; Palecek & Bartosík, 2012; Alves et al., 2016). Estes aparelhos são adequados para realizar diagnósticos clínicos e ambientais e ainda servem como plataformas multiplexas para a análise de ácidos nucleicos de uma forma rápida, simples e de baixo custo (Tosar et al., 2010).

No início do século XXI, os genossensores prometem ser uma ferramenta eficaz para a obtenção de informações específicas da sequência analisada, em comparação aos métodos tradicionais de hibridização, contribuindo para a revolução tecnológica na área da saúde (Wang, 2000b; Tosar et al., 2010).

Os métodos convencionais para a análise de genes específicos são realizados ora por sequenciação direta ou através de hibridização de ADN, porém, devido à sua simplicidade, a utilização das reações de hibridação são preferidas para o diagnóstico clínico. Neste caso, uma das sequências de ADN atua como uma “sonda de captura” capaz de reconhecer seletivamente uma cadeia de ácido ribonucleico (ARN) ou ADN complementar, pelo que a especificidade do genossensor é inteiramente dependente das propriedades do elemento de bioreconhecimento (Bora et al., 2013; Alves et al., 2016).

Segundo o relatório de 2010 da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), as moléculas de ADN, ARN e ácido nucleico peptídico (ANP) – todos eles aptâmeros de ácidos nucleicos – que podem atuar como o elemento de bioreconhecimento. Contudo, entre estas três moléculas, o aptâmero de ADN apresenta uma cadeia mais simples e é altamente reproduzível, tem maior estabilidade quando exposta a uma larga variedade de condições/parâmetros pois possuem uma maior resistência à desnaturação e de fácil síntese. Para além da sua elevada estabilidade, os aptâmeros também apresentam uma maior afinidade e especificidade por ligandos – como os iões e pequenas moléculas – que não são reconhecidos por outros elementos de bioreconhecimento (Labuda et al., 2010; Palecek & Bartosík, 2012; Bora et al., 2013).

A versatilidade das técnicas eletroquímicas facilita tanto a análise estrutural dos ácidos nucleicos bem como a sua detecção a baixas concentrações (Palecek & Bartosík, 2012). Nesse sentido, o registo analítico do sinal eletroquímico pode ocorrer de duas maneiras: (i) pela medição direta da resposta elétrica das cadeias de ADN ou (ii) pela monitorização dos compostos (indicadores ou intercaladores redox) unidos à dupla hélice do ADN (Pedrero et al., 2011).

Assim, a construção e desenho de um genossensor eletroquímico envolve essencialmente cinco etapas: (i) a seleção e desenho de sequências específicas de ADN, (ii) a seleção do eletrodo, (iii) a imobilização da sonda de ADN de captura, (iv) a hibridação da cadeia complementar de ADN e a (v) a detecção do sinal eletroquímico (Pividori et al., 2000; Lucarelli et al., 2004).

A **figura 21** exemplifica o esquema geral dos passos necessários para a montagem de um genossensor.

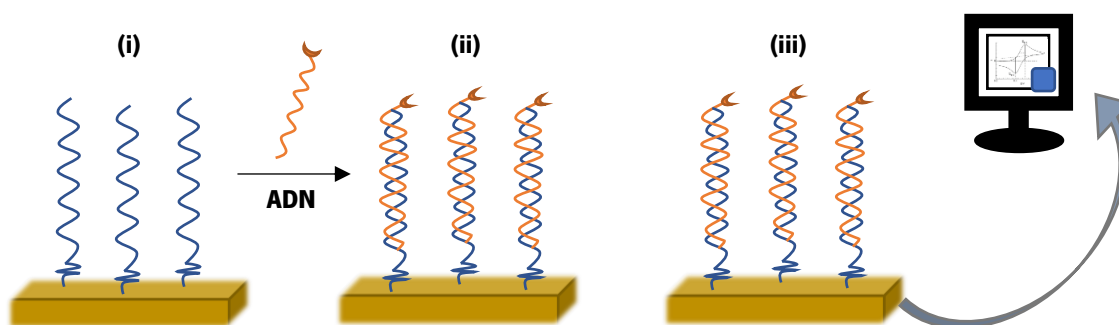


Figura 21 – Esquema geral da montagem de um genossensor. (i) imobilização da sonda de ADN numa superfície metálica; (ii) hibridização da cadeia complementar de ADN; (iii) deteção do sinal (adaptado de Manzanares-Palenzuela et al., 2015).

7. Design do genossensor

Para construir um genossensor eletroquímico capaz de detetar e identificar as microalgas e cianobactérias existentes nas águas de aquacultura são necessárias várias etapas laboratoriais.

7.1. Seleção e desenho do elemento de bioreconhecimento

Qualquer biossensor tem como finalidade o reconhecimento molecular. Nos genossensores os ácidos nucleicos, especialmente o ADN, são o elemento de reconhecimento. A escolha da sequência depende do fim a que se destina o sensor (quantificação, monitorização, etc...) e da espécie em estudo. Portanto, a primeira etapa consiste na seleção das sequências de ADN ou ARN características do organismo de interesse, uma vez que cada ser possui um código genético único. Contudo, para cada população, existe uma sequência de nucleótidos que é característica da sua espécie ou estirpe (Bryce & Pacini, 1998; He et al., 2007; Dahm, 2008; Ozsoz, 2012; Paniel, et al., 2013).

Uma vez que imobilizar todo o ADN genómico à superfície de um elétrodo torna-se quase impossível (devido ao seu grande tamanho e aos problemas associados ao bloqueio do sinal analítico) torna-se fundamental seleccionar sequências de ADN (dentro do ADN genómico) com um número de pares de bases (pb) a variar entre 70 a 120 pb que, de forma inequívoca, identifiquem o organismo pretendido, por exemplo estirpes de microalgas ou cianobactérias (Farré & Barceló, 2003).

Com base nas informações disponíveis em bases de dados públicas (e.g. The National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) é possível seleccionar e desenhar sequências específicas de ADN (cerca de 70 a 150 nucleótidos) que permitam a deteção seletiva de determinada estirpe de microrganismos, nomeadamente microalgas e cianobactérias (Barata, 2017). Com recurso a este tipo de bases de dados torna-se, também, possível estudar a influência do tamanho da sequência de ADN e/ou ARN e das estruturas secundárias existentes no desenho e construção dos genossensores.

Os ácidos nucleicos em forma de aptâmeros é adequado para o reconhecimento de alvos específicos ou células inteiras, enquanto as sondas de ADN de cadeia simples (ssADN) hibridizam a sequências genómicas específicas (Paniel, et al., 2013; Manzanares-Palenzuela et al., 2015). Portanto, neste trabalho, recorreu-se a ssADN para detetar a hibridização das espécies de *Alexandrium*.

7.2. Seleção do eletrodo

Entre os transdutores eletroquímicos, os eletrodos de ouro (Au) e de carbono têm sido frequentemente aplicados no desenho dos genossensores. Os eletrodos de carbono são usados por causa do seu vasto potencial e graças à sua resistência a altas temperaturas e a produtos químicos (adquiridos quando se combina das propriedades do carbono com as da grafite). No entanto, os eletrodos de Au são os mais utilizados nos estudos e construção de genossensores, pois fornecem uma superfície mais estável para a imobilização altamente organizada de compostos tiolados, podendo originar monocamadas auto-organizadas (SAM) (Jiang et al., 2011; Mix et al., 2012; Yang et al., 2012; Sun et al., 2013; Sun et al., 2014; Bonanni et al., 2009; Manzanares-Palenzuela et al., 2015).

7.3. Imobilização da cadeia simples de ADN captura

A imobilização do ADN à superfície do eletrodo é o primeiro passo para a construção de um genossensor e a mais importante para o seu bom desempenho. Dependendo do tipo de transdutor, da biomolécula em estudo e da aplicação do biossensor, os métodos utilizados para a imobilização do ADN variam, alterando também as condições e as variáveis experimentais a utilizar (Cassidy et al., 1998; Labuda et al., 2010; Ozsoz, 2012).

As superfícies das plataformas dos sensores (i.e. dos eletrodos) também podem variar na sua composição. Como se referiu, as mais usuais são as superfícies de carbono (nomeadamente as de grafite) e as de Au que, normalmente, são modificadas com nanomateriais (nanotubos de carbono) ou nanopartículas (NP) de Au para aumentar a seletividade e sensibilidade da metodologia (Labuda et al., 2010; Ozsoz, 2012).

Alguns dos métodos desenvolvidos para a imobilização da sonda sobre a superfície do eletrodo são a: (i) adsorção (física ou química); (ii) a ligação por afinidade e (iii) ligação covalente (Labuda et al., 2010; Ozsoz, 2012).

7.3.1. Adsorção

A adsorção é o método mais simples para a imobilização das sequências nucleicas sob as superfícies das plataformas. Esta técnica não requer reagentes nem modificações específicas ou complexas aos ácidos nucleicos para a sua fixação. As desvantagens associadas a este método são a probabilidade de os ácidos nucleicos desorganizarem-se durante a hibridização e a absorção a múltiplos locais no eletrodo, o que diminui a eficiência do processo (Rasmussen et al., 1991; Pividori et al., 2000; Ozsos, 2012).

7.3.1.1. Monocamadas auto-organizadas

Quase todas as superfícies podem ser imobilizadas com monocamadas funcionalizadas que possuem as propriedades elétricas, óticas ou químicas específicas e necessárias para a detecção dos bioreactores em estudo. Uma monocamada ideal foi descrita como cadeias alcalinas perfeitamente alinhadas e empacotadas, fixas sobre uma superfície sólida lisa (Wink et al., 1997). Ora a utilização de monocamadas auto-organizadas (SAM do inglês self-assembled monolayer) é uma técnica capaz de fixar monocamadas orientadas e ordenadas sobre uma superfície.

SAM é a designação atribuída a estruturas orgânicas formadas e organizadas espontaneamente pela adsorção de constituintes moleculares sobre uma superfície sólida, em domínios ordenados. As moléculas ou ligantes que formam as SAM possuem “cabeças” com afinidade para o substrato por onde se ligam, por exemplo, a metais, óxidos metálicos ou semicondutores específicos e cujas propriedades, nomeadamente a composição dos seus componentes moleculares, é determinante para a orientação das cadeias à superfície (Love et al., 2005). A **figura 22** esquematiza a adesão e organização de uma SAM sobre uma superfície de Au.

As SAM são frequentemente usadas nos estudos de nanociências e de biossensores, pois (i) são fáceis de preparar (uma vez que não requerem técnicas nem equipamentos especializados); (ii) fixam-se em objetos de todas as dimensões e são componentes críticos na estabilização e na adição de funcionalidades a outras nanoestruturas; (iii) conseguem acoplar o ambiente externo às propriedades elétricas e óticas de estruturas metálicas e (iv) ligam estruturas a nível molecular a fenómenos interfaciais macroscópicos (Wink et al., 1997).

Portanto, para uma maior seletividade do sensor recorre-se a SAM com estruturas/cadeias derivadas da adsorção química (quimioadsorção) de alcaloides em Au (Wink et al., 1997).

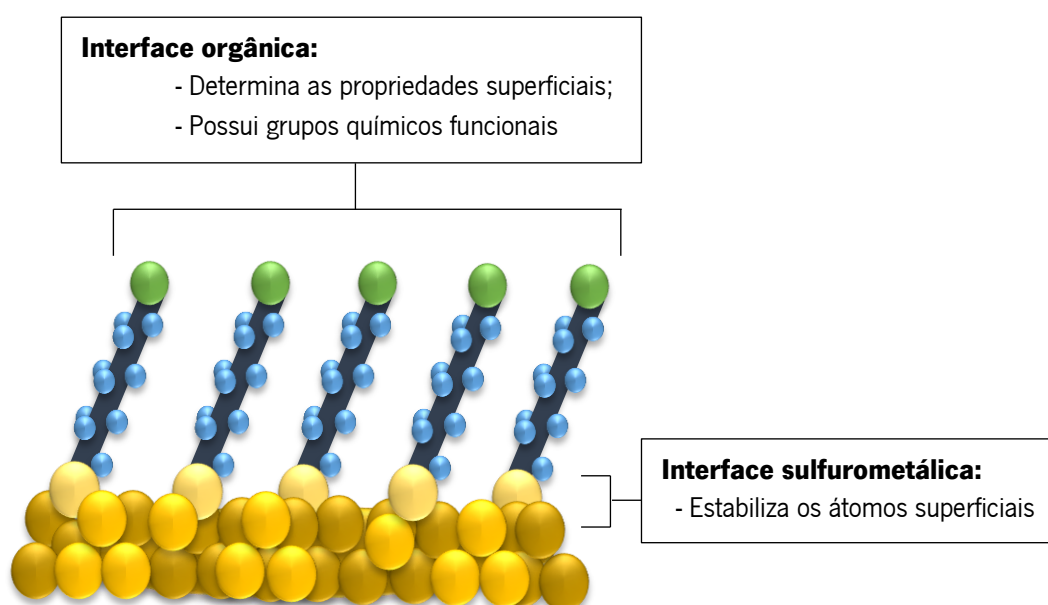


Figura 22 – Esquema de SAM sob uma superfície de ouro (adaptado de Love et al., 2005).

7.3.2. Ligação por afinidade

Este método utiliza outros intermediários (e.g. o sistema avidina/biotina) para ligar o ADN à superfície do elétron (e.g. Au). A interação não-covalente da avidina à biotina apresenta uma elevada estabilidade, assegurando, assim, uma vez formado o complexo, este não será perturbado pelas condições da reação de hibridização ou lavagem do sistema. Para tal, primeiro é necessário fixar a avidina sobre a plataforma. Isto pode ocorrer tanto por adsorção física como por ligação covalente. Depois os oligonucleotídeos biotinizados são depositados sobre a superfície para estabelecerem ligações com a avidina (Tombelli et al., 2002; Ozsoz, 2012; Svitková & Labuda, 2017). A única desvantagem associada a este processo é o número de modificações necessárias aos ácidos nucleicos para imobilizar as sequências, o que aumenta exponencialmente o tempo de ensaio (Tombelli et al., 2002).

7.3.3. Ligação covalente

As ligações covalentes são frequentemente utilizadas para imobilizar biomoléculas, visto que a maior parte dos estudos e sensores de deteção da hibridização operaram com elétrodos de Au. A ligação covalente estabelecida (graças às terminais tioladas das sondas) entre os grupos reativos (naturais ou artificiais) e o elemento de bioreconhecimento, sob a superfície dos elétrodos, promove a estabilidade e homogeneidade das biomoléculas, uma maior uniformidade na distribuição e número de ativação de sondas, para além de ser a técnica mais rápida e com o menor custo de produção (Palecek & Jelen, 2005; Monosik, et al., 2012; Hermanson, 2013; Kurbanoglu et al., 2016; Svitková & Labuda, 2017).

7.4. Hibridização da cadeia complementar de ADN

A hibridização do ADN constitui o princípio fundamental na construção de qualquer genossensor (Rashid & Yusof, 2017). Esta reação é uma interação química natural e espontânea que resulta da capacidade de uma ssADN formar uma cadeia dupla (dsADN) com a sequência complementar, ou seja, o alvo é identificado através da sonda de ADN capaz de formar uma dsADN com a complementar à sequência de nucleótidos. Esta ainda ocorre com uma elevada especificidade e eficácia, mesmo quando numa solução com diferentes (i.e., não complementares) ácidos nucleicos (Pividori et al., 2000; Ozsoz, 2012; Rashid & Yusof, 2017).

Nos genossensores, a reação de hibridização do ADN ocorre quando uma sonda de captura específica (i.e., ssADN com sequência conhecida) imobilizada no elétron interage com o elemento de reconhecimento do ADN alvo (tADN) (Ozsoz, 2012; Rashid & Yusof, 2017). Variando as condições experimentais como o pH, a temperatura e a força iónica do meio, a eficiência desta hibridização pode ser controlada, possibilitando, assim, a deteção de incompatibilidades nas bases nucleicas (Ozsoz, 2012). Acresce que a especificidade do genossensor dependerá das condições da seleção e estrutura secundária das sondas de ADN (principal aspeto na transdução eletroquímica da hibridização de ADN) (Ozsoz, 2012; Yan et al. 2013).

7.4.1. Estratégias de hibridização

A hibridização dos ácidos nucleicos é o ponto central nesta detecção eletroquímica, pelo qual foram, ao longo dos anos, desenvolvidas várias estratégias para otimizar o sinal produzido. Estas estratégias baseiam-se nas propriedades eletroquímicas intrínsecas do ADN, ou melhor, das suas espécies eletroativas, quando próximas do elétrodo. Estas estratégias estão divididas em duas categorias: sem marcadores e com marcadores, representadas na **figura 23** (Tosar et al., 2010).

A estratégia sem marcador regista o sinal apenas da hibridização, ou seja, o sinal analítico detetado depende exclusivamente da ação do tADN. Por outro lado, a estratégia com marcadores recorre a sondas sintéticas de ADN marcadas com enzimas (e.g. peroxidase), NP (de Au ou de prata (Ag)) e espécies redox (e.g. ferro e peróxido de hidrogénio) para amplificar o sinal eletroquímico obtido nos processos de bioreconhecimento. Estas sondas marcadas, quando hibridizam com o ADN imobilizado no elétrodo, amplificam o sinal eletroquímico obtido, aumentando, conseqüentemente, a sensibilidade do genossensor (Tosar et al., 2010; Ozsoz, 2012).

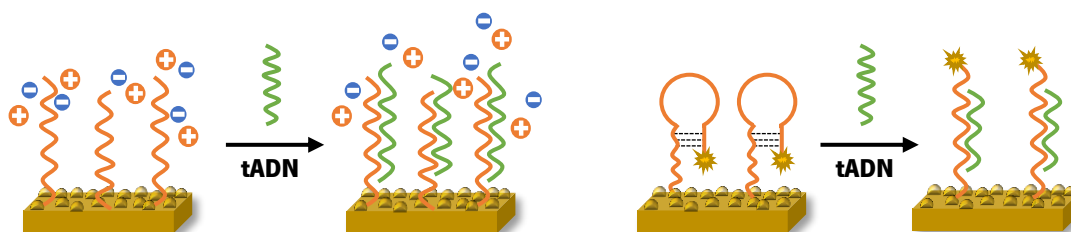


Figura 23 – Exemplificação das estratégias sem marcador (à esquerda) e com marcador (à direita). As seqüências a vermelho representam as sondas de captura e as seqüências a verde o tADN complementar (adaptado de Tosar et al., 2010).

Esses marcadores normalmente encontram-se ligados covalentemente aos grupos terminais das seqüências de ADN, pelo que a posição do marcador tem que ser cuidadosamente escolhida de maneira a não interferir com a construção do genossensor. É importante sublinhar que qualquer erro no posicionamento ou conjugação das suas estruturas levará à perda da bioatividade e da estabilidade do sistema e, naturalmente, à perda do sinal eletroquímico. Assim, os biossensores podem apresentar funções e aplicações muito diferentes, consoante o marcador utilizado (Ozsoz, 2012).

7.4.1.1. Hibridização em formato “sandwich”

O ensaio em formato “sandwich” (SHA, do inglês sandwich hybridisation assay) consiste na promoção da reação de hibridização em, pelo menos, duas etapas. A primeira pode ocorrer, por exemplo, quando o ADN captura, imobilizado sob a superfície do sensor, hibridiza especificamente com uma região da seqüência alvo, isto é, com o tADN; e a segunda etapa aquando a hibridização da sonda sinalizadora numa segunda região da seqüência alvo, gerando um formato em “sandwich” (Ikebukuro et al., 2004; Immoos et al., 2004; Wan et al., 2009; Ozsoz, 2012; Wang et al., 2014). A **figura 24** esquematiza as duas etapas descritas.

Esta abordagem tem composto o desenho e construção de vários genossensores, pois a obtenção da reação de hibridização em várias etapas resulta num método eficaz para a detecção e/ou

quantificação de sequências oligonucleotídicas específicas (Cao et al., 2002; Drummond et al., 2003; Ayers et al., 2005; Wang, et al., 2014). A elevada sensibilidade e seletividade alcançada por este formato torna-o oportuno para o estudo de microalgas (Ayers et al., 2005).

As desvantagens associadas a este tipo de ensaio advêm do facto da utilização de várias etapas de incubação aumentarem a duração do ensaio (Ikebukuro et al., 2004; Ozsoz, 2012; Wang, et al., 2014). Para ultrapassar esta limitação têm-se utilizado várias técnicas para amplificar o sinal elétrico, incluindo o uso de NP de Au, nanotubos de carbono e enzimas (Patolsky et al., 1999; Alfonta et al., 2001; Campbell et al., 2002; Chen et al., 2003; Wang & Musameh, 2003; Daniel & Astruc, 2004; Chu et al., 2005; Boisselier & Astruc, 2009; Wang et al., 2014).

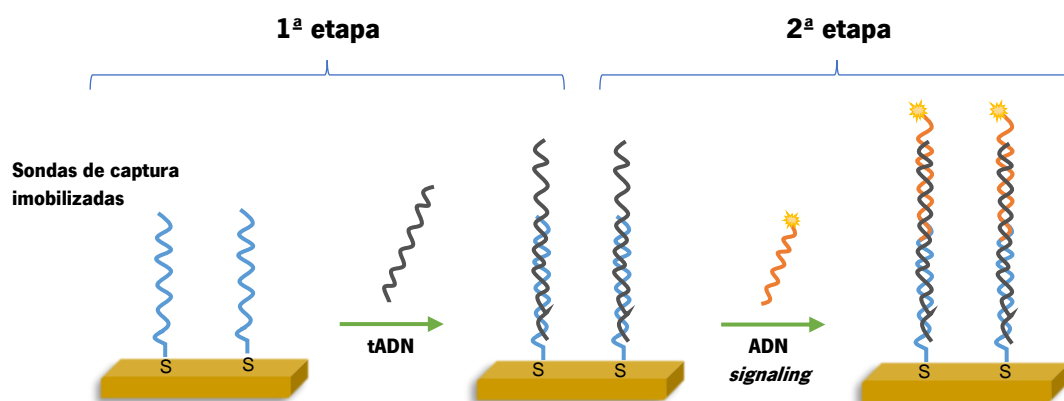


Figura 24 – Esquema genérico da reação de hibridização em formato sandwich.

7.5. Detecção do sinal eletroquímico

Com o avanço tecnológico, muitas técnicas e/ou estratégias foram empregues para analisar e detetar agentes patogénicos, elementos tóxicos, contaminantes ou mesmo os metabólicos sintetizados por microrganismos. Os métodos eletroanalíticos são um exemplo deste desenvolvimento e oferecem algumas vantagens em relação às outras estratégias – como a melhor seletividade e/ou especificidade na identificação das espécies de interesse após a reação de oxidação-redução ou a maior seletividade ao longo da reação redox do analito no eletrodo – pelo que é o método mais utilizado, sobretudo por não-eletroquímicos, da atualidade (Brett & Brett, 1993; Brett & Brett, 1998; Ricci et al., 2012; Pacheco et al., 2013; Mahato et al., 2018).

Estes métodos de análise utilizam as propriedades elétricas quantificáveis (corrente elétrica, diferenças de potencial, variação da carga, entre outros) de um analito quando este produz uma alteração no potencial do eletrodo, por exemplo, quando uma espécie redox interage física e/ou quimicamente com os demais componentes do meio, ou mesmo com as interfaces do sistema (Pacheco et al., 2013). Essas medidas (chamadas de sinais eletroanalíticos) podem, então, ser relacionadas com algum dos parâmetros intrínsecos da espécie (Wang, 2000a; Pacheco et al., 2013).

A detecção eletroquímica da reação de hibridação do ADN normalmente advêm das mudanças do comportamento eletroquímico do tADN na presença ou ausência do ADN complementar. A reação de hibridação pode ser monitorizada através do pico da corrente da atividade redox das bases eletroativas

do ADN (e.g. guanina e adenina) ou através do sinal eletroquímico após a hibridização de uma sonda de ADN complexada a uma enzima ou a NP (Alves et al., 2016).

Assim, para a aquisição do sinal eletroquímico gerado durante a reação de hibridação podem ser aplicadas algumas abordagens com base na (i) medição da corrente com variação do potencial (voltametria) ou de potencial fixo (amperométrico) como resultados das atividades redox no eletrodo de trabalho; (ii) medição do potencial de carga de corrente constante (potenciométrico) e (iii) alteração da condutividade do eletrodo a diferentes frequências (condutométrica) (Pividori et al., 2000; Chaubey & Malhotra, 2002; Ricci et al., 2012; Chandra et al., 2013; Mahato et al., 2018).

Estes novos métodos eletroquímicos são mais sensíveis, seletivos, rápidos e fáceis de operar e transportar – tornando-os, frequentemente, o “candidato” adequado para diversas aplicações analíticas. Um número diverso de metodologias eletroquímicas tem sido explorado no campo de biossensores eletroquímicos como são os casos de (i) voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês differential pulse voltammetry), (ii) voltametria cíclica (CV, do inglês cyclic voltammetry), (iii) voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês squarewave voltammetry) e a (iv) (crono)amperometria (Meng et al., 2012; Hayat & Marty, 2014b).

7.5.1. Voltametria

A voltametria é a técnica analítica mais utilizada para a detecção do sinal eletroquímico resultante da reação de hibridização entre duas cadeias de ADN, porque, entre outros, é um método simples e barato (Oliveira et al., 2011; Rahman et al., 2015). Esta técnica mede a corrente elétrica (I) que flui através de um eletrodo (de trabalho) em função da variação de potenciais das espécies reativas, pelo que a informação sobre a concentração do analito é obtida medindo a amplitude da corrente, durante a reação redox, que surge enquanto se varia os potenciais (Kissinger & Heineman, 1996; Protti, 2001; Ozsoz, 2012; Pacheco et al., 2013; Mistry et al., 2014; Pallela et al., 2016; Mahato et al., 2018). Assim, a avaliação das técnicas voltamétricas atua sobre o princípio de que a corrente gerada é uma função do potencial aplicado nos eletrodos e é diretamente proporcional à concentração de espécies eletroativas, neste caso, das bases nucleicas do ADN (Ozsoz, 2012; Mahato et al., 2018). A I resultante do processo redox está relacionada com a carga (Q) que passa durante a reação por:

$$I = dQ/dt \quad \text{(equação 1)}$$

em que, **t** é o tempo em segundos.

Essa carga reflete a quantidade de material reativo através da lei de Faraday:

$$Q = m.n.F \quad \text{(equação 2)}$$

em que,

m = número de moles convertidos;

n = número estequiométrico de eletrões;

F = constante de Faraday.

É um método versátil e dinâmico com diversos fins analíticos, pois permite investigar vários aspectos sobre as reações eletroquímicas – nomeadamente as reações em que há troca de eletrões entre os reagentes e os produtos. Através destas reações também é possível determinar quais as leis que ditam a dependência da corrente pelo potencial imposto sobre o elétrodo (Protti, 2001).

Neste trabalho estudou essencialmente duas técnicas voltamétricas específicas: a CV e a cronoamperometria.

7.5.1.1. Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais utilizadas no ramo da química e física. Este método raramente se aplica a estudos quantitativos, mas é importante nos estudos dos processos redox, sobretudo para a análise dos seus intermediários e da estabilidade dos produtos da reação (Kounaves, 1997; Protti, 2001). A CV permite-nos retirar informações sobre a termodinâmica dos eventos redox, como também pode determinar a estequiometria dos eletrões de um sistema e o coeficiente de difusão de um analíto (Harvey, 2017).

Esta técnica mede a intensidade de corrente (ao longo do tempo) quando um potencial é aplicado ao elétrodo (Kounaves, 1997; Protti, 2001). É uma técnica particular, devido à forma do seu varrimento – que pode ser linear ou em forma de escada – sendo o potencial registado de E_1 para E_2 e o tempo que decorre é o tempo de varrimento, o que corresponde ao declive indicado na **figura 25**. O declive é expresso em volts por segundo (V/s). Para além da forma do varrimento, a amplitude do varrimento também varia conforme o tipo de processo utilizado, isto é, podemos ter reações reversíveis, quase-reversíveis e irreversíveis.

Quando perante uma reação reversível, assim que o potencial do CV é atingido, o potencial do elétrodo de trabalho é direcionado no sentido oposto até regressar ao potencial inicial (negativo ou positivo). Consoante a análise, um ciclo completo, parcial ou uma série de ciclos podem ser realizados (Kissinger & Heineman, 1996; Kounaves, 1997; Protti, 2001).

Normalmente, a CV é desenhada de maneira a que os processos de redução (da reação redox) sejam observados em “forward” e a oxidação em “reverse”. O voltamograma resultante deste perfil contra o tempo do potencial aplicado ao elétrodo está descrito na **figura 26** (Harvey, 2017).

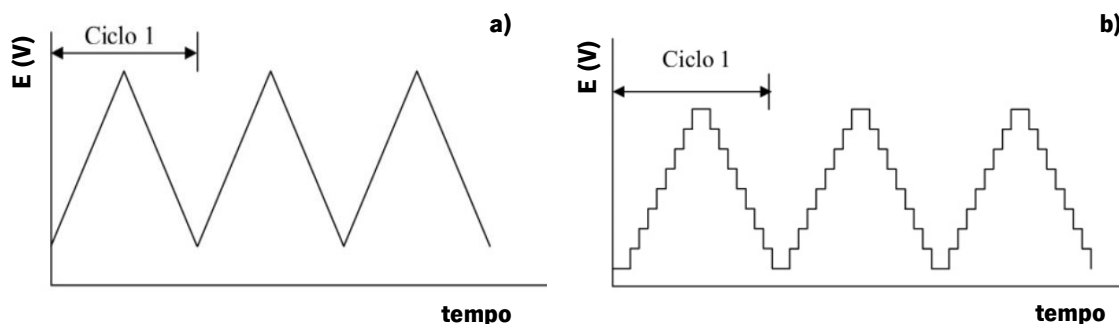


Figura 25 – Aplicação do potencial de voltametria cíclica de potencial de varrimento **a)** linear e **b)** em forma de escada.

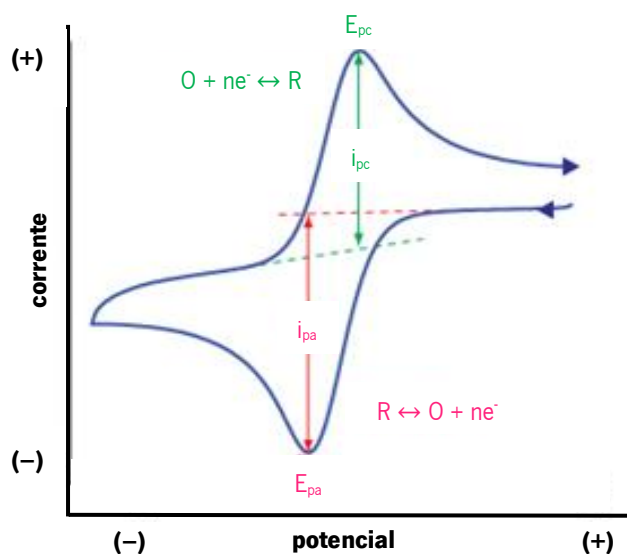


Figura 26 – Voltograma de um sistema reversível, evidenciando as medições dos picos de corrente e os picos de potencial (adaptado de Pacheco et al., 2013; Harvey, 2017).

7.5.1.2. Cronoamperometria

A cronoamperometria é a técnica eletroquímica que estuda a variação da corrente quando o potencial aplicado ao elétrodo de trabalho é faseado, isto é, o potencial aplicado varia linearmente com o tempo e a corrente resulta dos processos faradaicos (corrente desejada) em função do tempo (**figura 27**) (Kissinger & Heineman, 1996; Pacheco et al., 2013).

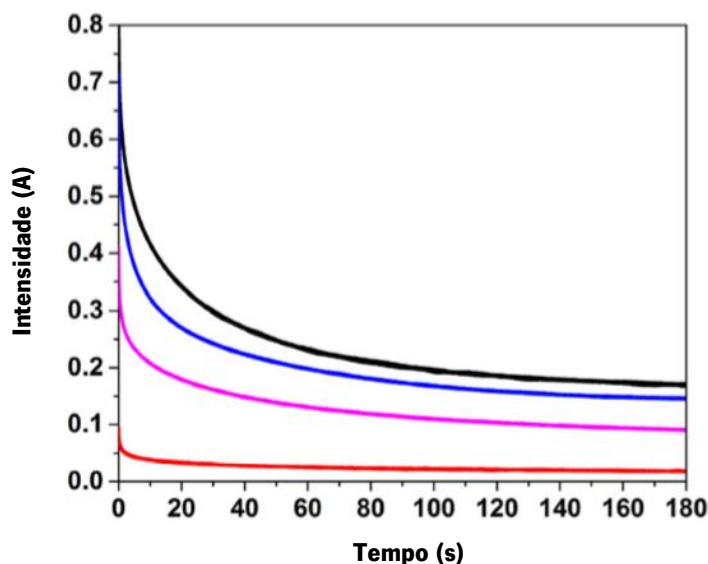


Figura 27 – Respostas cronoamperométricas da variação da concentração de um analito em função do tempo (extraído de Yu & Akolkar, 2017).

A medição normalmente ocorre num único passo (single potential step), no qual a corrente do “forward” é registada e a técnica em si envolve a intensificação do potencial aplicado ao elétrodo (de

trabalho), que passa de um valor onde as reações faradaicas não se observam até o salto para o potencial onde a concentração superficial da espécie eletroativa é zero (**figura 28 A**) e a dependência resultante do tempo é registrada (**figura 28 B**). O processo de transporte ocorre por difusão, pelo que a curva da corrente/tempo reflete a variação da concentração à superfície do eletrodo (Brownson & Banks, 2014).

Esta técnica permite um varrimento relativamente rápido ($1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), no entanto não é muito sensível, limitando a informação disponível para a identificação da(s) espécie(s) eletroativa(s), uma vez que a corrente obtida possui tanto contribuições da corrente faradaica como interferências da corrente capacitiva (ruído) (Kissinger & Heineman, 1996; Protti, 2001; Pacheco et al., 2013).

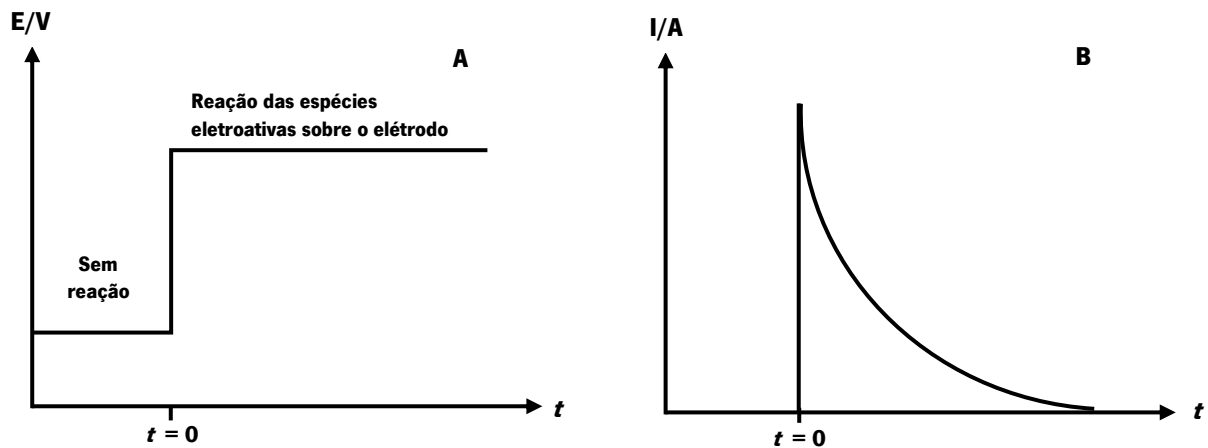


Figura 28 – Respostas cronoamperométricas (**A**) do potencial e (**B**) da corrente em função do tempo.

Capítulo 3 – Materiais e métodos

Todos os ensaios experimentais relacionados com os sensores foram realizados no laboratório de eletroquímica do GRAQ | REQUIMTE, do ISEP. Os ensaios referentes às amostras biológicas (cultivo das microalgas e a extração e ampliação do ADN) efetuaram-se no CISA, na ESS.

Em cada laboratório foram utilizados materiais e metodologias distintas ao longo das várias etapas experimentais.

1. Materiais

1.1. Design experimental

Os registos voltamétricos (cronoamperométricos e cíclicos) deste estudo foram efetuados no potencióstato/galvanostato (AutoLab, Ω Metrohm) da **figura 29**, através do programa NOVA 1.11.2.



Figura 29 – Potencióstato/galvanostato utilizado para a aquisição dos registos voltamétricos.

Elérodos descartáveis de Au (SPGE, do inglês screen-printed gold electrodes) (DropSpen, DS – C223BT e DS – C223AT), produzido por Metrohm, foram usados como transdutor eletroquímico. Estes eléctrodos são constituídos por um eléctrodo de trabalho de Au, um eléctrodo auxiliar de Au e por um eléctrodo de pseudorreferência de prata (Ag), num substrato de cerâmica de dimensões de C 33 x L 10 x A 0,5 mm. O eléctrodo de trabalho tem 1,6 mm de diâmetro. A componente eletrónica, i.e., o conector é de Ag (**figura 30**).

Durante o desenvolvimento e otimização do genossensor foram utilizados: vórtex VMR, modelo VV3 (230 V), utilizado para homogeneizar as soluções; eppendorfs de 0,5 e 1,5 mL, para conter as soluções; micropipetas de 10, 200 e 1000 μ L; um esguicho de 500 mL e uma placa de aquecimento/arrefecimento Tembloc, Selecta.

Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente ($25 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$).



Figura 30 – Eletrodos de ouro de alta (à esquerda) e baixa (à direita) temperatura.

1.2. Crescimento de células

Células clonais de *Alexandrium minutum*, isoladas no mar mediterrâneo, foram adquiridas à empresa Roscoff (França) e crescidas artificialmente em frascos de cultura de células/tecido de 40 mL no meio f/2 e Z8, cujas composições se encontram em anexo (**anexo 1 e 2**, respetivamente). Os dois meios de cultura foram preparados conforme os protocolos descritos em anexo, em balões de vidro de fundo plano de 5 L, com ajuda de uma proveta graduada de $25 \pm 0,1 \text{ mL}$.

O crescimento das microalgas realizou-se a uma temperatura controlada de $18^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, num regime de 14h:10h luz:escuro sob uma lâmpada fluorescente. Uma câmara de fluxo laminar (Telstar, PV-30/70) foi usada para trabalhar com as culturas.

Numa fase inicial, foi empregue uma placa de agitação (Automate orbital shaker, Heidolph Roramax), a uma velocidade de 30 rpm, para impedir a sedimentação das células.

1.3. Extração do material genético

Dois protocolos de extração de ADN (de células animais) para a recolha do material genético foram utilizados; o protocolo do kit comercial “MasterPure™ DNA Purification kit” da Epicentre (2012) e o protocolo do kit E.N.Z.A.® Tissue DNA Kit D3396-02 (200 preps) da Omega Bio-tek, Inc. (USA, 2018). Ambos recorreram a: uma centrifugadora, da Groyzen, modelo 1248R, com RCF máximo de $16,582 \times g$; uma microcentrifugadora VWR, modelo MicroStar12 e com a capacidade de $13,000 \times g$; tubos de 15 mL (Orange); tubos de microcentrifugação de 1,5 mL sem nucleases (Labbox, específico para o kit E.N.Z.A.®); um vórtex, modelo ZX³, 40 Hz, da Velp Scientifica (Usmate, Itália); micropipetas de 10, 200 e 1000 μL (Eppendorf Research® plus) e um banho de ultrassons com termóstato (Sonorex Super, RK 100 H) de Bandelin®.

A centrifugadora e a microcentrifugadora foram usadas para a separação do material genético em fases e o ultrassom para aquecer as amostras.

Ainda, uma zaragatoa foi usada para recolher as células animais do epitélio oral.

Para quantificar o ADN extraído foi utilizado a micropipeta de 10 μ L e o espectrofotômetro NanoDrop, da ThermoScientific, modelo NanoDrop Lit.

1.4. Amplificação do ADN

A amplificação da sequência-alvo foi executada através do PCR convencional.

O desenho dos primers – sequências específicas que permitem clivar e amplificar a região de ADN pretendida – foi desenvolvido através do Primer-BLAST (NCBI) (Ye et al., 2012) e adquiridos à Eurogentec (Bélgica).

O protocolo de PCR utilizado foi o protocolo estabelecido pela Promega – Go Taq® G2 Flexi DNA Polymerase para a preparação das misturas de PCR. Este protocolo apresenta cinco passos simples, para os quais se recorreu ao uso de: micropipetas – 10, 20, 100, 200 e 1000 μ L; microtubos de 100 μ L e 1,5 mL e; o termociclador GTC96S, da Cleavere Scientific Ltd., UK.

Para confirmar a presença do fragmento amplificado, foi efetuada uma corrida em gel de eletroforese (Fisher Bioreagents), usando uma tina e fonte (nanoPAC – 500) de eletroforese da Cleavere Scientific Lda e a visualização dos fragmentes, resultantes da eletroforese, foi documentada através de um transiluminador de fluorescência ultravioleta (UV) da VWR, modelo GenoSmart. No gel foi adicionado o marcador fluorescente Safe View (NBS Biologicals).

A **figura 31** mostra o NanoDrop e o termociclador utilizados nos ensios de biologia molecular.



Figura 31 – Imagem do NanoDrop (à esquerda) e do termociclador (à direita).

2. Reagentes

No decorrer deste projeto utilizaram-se os seguintes reagentes; para o desenvolvimento do sensor: sódio-fosfato de sódio-EDTA (SSPE 20x), 6-mercaptop-1-hexanol (MCH), tampão fosfato-salino com caseína (PBS), o anticorpo Anti-Fluoresceína-Peroxidase e tetrametilbenzidina (TMB); para a extração das culturas celulares: Tissue and Cell Lysis Solution (TCL), MPC protein precipitation reagent (MPC), isopropanol e etanol 96%; PBS; OB protéase; BL buffer; HBC buffer; DNA Wash buffer; Elution buffer e etanol 96%; para a amplificação do ADN: 1x Green Go Taq® Flexi Buffer (GgTBuffer), $MgCl_2$ Solution ($MgCl_2$), Go Taq® G2 Flexi DNA Polymerase (Taq) e PCR Nucleotide Mix (dNTPs); e para a eletroforese: agarose, TBE buffer (TBE), SafeView Nucleic Acid Stain (SafeView) e 50 bp DNA Ladder (Ladder).

O SSPE, MCH e TMB foram fornecidos pela Sigma-Aldrich, enquanto o anticorpo e o PBS adquiriram-se através da Roche e ThermoFisher, respetivamente. Enquanto o MPC, Proteinase K e TCL foram adquiridos pela Epicenter, o GgTBuffer, $MgCl_2$ e Taq. pela Promega, o dNTP da Fermentas e a agarose, Ladder, Safe View e TBE por Fisher Bioreagents, Thermo Scientific™ GeneRuler™, NBS Biologicals e PanReac | AppliChem, respetivamente.

O tampão SSPE 2x foi obtido por diluição em água ultrapura obtida do sistema de purificação Millipore Milli-Q (18.2 M Ω cm) na proporção 1:9 (20 mL de tampão SSPE 20x para 180 mL de água).

Para além dos reagentes mencionados utilizou-se, também, albumina de soro bovino (BSA, do inglês bovine serum albumin), da Sigma-Aldrich.

Todos os reagentes acima enumerados são de grau analítico, pelo que não tiveram que ser posteriormente purificados.

3. Sondas de ADN

As sequências oligonucleotidas selecionadas: sonda de captura, sonda sinalizadora (ou *signaling*) e a sonda alvo foram adquiridas na forma de um sal liofilizado, através da Eurogentec (França). Soluções padrão de ADN (captura, sinalizadora e alvo) de concentração 100 μ M foram preparadas em água ultrapura e armazenadas a - 20°C. As soluções de ADN de trabalho foram preparadas diariamente diluindo uma quantidade da solução padrão em SSPE 2x.

A construção e desenvolvimento deste genossensor depende da seleção das sondas, pela qual foi escolhida uma sequência de ADN capaz de identificar os dinoflagelados *Alexandrium minutum* – espécie específica deste estudo. Para além da *A. minutum*, estas sequências também identificam três outras espécies do género *Alexandrium*, a *Alexandrium tamarense*, a *Alexandrium ostenfeldii* e a *Alexandrium insuetum*.

A **tabela 10** descreve as sequências utilizadas nesta experiência e a **figura 32** ilustra a estrutura de cada sequência.

Tabela 10 – Oligonucleotídeos utilizados no desenvolvimento do genossensor eletroquímico.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5' → 3'	pb
Captura	TCTATTGGCTCACGGAATTCTGCAA– HOC₆SH	25
Signaling	FC –GCACACCTTCAAGCATATCCCGAAGGTGCAAATTACGTTCAAACA	45
Alvo	TTGCAGAATTCGGTGAGCCAATAGATGTTTGAACGTAATTTGCACCTTCGGGATA TGCTTGAAGGTGTGC	70
Complementar	GCACACCTTCAAGCATATCCCGAAGGTGCAAATTACGTTCAAACATCTATTGGCT CACGGAATTCTGCAA	70

HOC₆SH – grupo tiol; **FC** – fluoresceína.

A sonda de captura e a sonda sinalizadora possuem terminações específicas (**tabela 10**) para ajudar no desenvolvimento do procedimento do ensaio; ADN de captura apresenta um grupo tiol (HOC₆SH) na extremidade 3' para facilitar a sua fixação ao substrato de Au e o ADN da *signaling*, na extremidade 5', uma fluoresceína para facilitar a detecção do sinal.

Quanto maior a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) maior a probabilidade de se formarem estruturas secundárias nas cadeias de ADN (os “loops” que se observa nas sequências da **figura 32**). Atendendo aos estudos termodinâmicos, menores ΔG facilitam a formação de SAM e diminui a probabilidade de se formar as estruturas secundárias, aumentando, assim, a probabilidade de ocorrer uma hibridização espontânea entre as cadeias de ADN complementares. Logo, as sequências selecionadas para este estudo apresentam, todas elas, uma vantagem para o modelo e formato do sensor adotado; a sonda de captura com uma ΔG de - 0,71 kcal/mol são ideias para a formação de SAM, uma vez que originam estruturas quase lineares e as sondas *signaling* e alvo com uma ΔG de - 7,51 kcal/mol e - 8,94 kcal/mol, respetivamente, possuem um valor aceitável para a hibridização do ADN.

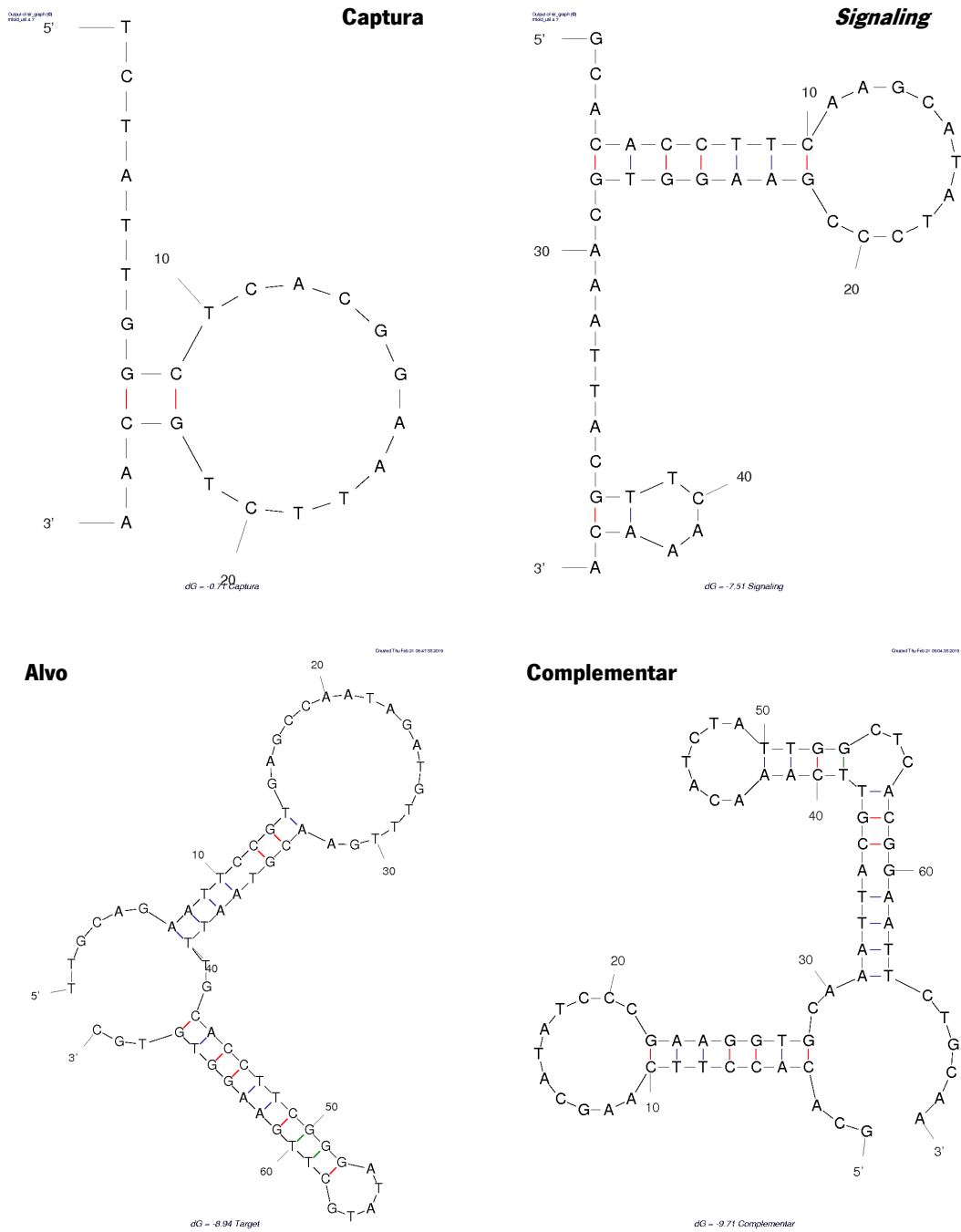


Figura 32 – Possíveis dobramentos da estrutura dos oligonucleotídeos. Temperatura = 25,0°C; [Na⁺] = 0,298 M; [Mg²⁺] = 0,0 M. (Fonte: unafold.rna.albany.edu)

4. Procedimento experimental

Este subcapítulo encontra-se dividido em três secções: “Desenvolvimento do genossensor eletroquímico”, “Análise de amostras reais” e “Avaliação do genossensor eletroquímico” atendendo ao local onde se realizou cada etapa experimental.

4.1. Desenvolvimento do genossensor eletroquímico

Todo o procedimento para a elaboração e otimização do genossensor eletroquímico foi realizado com base na literatura (e.g. López, et al., 2014, Freitas, et al., 2016). Neste estudo distinguiu-se três momentos essenciais para a deteção do sinal: a fase sensorial; a hibridação em formato “sandwich” e; a deteção eletroquímica (que compreende a ligação do anticorpo e a reação peroxidase/TMB). Todo o procedimento está esquematizado sucintamente na **figura 33**.

4.1.1. Pré-tratamento dos eléctrodos

Os eléctrodos foram lavados com etanol e água e secos com uma corrente de nitrogénio.

4.1.2. Fase sensorial

Após a lavagem, imobilizou-se 3 μL de sonda de ADN de captura (1 μM) no eléctrodo de trabalho. De seguida, esses eléctrodos foram colocados numa caixa de Petri humificada dentro do frigorífico a 4°C “over night” (aproximadamente 16 horas). Esta etapa tem como finalidade assegurar a fixação da sonda de captura à superfície do eléctrodo pela extremidade tiolada.

Depois do período de imobilização, sucedeu-se à lavagem da superfície dos eléctrodos, desta vez, com o tampão SSPE 2x. Este passo ajuda a remover o ADN não imobilizado ao substrato, porém, também acaba por desordenar a monocamada imobilizada, o que promove a adsorção não específica de alguns ácidos nucleicos das sondas ao substrato. Para contornar esse efeito, adicionou-se 3 μL de MCH, durante um curto período de tempo, de maneira a induzir a organização do ADN em SAM.

O excesso de MCH foi depois removido após uma segunda lavagem dos eléctrodos com o tampão SSPE 2x.

4.1.3. Hibridação em formato sandwich

O formato de reacção adotado para este estudo foi a hibridação em formato “sandwich”. Esta hibridação ocorre em duas etapas distintas designadas de hibridização homogénea e hibridização heterogénea (**figura 34**).

Inicia-se a reacção de hibridação pela hibridação homogénea.

Na hibridação homogénea, as sondas de tADN são misturadas com sondas de ADN sinalizadoras e tampão SSPE 2x num eppendorf, durante 30 minutos. O volume adicionado variou conforme a concentração de tADN pretendida.

Na hibridização heterogénea 3 μL da solução homogénea é adicionada à superfície modificada (superfície do elétrico previamente imobilizada com a sonda de ADN de captura e MCH), ocorrendo a hibridização entre as sondas tADN e *signaling* com a de captura.

No final lavaram-se novamente os eletrodos com o SSPE 2x para remover qualquer ligação não-específica que se tenha formado.

4.1.4. Detecção eletroquímica

Para se detetar o sinal eletroquímico, 1,5 U/mL de peroxidases em PBS (designadas de anticorpo) foram adicionadas ao transdutor como um marcador da fluoresceína (proteína modificada numa das extremidades da sonda sinalizadora).

Uma nova lavagem é realizada 30 minutos após a adição do anticorpo, para eliminar o excesso. No final o SPGE é conectado ao potenciostato e é adicionado 40 μL de TMB.

O acréscimo do TMB, em conjunto com as enzimas peroxidase, promove a oxidação do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), atribuindo uma coloração azulada à solução – indicador ótico da reação. A deteção da hibridização do ADN é então possível através da reação redox desencadeada pela peroxidase que usa o substrato TMB/ H_2O_2 , quando aplicado um potencial, para gerar um sinal eletroquímico (Heurich et al., 2011, Alves-Balvedi et al., 2016).

Usando a cronoamperometria (tempo = 60s; potencia = - 0,1V) é possível monitorizar a resposta eletroquímica cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de tADN.

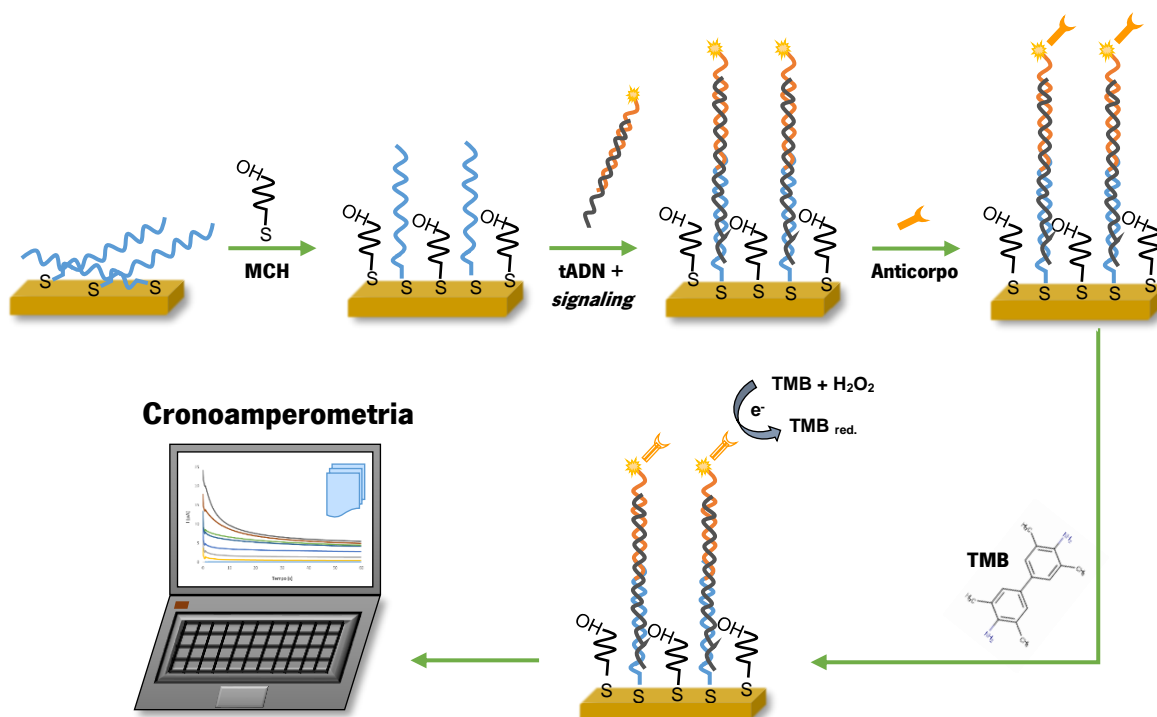


Figura 33 – Procedimento geral para o desenvolvimento do genossensor eletroquímico.

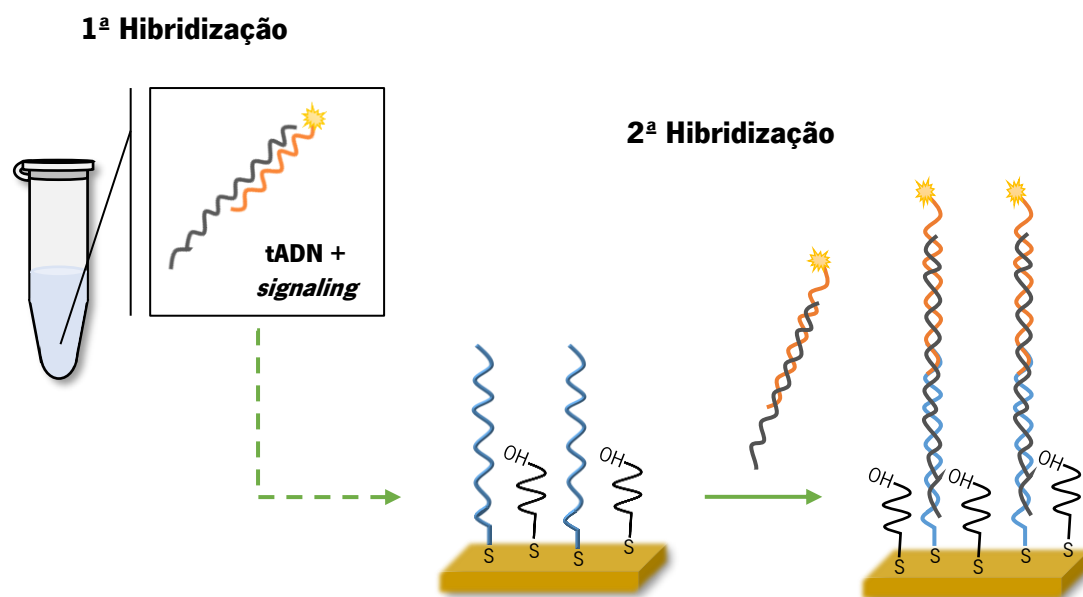


Figura 34 – Esquema geral da hibridação em formato sandwich. A sonda de captura está representada a azul claro, a sonda alvo a cinzento, a sonda sinalizadora a laranja, o MCH a preto e a fluoresceína a amarelo.

4.2. Amostras reais

Dois gêneros de dinoflagelados foram testados no genossensor desenvolvido: a *Alexandrium minutum* e a *Lingulodinium polyedrum*. A microalga tóxica *Alexandrium minutum* foi escolhida pela sua distribuição ao longo da costa ibérica e pelos impactos socio-econômicos que a sua presença provoca nas culturas aquícolas de bivalves (**figuras 11 e 17**), enquanto a *Lingulodinium polyedrum* surge como um exemplo não tóxico de uma HAB real. *L. polyedrum* foi usada como controlo negativo do sensor.

Para além dos dinoflagelados, células humanas do epitélio oral também foram aplicadas como um controlo negativo.

4.2.1. *Alexandrium minutum*

O cultivo das microalgas efetuou-se em frascos de cultura de 40 mL, a $18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, utilizando água autoclavada artificialmente salgada (salinidade de 35 psu) e enriquecida por um meio de cultura.

Neste estudo, dois meios de cultura foram testados: o meio f/2 – meio recomendado pela empresa fornecedora – e; o meio Z8 – um dos meios indicado em literatura para o crescimento artificial das microalgas do género *Alexandrium*. Os dois meios de cultura foram preparados atendendo aos protocolos que se descreveu em anexo (**anexo 1 e anexo 2**).

O stock inicial (i.e., a solução-mãe adquirida) apresentou uma densidade população baixa (valor não expresso). Assim, para aumentar a população dos dinoflagelados, foram transferidos, para quatro frascos de cultura, 10 mL do stock original e aproximadamente 30 mL do meio f/2. Durante os primeiros 20 dias cresceu-se os dinoflagelados dos frascos no meio recomendado – o meio f/2 – sob agitação mecânica, todavia, não houve um crescimento populacional notável. Portanto, fez-se crescer em meio Z8.

De cada um dos quatro frascos anteriores, um volume de 8 mL foi retirado e adicionado a quatro novos frascos de cultura/tecido (4x4), cujo volume final foi feito com o meio Z8 (assim sendo, cada um dos quatro frascos de cultura com o meio f/2 perdeu 32 mL de amostra). Aos restantes 8 mL foi adicionado mais nutrientes do meio f/2. A **figura 35** esquematiza o procedimento adotado.

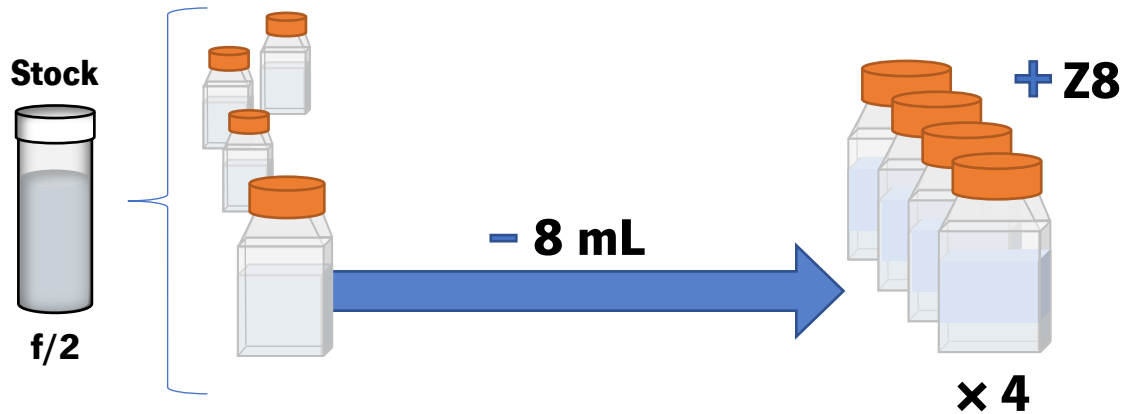


Figura 35 – Esquema geral da distribuição das células de *Alexandrium minutum*.

Os resultados da proliferação artificial das células, em ambos os meios, não foram os esperados. Todavia, notou-se um ligeiro aumento na quantidade de células.

4.2.2. *Lingulodinium polyedrum*

Para testar a seletividade do genossensor desenvolvido recolheu-se uma amostra da HAB que deu à costa algarvia no dia 16 de junho de 2019. Foi recolhido um volume de 1,5 L de água marinha contaminada pela microalga *Lingulodinium polyedrum* (dinoflagelado identificado pelo IPMA). Não foram realizadas culturas, uma vez que a amostra inicial continha uma densidade populacional elevada de dinoflagelados.

4.2.3. Células animais do epitélio oral

Células do epitélio oral (i.e., células do interior da bochecha humana), extraídas voluntariamente, serviram de um segundo controlo negativo para este projeto. Estas células foram recolhidas com a ajuda de uma zaragatoa e armazenadas em eppendorfs de 1,5 mL no frio, até à extração do ADN.

4.3. Extração de ADN genómico

De modo a obter a máxima quantidade e qualidade de ADN, dois protocolos de extração celular foram testados: **A** – (Cultured cells protocol) de E.N.Z.A.[®] Tissue DNA Kit D3396-02 (200 preps) da Omega Bio-tek, Inc. (USA, 2018) e **B** – kit comercial “MasterPure[™] DNA Purification kit” da Epicentre (2012).

Quando o ADN das culturas *A. minutum* foi extraído de acordo com o **protocolo A**, obteve-se uma menor pureza e concentração de ADN (razões de pureza entre 1,0 – 1,5 e concentrações inferiores

a 30 ng/μL). Assim, para obter maiores valores de pureza e concentração de ADN testou-se o **protocolo B**. Considerando que quando se experimentou o protocolo B, obteve-se uma maior pureza e concentração de ADN (pureza expressa pela razão 280/260 ≈ 1,8 e concentrações entre 40 – 50 ng/μL), todo o trabalho experimental que envolveu extração de ADN foi realizado segundo o **protocolo B**.

A extração de ADN existente nas culturas envolveu várias etapas. A primeira etapa foi a separação do material biológico do meio aquoso. Para tal, verteu-se 10 mL do meio de culturas para tubos de falcon. Esses tubos foram centrifugados durante 15 minutos, a 4°C, à velocidade de 2000 xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi rejeitado e o pellet transferido para eppendorfs de 1,5 mL e adicionou-se 300 μL da solução de lise “Tissue and Cell Lysis Solution” e 1 μL de proteinase K. Homogeneizou-se o meio com auxílio de um vórtex (10 s) e incubaram-se as células, num banho, a 65°C, durante 15 minutos. A solução foi lentamente agitada a cada 5 minutos. Seguidamente, cada solução foi deixada a arrefecer, 5 minutos, no gelo. Depois deste repouso, adicionou-se 175 μL da solução “MCP Protein Precipitation Reagent” – uma solução que precipita as proteínas – e homogeneizou-se no vórtex, durante 10 s, antes de a centrifugar, a 10000 xg, durante 10 minutos. O pellet resultante foi rejeitado, aproveitando-se o sobrenadante – onde se encontra concentrado o ADN – ao qual se adicionou 500 μL de isopropanol. A mistura foi homogeneizada mecanicamente por inversão, antes de a centrifugar novamente sobre as mesmas condições. O pellet resultante, teoricamente, corresponderá ao ADN das culturas, assim, com cuidado, retira-se o sobrenadante às soluções e acrescenta-se-lhes 500 μL etanol 96%. Esta nova mistura é centrifugada e deixada a secar “over night”. Finalmente, 50 μL de água ultrapura é acrescentada ao ADN antes de proceder para a sua quantificação. Este método de extração foi aplicado às restantes misturas.

4.3.1. Quantificação do ADN extraído

A quantificação do ADN extraído dos dois meios de cultura realizou-se por espectrofotometria no Nanodrop – espectrofotómetro capaz de ler a absorvância de uma solução com apenas 1 μL de amostra.

O procedimento para esta medição é bastante simples. Primeiro, fez-se duas leituras da absorvância ao comprimento de onda de 260 nm da água ultrapura (i.e., do branco – solução desprovida de ADN); para este equipamento, a solução em branco corresponde à solução em que o material genético se encontra diluído, neste caso, a água ultrapura. De seguida, colocou-se 1 μL da solução contendo o ADN extraído, sobre o orifício da plataforma de leitura do Nanodrop e fizeram-se leituras da absorvância (ao comprimento de onda de 260 nm) de cada amostra. O valor da absorvância obtida nestes ensaios permitiu determinar a concentração do ADN através da equação de Beer-Lambert:

$$c = (A \cdot \epsilon) / b \quad \text{(equação 3)}$$

em que,

c = concentração dos ácidos nucleicos (ng/μL)

A = absorvância (UA)

ε = coeficiente de extinção dependente do comprimento de onda (ng.cm/μL)

b = largura (cm)

De acordo com a leitura, o ϵ é dependente do comprimento de onda e para soluções contendo dsADN tem um valor de 50 ng.cm/ μ l (Thermo Fisher Scientific, 2010). A cada dez leituras realizaram-se duas novas calibrações com os brancos.

4.4. Amplificação do ADN

A amplificação da região do ADN pretendida efetuou-se através da técnica de PCR convencional. O procedimento experimental para este processo foi realizado no termociclador, de acordo com o protocolo prático Go Taq® G2 Flexi DNA Polymerase estabelecido pela Promega (2013) otimizado.

A sequência transcrita foi amplificada usando-se os dois primers (primer 1 e primer 2) descritos na **tabela 11**. Cada uma das misturas de PCR (50 μ L) conteve 10 μ L GgTBuffer, 3 μ L (correspondente a 1,5 mM) da solução de MgCl₂, 1 μ L (ou 0,25 mM) de dNTP, 0,25 μ L de Taq., 2,5 μ L de cada um dos primers, ADN das amostras biológicas e água ultrapura. O volume de ADN e água adicionados variou conforme a concentração da amostra.

Tabela 11 – Primers utilizados para a amplificação da sequência de ADN de interesse.

Primers	Sequência 5' → 3'	Direção	Pb
Primer 1	TTGCAGAATTCCGTGAGCCA	Forward	20
Primer 2	GCACACCTTCAAGCATATCCC	Reverse	21

A amplificação, no termociclador, iniciou-se com a desnaturação do ADN, durante 2 minutos a 95°C, seguido de uma nova desnaturação, durante 2 minutos, a 94°C por cada ciclo de amplificação.

Após a desnaturação o ADN é reaquecido (processo designado de “annealing”) a -5°C da sua temperatura de fusão (T_m, do inglês melting temperature), neste caso a 57,0°C para a primer 2, durante 30 segundos, com o aumento de 1°C a cada novo ciclo. De seguida, ocorreu a extensão das sondas à temperatura ótima da Taq., ou seja, a 72°C, durante 1 minuto por ciclo, à exceção do último ciclo em que a extensão ocorre durante 5 minutos. Em cada amplificação fez-se 35 ciclos.

No último passo, o termociclador efetua um ciclo onde o material é deixado a repousar a 4°C, até se remover as amostras.

A **tabela 12** indica as etapas da amplificação do ADN.

Tabela 12 – Condições ótimas obtidas para a amplificação no PCR.

Processo	Temperatura (°C)	Duração (min)
Desnaturação inicial	94	2
Desnaturação	94	1
Annealing	60	0,5
Extensão	72	1
Extensão final	72	5
Número de ciclos = 35		

No final do PCR, recorreu-se à eletroforese – técnica de separação de fragmentos de ácidos nucleicos, conforme o seu peso molecular – para determinar a dimensão e a integridade dos fragmentos amplificados.

A eletroforese realizou-se num gel de agarose a 2%. O gel foi preparado adicionando 2,0 g de agarose a 100 mL de tampão TBE 1x. Esta mistura foi posteriormente aquecida num micro-ondas (Electronia, D70H20L), de modo a dissolver a agarose. Após uns minutos adicionou-se 5 μ L de SafeView ao gel e verteu-se a mistura no suporte (da tina) com os pentes, até arrefecer e solidificar.

Depois de solidificado, o gel de agarose foi transferido para a tina e coberto com \pm 800 mL do tampão TBE 1x. Nos espaços vazios, anteriormente ocupados pelos pentes, adicionou-se 10 μ L de cada amostra, conforme o esquema representativo da **figura 36**.

— — — — —
L Z8₁ Z8₂ Z8₃ R1₁ R1₂ R1₃ R2₁ R2₂ R2₃ R3₁ R3₂ R3₃ B₁ B₂

Figura 36 – Legenda dos poços do primeiro ensaio de eletroforese. L = Ladder; Z8_x = réplica x do meio Z8; R_x_y = réplica y da cópia X do frasco 4 do meio f/2; B_x = réplica x do branco.

A corrida de eletroforese efetuou-se a 100 V, durante 60 minutos (**figura 37 A**). Os resultados da corrida foram posteriormente visualizados e documentados, em tempo real, com um tempo de exposição entre os 0,04s e os 0,24s, recorrendo ao transiluminador de fluorescência UV (**figura 37 B**).

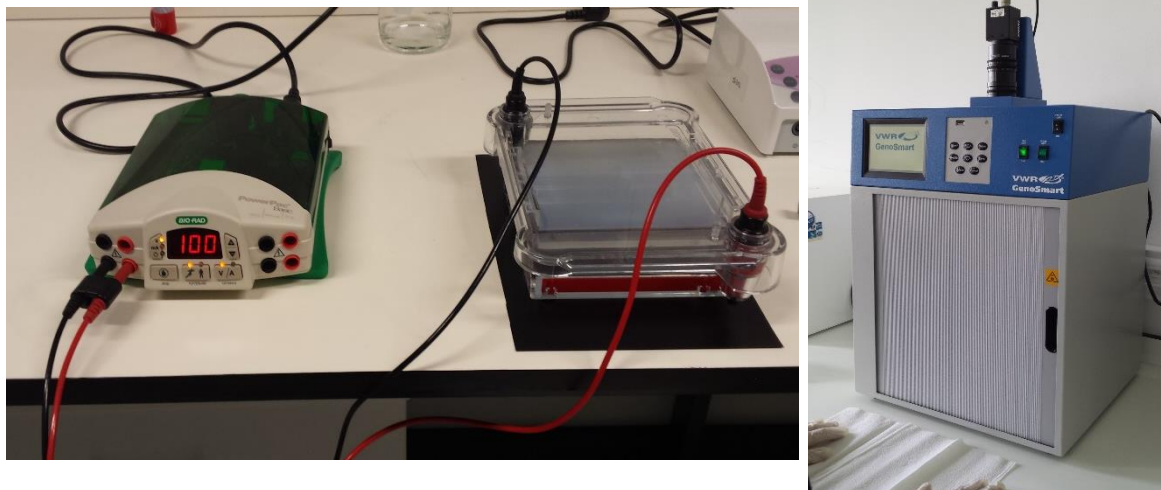


Figura 37 – Tina e fonte de eletroforese (**A**) e o transiluminador de fluorescência ultravioleta (**B**).

4.5. Validação do genossensor eletroquímico

Para determinar a sensibilidade e a seletividade do genossensor desenvolvido realizaram-se vários ensaios com as amostras reais do dinoflagelado *Alexandrium minutum* – controlo positivo – e com o dinoflagelado *Lingulodinium polyedrum* e células colhidas do epitélio oral do autor – controlo negativo.

Capítulo 4 – Resultados e discussão

1. Seleção do eletrodo descartável de ouro

Para assegurar o melhor desempenho do genossensor usaram-se SPGE, pois o Au (i) é um metal com alta condutibilidade elétrica; (ii) tem uma grande biocompatibilidade para formar SAM; e (iii) é o metal mais usado no desenvolvimento e construção de genossensores (Love et al., 2005).

Uma vez que o desempenho do genossensor foi avaliado através do sinal analítico produzido pela redução eletroquímica do TMB/H₂O₂ (que foi oxidado enzimaticamente pela enzima POD), primeiro fez-se o estudo do mecanismo de oxidação/redução, por CV, do TMB/H₂O₂.

A **figura 38** ilustra o fenômeno eletroquímico do processo redox do substrato TMB/H₂O₂ num SPGE.

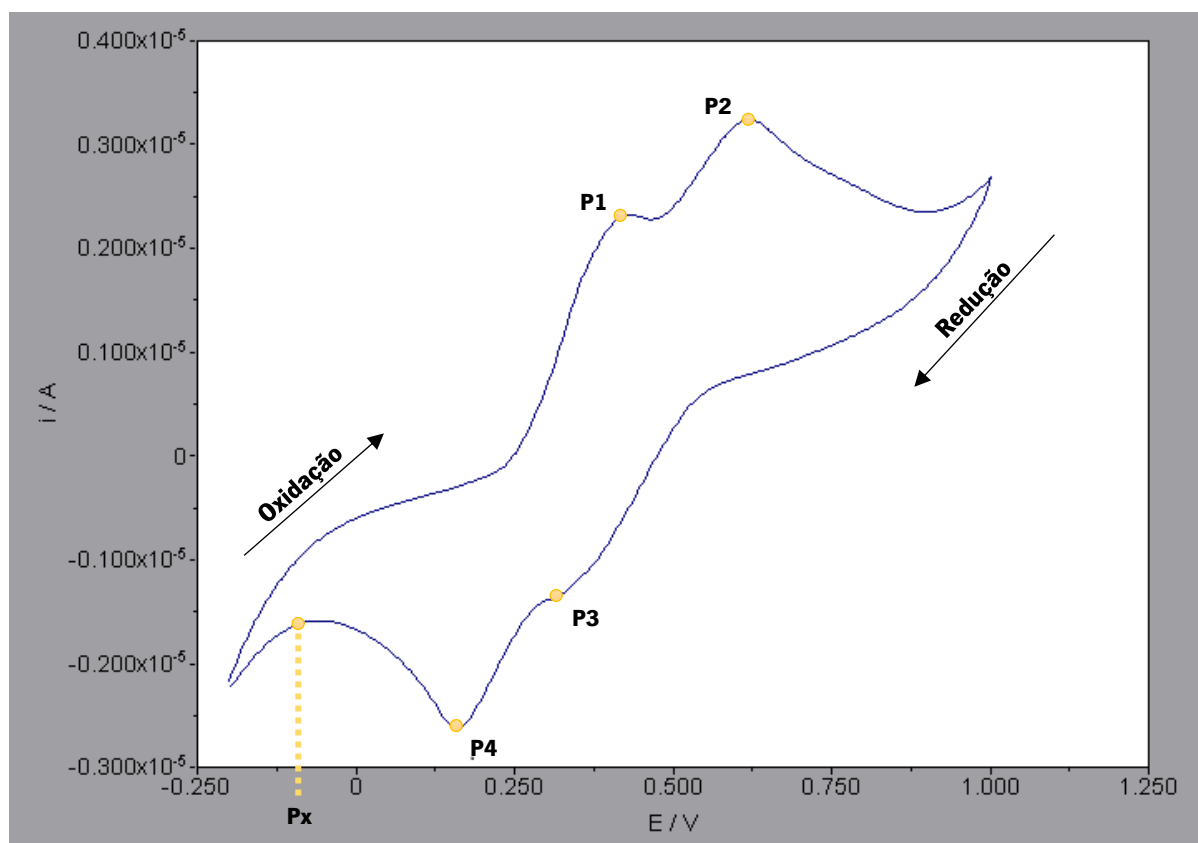


Figura 38 – Voltamograma cíclico do TMB/H₂O₂ em eletrodos descartáveis de ouro (SPGE).

Usando a técnica de CV efetuaram-se varrimentos cíclicos entre os potenciais - 0,2 V a + 1,0 V. Analisando o voltamograma da **figura 38**, verifica-se que o substrato sofre dois processos de oxidação aos potenciais de + 0,37 V (**P1**) e + 0,63 V (**P2**) e dois processos de redução aos potenciais + 0,30 V (**P3**) e + 0,14 V (**P4**).

A cronoamperometria, por ser uma técnica eletroquímica sensível (permite obter maiores sinais analíticos comparativamente com outras técnicas voltamétricas), foi selecionada como a ferramenta analítica para a validação e obtenção dos resultados experimentais produzidos pelo genossensor.

Portanto, para efetuar os ensaios cronoamperométricos foi necessário definir duas variáveis analíticas: o potencial de redução e a duração da reação eletroquímica do analito (TMB/H₂O₂) que ocorre à superfície do eletrodo de trabalho de Au.

A seleção do potencial foi efetuada através da análise do voltograma cíclico (**figura 38**). Neste sentido, avaliando os picos eletroquímicos de redução do TMB, verifica-se que ao utilizar um potencial de - 0,10 V (**Px**) se garante que todo o TMB, oxidado pela enzima POD, é reduzido no ensaio cronoamperométrico (aumentando a sensibilidade do genossensor). De modo a garantir que a redução do TMB/H₂O₂ seja completa, definiu-se uma duração da reação eletroquímica de 60 s (garantia da estabilidade da intensidade de corrente).

No mercado existem dois exemplares de SPGE com temperaturas de deposição distintas – os eletrodos de (i) alta temperatura (AT) e (ii) baixa temperatura (BT) – cujas propriedades variam conforme a finalidade atribuída ao sistema.

Com o intuito de determinar qual o eletrodo (AT ou BT) mais eficiente para o desenvolvimento do genossensor, realizaram-se medições cronoamperométricas para testar a sensibilidade dos dois eletrodos. Para este estudo utilizou-se uma concentração de analito (i.e., de tADN) de 1 nM e duas concentrações de ADN de captura distintas: 1 μM e 10 μM.

A **figura 39** ilustra os cronoamperogramas obtidos nestes ensaios.

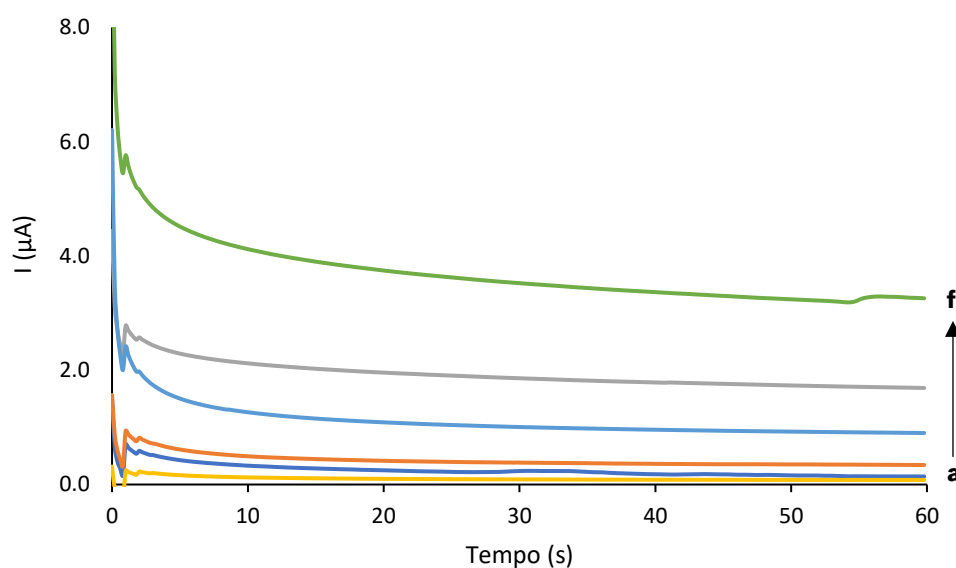


Figura 39 – Respostas cronoamperométricas obtidas no estudo da influência do tipo de eletrodo (AT ou BT) à concentração de 1 nM de tADN, mas a distintas concentrações de ADN de captura. Eletrodo (a) BT na ausência de tADN e (b) AT na ausência de tADN (ensaio em branco), (c) AT com 1 μM, (d) BT com 1 μM, (e) AT com 10 μM e (f) BT com 10 μM de ADN de captura. As respostas obtidas são o resultado da média de três ensaios.

Excluindo os ensaios em branco, dos eletrodos testados, o eletrodo AT imobilizado com 1 μM de ADN de captura apresentou a menor resposta cronoamperométrica, enquanto a maior intensidade de corrente ($I_{r,c}$) foi obtida pelo eletrodo BT imobilizado com 10 μM de ADN de captura. Comparando os registos obtidos, verifica-se que o eletrodo BT de 1 e 10 μM de ADN de captura possuem 2,64 e 1,90 vezes mais intensidade que os eletrodos AT nas respetivas concentrações de ADN de captura.

Para uma melhor interpretação dos resultados registados optou-se por representar as respostas cronoamperométricas num gráfico de barras (**figura 40**).

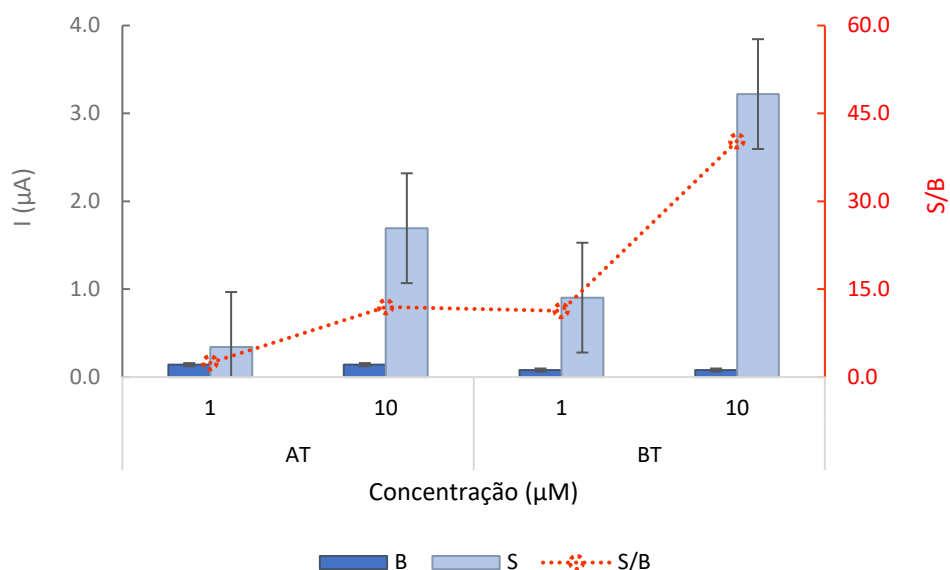


Figura 40 – Influência do tipo de eléctrodo e da concentração de 1 nM e 10 µM de ADN de captura na intensidade de corrente ($I_{n,c}$). Valores de $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

A **figura 40** mostra a influência do tipo de eléctrodo (AT ou BT) e da concentração do ADN de captura na $I_{n,c}$ obtida. Os valores apresentados são o resultado da média de três ensaios.

Como se observa na figura, a $I_{n,c}$ média obtida nos ensaios em branco em eléctrodos de AT foi de 0,14 µA, enquanto a $I_{n,c}$ registada quando se utilizou os eléctrodos de BT (sob as mesmas condições de ensaio) foi 0,08 µA. Verificou-se assim que os eléctrodos de BT interferem menos na construção do genossensor, pois permitem obter sinais electroquímicos mais baixos nos ensaios em que não se utilizou o tADN (ensaios em branco).

Analisando a figura, observa-se ainda que quando se utilizou os eléctrodos de AT obtiveram-se $I_{n,c}$ médias de 0,34 µA e de 1,69 µA para concentrações de ADN de captura de 1 µM e 10 µM, respetivamente. Por outro lado, os eléctrodos BT registaram $I_{n,c}$ médias mais elevadas, correspondendo a 0,90 µA e de 3,22 µA, para 1 µM e de 10 µM de captura, respetivamente.

O desempenho do genossensor foi avaliado através da análise da razão (S/B) entre a $I_{n,c}$ obtida nos ensaios quando se usou uma concentração de tADN de 1 nM e a $I_{n,c}$ nos ensaios em branco (i.e., quando tADN = 0 nM). Verificou-se que para os eléctrodos BT a razão S/B foi 4,67 vezes e 3,36 vezes maior do que nos eléctrodos AT nas concentrações de 1 µM e de 10 µM de ADN de captura, respetivamente.

Atendendo à evidente melhoria no desempenho do genossensor quando se usou os eléctrodos BT, tentou-se averiguar qual a influência dos métodos de deposição de Au na qualidade dos eléctrodos BT e AT. Na pesquisa efetuada, verificou-se que a empresa responsável pela produção destes eléctrodos (Metrohm) recorreu a um microscópio electrónico de varrimento (MEV) para analisar as diferenças de composição da superfície dos eléctrodos de Au quando utilizou diferentes temperatura de deposição de Au (**figura 41**).

Como se observa nas imagens da **figura 41**, o eletrodo AT apresenta uma estrutura mais compacta, i.e., apresenta uma superfície mais lisa, enquanto que o eletrodo BT possui uma superfície mais porosa e, conseqüentemente, mais rugosa. Ora, sobretudo à nanoescala, superfícies mais rugosas permitem uma maior área superficial, pelo que, para além dos poros (que facilitam a retenção do material biológico), para o mesmo volume, pode-se fixar-se mais material à superfície, o que melhora os sinais analitos (Nnamchi & Obayi, 2018; Noyce et al., 2018).

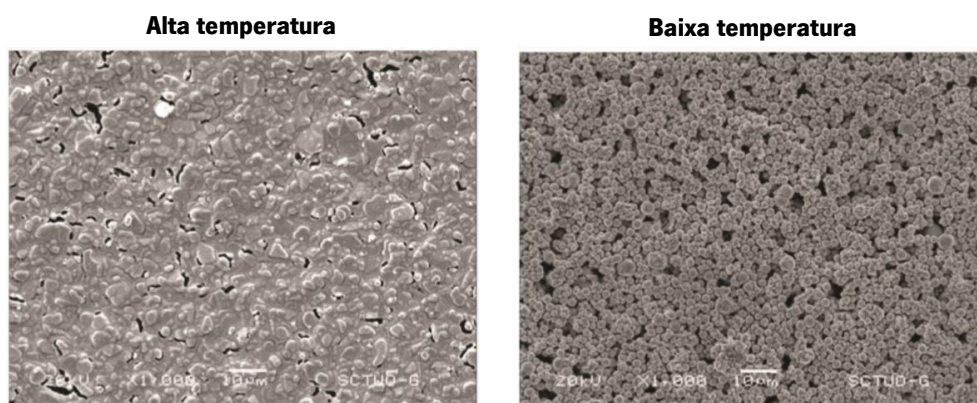


Figura 41 – Imagens MEV da superfície dos eletrodos de ouro de alta e baixa temperatura (Fonte: [ΩMetrohm](#)).

2. Procedimentos analíticos

2.1. Otimização dos parâmetros analíticos associados à construção do genossensor

A resposta analítica obtida pelo genossensor pode variar conforme as condições a que cada interveniente está sujeito (López et al., 2014). Assim, para atingir o melhor resultado experimental, vários parâmetros analíticos foram otimizados de maneira a aumentar a sensibilidade e seletividade do sensor.

Todos os ensaios relacionados com o desenvolvimento do genossensor foram realizados à temperatura ambiente (25°C).

A **tabela 13** enumera os diversos parâmetros experimentais que foram avaliados e as respetivas gamas de valores estudadas.

Tabela 13 – Variáveis analíticas otimizadas na construção do genossensor eletroquímico.

Variáveis	Valores testados
Potencial aplicado (V)	- 0,2 – 0,1
Concentração da sonda de captura (µM)	0,25 – 10,0
Concentração do MCH (µM)	0,0 – 1,0
Tempo de incubação do MCH (min)	0 – 60
Tempo da hibridação homogénea (min)	15 – 60
Concentração da sonda de ADN sinalizadora (µM)	0,13 – 0,50
Concentração do anticorpo (U/mL)	0,25 – 10,0
Tempo de incubação do anticorpo (min)	15 – 60

Tabela 13 – Variáveis analíticas otimizadas na construção do genossensor eletroquímico. Continuação.

Variáveis	Valores testados
Tempo da hibridação heterogênea (min)	30 – 120
Temperatura da reação da hibridação homogênea (°C)	25 ; 98
BSA (presença + ou ausência -)	+ BSA ; - BSA

O primeiro parâmetro a ser estudado (assim como o primeiro passo para a detecção) foi a concentração da sonda de ADN captura a imobilizar sobre a superfície do eletrodo de Au. Para determinar a influência da concentração do ADN de captura na corrente eletroquímica obtida, imobilizaram-se eletrodos BT com quatro concentrações de ADN de captura distintas: 0,25 μM ; 0,50 μM ; 1 μM e 10 μM “over night”. A **figura 42** mostra os resultados cronoamperométricos obtidos após este estudo.

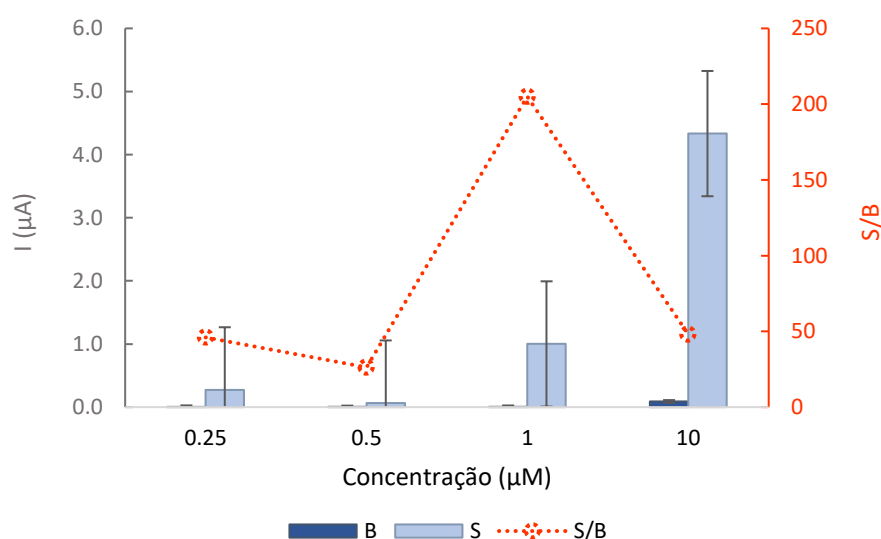


Figura 42 – Efeito da concentração da sonda de ADN de captura na resposta cronoamperométrica. Valores de I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM . Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

De acordo com a figura, o sinal eletroquímico do ensaio em branco foi maior ($9,02 \times 10^{-8}$ A) no ensaio em que se usou uma concentração de ADN de captura de 10 μM comparativamente aos ensaios de 0,25; 0,5 e 1,0 μM de concentração de ADN de captura, onde se mediu uma I_{nc} média do branco de $5,93 \times 10^{-9}$, $2,44 \times 10^{-9}$ e $4,88 \times 10^{-9}$ A, respetivamente. Este comportamento sugere que a imobilização de eletrodos com concentrações mais altas de ADN de captura seja mais suscetível à ocorrência de adsorção não específica à superfície do eletrodo (Campuzano, et al., 2011).

Analisando a razão S/B verifica-se que quando se usou ADN de captura de 1 μM se obteve a melhor razão S/B de valor 205. Por isso, para continuar o trabalho usou-se como referência ADN de captura de 1 μM .

A adição do MCH é um passo essencial para a construção do genossensor, pois para além de orientar o ADN de captura – o que facilita a hibridação do ADN alvo e do ADN *signaling* à sonda de ADN de captura já imobilizada sobre a superfície metálica do eletrodo – também vai preenchendo os espaços que permaneceram vazios (sem ADN imobilizado) à superfície do eletrodo de trabalho.

A **figura 43** ilustra a influência da concentração do MCH e do tempo de incubação no sinal eletroquímico produzido pelo genossensor. Para este estudo usaram-se várias concentrações de MCH (0; 0,25; 0,50 e 1,0 μM) a diferentes tempos de incubação de MCH (7,5; 15,0; 30,0 e 60,0 min).

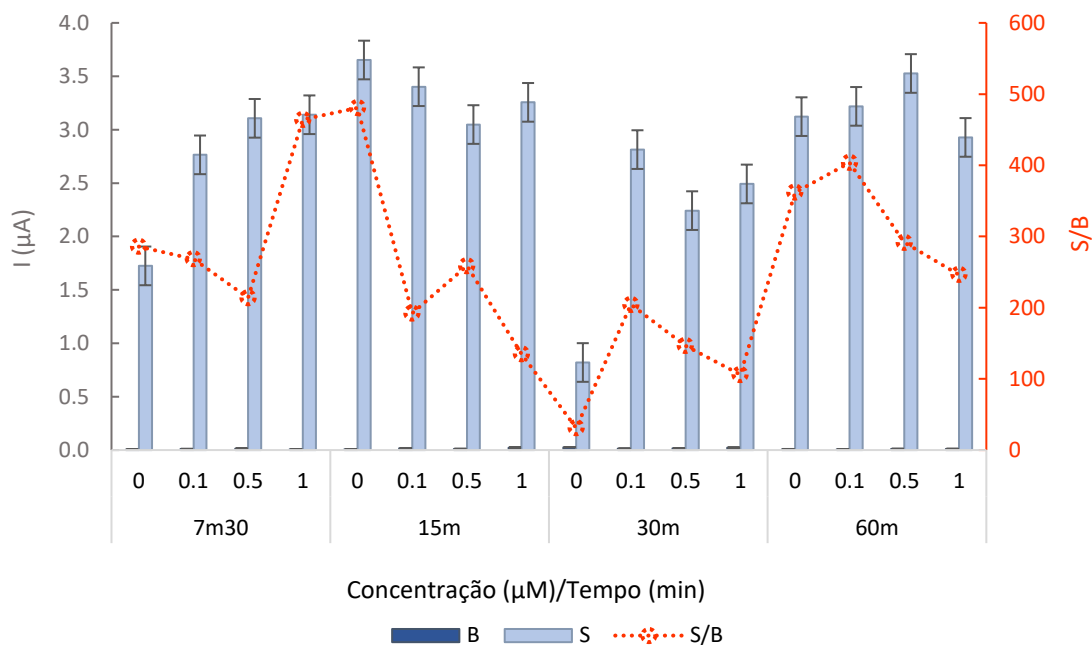


Figura 43 – Resposta cronoamperométrica obtida quando se estudou a influência da concentração e do tempo de incubação do MCH. Valores de I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM . Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

Nesta otimização, as I_{nc} obtidas para os ensaios em branco foram baixas e variaram entre os 6,03 nA (MCH = 0 μM a 7,5 min de incubação) e os 26,52 nA (MCH = 0 μM incubado durante 30 min).

Analisando a **figura 43**, verifica-se que a razão S/B variou entre 30,9 e os 481 e as I_{nc} médias variaram de 0,8 a 3,7 μA , sendo que a maior razão S/B (razão de valor 481) foi obtida no ensaio em que se usou uma concentração de MCH 0 μM incubado durante 15 min. Neste caso, acredita-se que o comprimento da sonda de captura tenha influenciado o ensaio (ver **figura 32**), uma vez que a sequência de captura possui apenas 25 pb, é provável que as sondas se tenham auto-organizado em SAM, mesmo sem a intervenção do espaçador. Todavia, considerando a fraca repetibilidade que se obteve nestes ensaios, selecionou-se para os futuros ensaios a concentração de MCH de 1 μM incubado durante 7,5 minutos (razão S/B de 464) – o segundo valor de razão S/B mais elevado – para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios.

Em anexo encontram-se os gráficos correspondentes aos ensaios individuais dos quatro períodos de incubação (7,5; 15,0; 30,0 e 60,0 min) nas respectivas concentrações de MCH (**anexo 3**).

Seguidamente otimizou-se o tempo de incubação da reação da hibridação homogênea (reação da hibridação parcial que ocorreu entre a sonda de ADN alvo e a sonda de ADN de sinalização) ao estudar-se diferentes tempo de reação, que qualificou tempos entre os 15 e os 60 minutos (**figura 44**).

Conforme se pode ver na **figura 44**, a maior razão S/B (valor de 396) foi atingida após 30 minutos de hibridação homogênea e a I_{nc} média dos ensaios em branco foi de 7,92 nA.

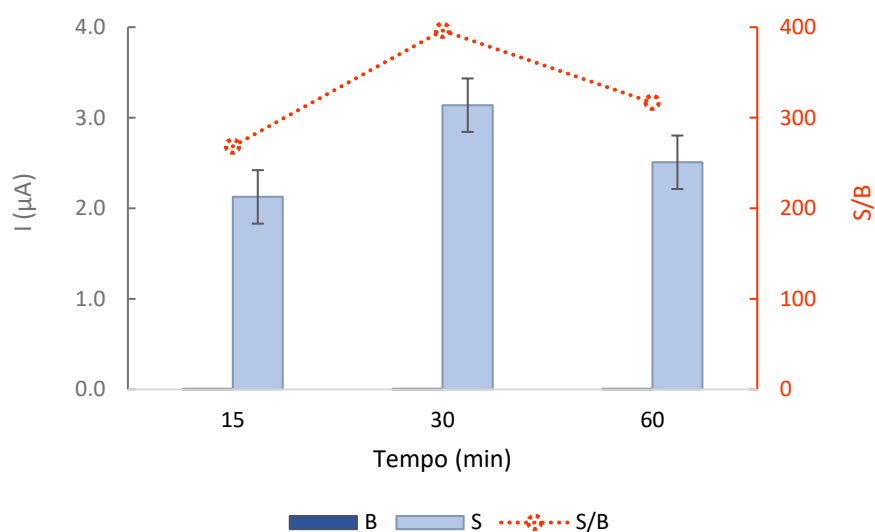


Figura 44 – Respostas cronamperométricas obtidas nos ensaios de otimização do tempo de reação da hibridação da solução homogênea. Valores de I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN de captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM . Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

Posteriormente, avaliou-se a influência da concentração do ADN *signaling* na eficácia da reação da hibridação homogênea. A **figura 45** mostra a variação dos sinais cronamperométricos obtidos nestes ensaios a diferentes concentrações de ADN sinalizador (0,13; 0,25 e 0,50 μM).

Verificou-se que as I_{nc} médias dos brancos foi de 16,45 nA e a melhor razão entre S/B (razão máxima de 190) foi obtida quando se usou uma concentração de ADN *signalling* de 0,25 μM .

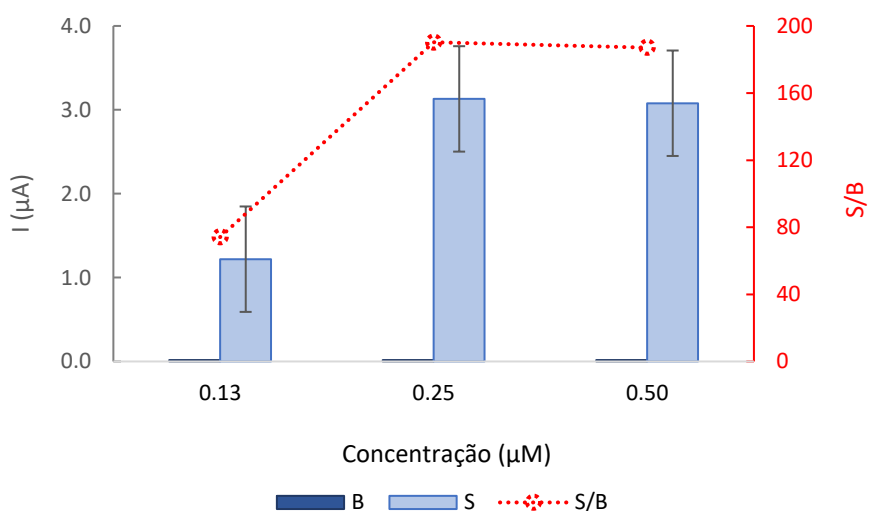


Figura 45 – Respostas cronamperométricas obtidas na otimização da concentração da sonda de ADN sinalizadora. Valores de I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

Para que a reação de hibridação homogênea ocorra, primeiro ambas as sondas (alvo e *signaling*) têm que romper as estruturas secundárias (ver **tabela 10** e **figura 32**) e de seguida, conforme a sua complementaridade, estas sondas têm que se ligar, de forma natural e espontânea, de forma antiparalelas (estrutura em hélix característica do ADN). De acordo com a literatura, o aumento da temperatura influencia a eficácia desta reação uma vez que auxilia a aberturas das sondas de ADN (Sousa et al., 2020). Neste sentido e de modo a estudar a influência da temperatura na reação da hibridação homogênea no desempenho do genossensor, esta reação foi realizada à temperatura ambiente (25 °C) e a 98 °C (temperatura de desnaturação do ADN que agiliza a abertura do ADN, sobretudo das suas estruturas secundárias, neste caso do tADN e da ADN *signaling*).

A **figura 46** ilustra a influência da temperatura na reação da hibridação homogênea. A I_{nc} médias dos ensaios em branco foi de 24,30 nA. Observou-se que a maior razão S/B (valor de 211) foi obtida à temperatura ambiente (25 °C).

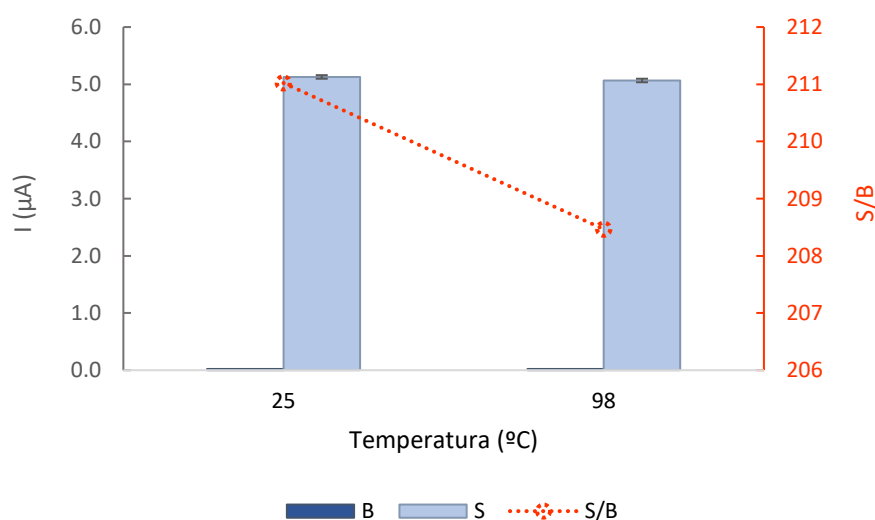


Figura 46 – Resposta cronoamperométrica obtida na otimização da temperatura da reação da hibridação homogênea. Valores da I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μ M, durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

A BSA é uma proteína bastante usada como agente bloqueador (evita as adsorções inespecíficas) de superfícies em ensaios biológicos, pois, por norma, melhora a razão S/B (Sousa et al., 2020). No entanto, neste trabalho, a adição de BSA, à temperatura ambiente, na etapa da hibridação homogênea apresentou um efeito negativo ao diminuir a I_{nc} eletroquímica.

Como indica a **figura 47**, a adição do BSA não contribuiu para o aumento do sinal; uma razão de S/B de 398 foi obtida na ausência de BSA, enquanto que uma razão S/B de 264 foi calculada na presença de BSA. Este facto também se relaciona com o comprimento das sondas escolhidas. Uma vez que a sonda alvo e sua complementar têm apenas 70 pb dificilmente se formam estruturas secundárias fortes que possam comprometer os processos de hibridização. Portanto, as próximas etapas foram realizadas na ausência deste agente bloqueador.

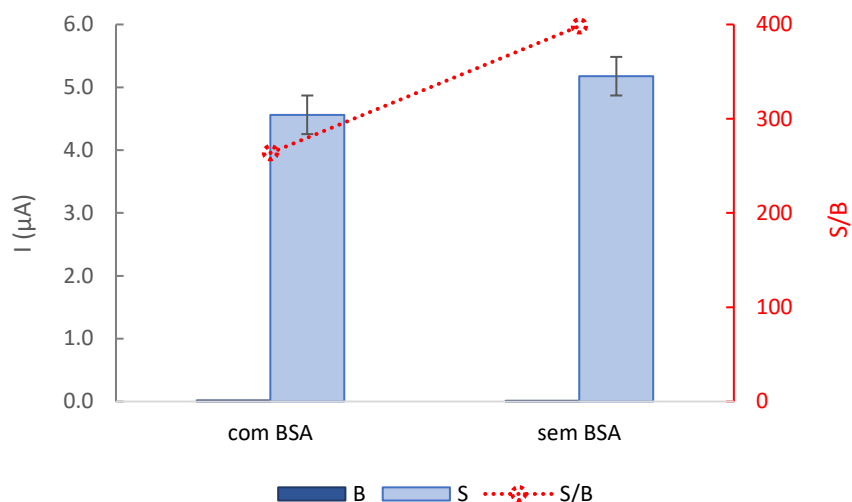


Figura 47 – Respostas cronoamperométricas obtidas na presença e ausência de BSA na reação da hibridação homogênea. Valores da I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, e dos ensaios com sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN de captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM , durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

A otimização do tempo da reação da hibridação heterogênea (reação entre a ssADN imobilizada no eletrodo e o ADN proveniente da reação da hibridação homogênea) foi realizada promovendo-se a reação entre o ADN de captura e o produto da hibridação homogênea por 30; 60 e 120 minutos.

Conforme se observa na **figura 48**, à medida que o tempo da reação aumenta, aumenta também a razão S/B, obtendo-se o valor mais alto de S/B (320) aos 120 minutos. Porém, de modo a encurtar a duração de todo o ensaio da construção do genossensor, selecionou-se um tempo de 60 minutos para os futuros ensaios.

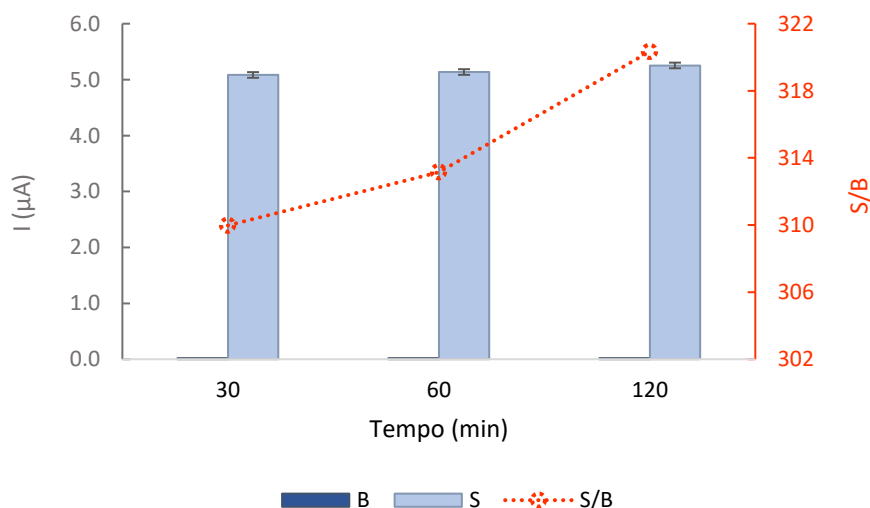


Figura 48 – Respostas cronoamperométricas obtidas na otimização do tempo da reação da hibridação heterogênea. Valores da I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração e tempo de atuação do ADN sinalizador = 0,25 μM , durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

A **figura 49** evidencia a otimização da concentração (**figura 49 A**) e do tempo de incubação (**figura 49 B**) do anticorpo Anti-FITC-POD usado na etapa da detecção eletroquímica.

Observando a figura, verifica-se que, tal como nas otimizações anteriores, se obtiveram $I_{p,c}$ médias dos ensaios em branco baixas e na gama dos 30 nA. Os ensaios que proporcionaram maiores razões S/B foram aqueles em que se usou uma concentração de Anti-FITC-POD de 1,5 U/ml (S/B = 106) incubado durante 30 minutos (S/B = 193).

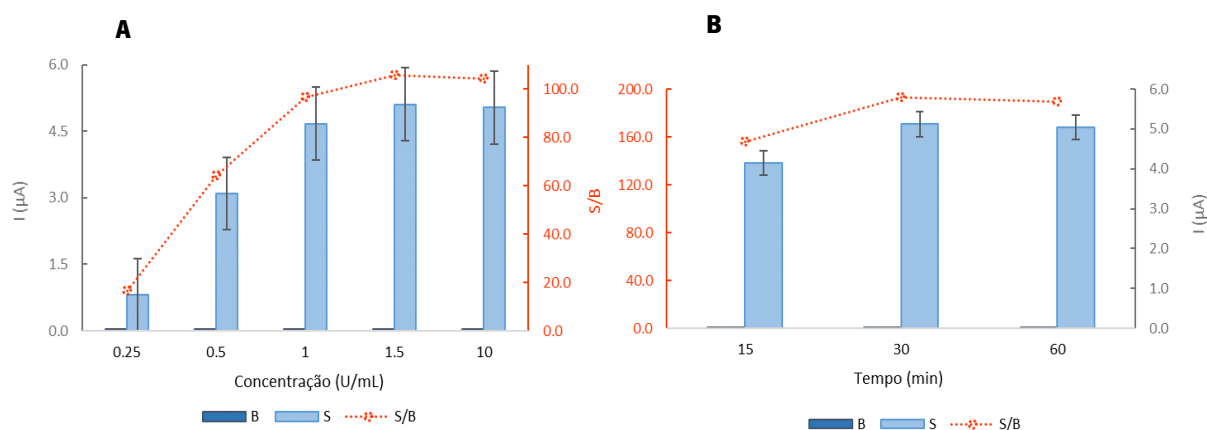


Figura 49 – Respostas cronoamperométricas obtidas na otimização da **(A)** concentração do anticorpo anti-FITC-POD e **(B)** tempo de incubação do anti-FITC-POD. Valores de $I_{p,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, e dos ensaios com a sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μ M; concentração e tempo de atuação do MCH = 1,0 μ M, durante 7,5 min; concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM e concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μ M, durante 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

A **tabela 14** resume os parâmetros analíticos selecionados neste trabalho.

Tabela 14 – Valores selecionados para a construção do genossensor eletroquímico.

Variáveis	Valores testados	Valor selecionado
Potencial aplicado (V)	- 0,2 – + 0,1	- 0,1
Duração da reação eletroquímica (min)	0,0 – 2,0	1,0
Concentração da sonda de captura (μ M)	0,25 – 10,0	1,0
Concentração do MCH (μ M)	0,0 – 1,0	1,0
Tempo de incubação do MCH (min)	0 – 60	7,5
Tempo da hibridação homogénea (min)	15 – 60	30
Concentração da sonda de ADN sinalizadora (μ M)	0,13 – 0,50	0,25
Concentração do anticorpo (U/mL)	0,25 – 10,0	1,5
Tempo de incubação do anticorpo (min)	15 – 60	30
Tempo da hibridação heterogénea (min)	30 – 120	60
Temperatura da reação da hibridação homogénea ($^{\circ}$ C)	25 ; 98	25
BSA (presença +; ausência -)	+ BSA ; - BSA	- BSA

2.1.1. Caracterização eletroquímica do genossensor desenvolvido

Nas condições experimentais otimizadas (ver **tabela 14**), avaliou-se o efeito do aumento da concentração do tADN (analito) sintético, de 0,06 a 6,25 nM, no sinal analítico obtido através da determinação da corrente cronoamperométrica (**figura 50 A**). Uma relação linear entre a concentração do ADN alvo e a I_{nc} (subtraída do branco, I_{net}) foi obtida no intervalo de concentrações de [0,12;1,00] (**figura 50 B**), cuja equação de reta (**figura 50 C**) calculada foi de:

$$I_{net} = 2,271 \pm 0,028 [tADN] + 0,157 \pm 0,014 (\mu A) \quad (\text{equação 4})$$
$$R^2 = 0,9995$$

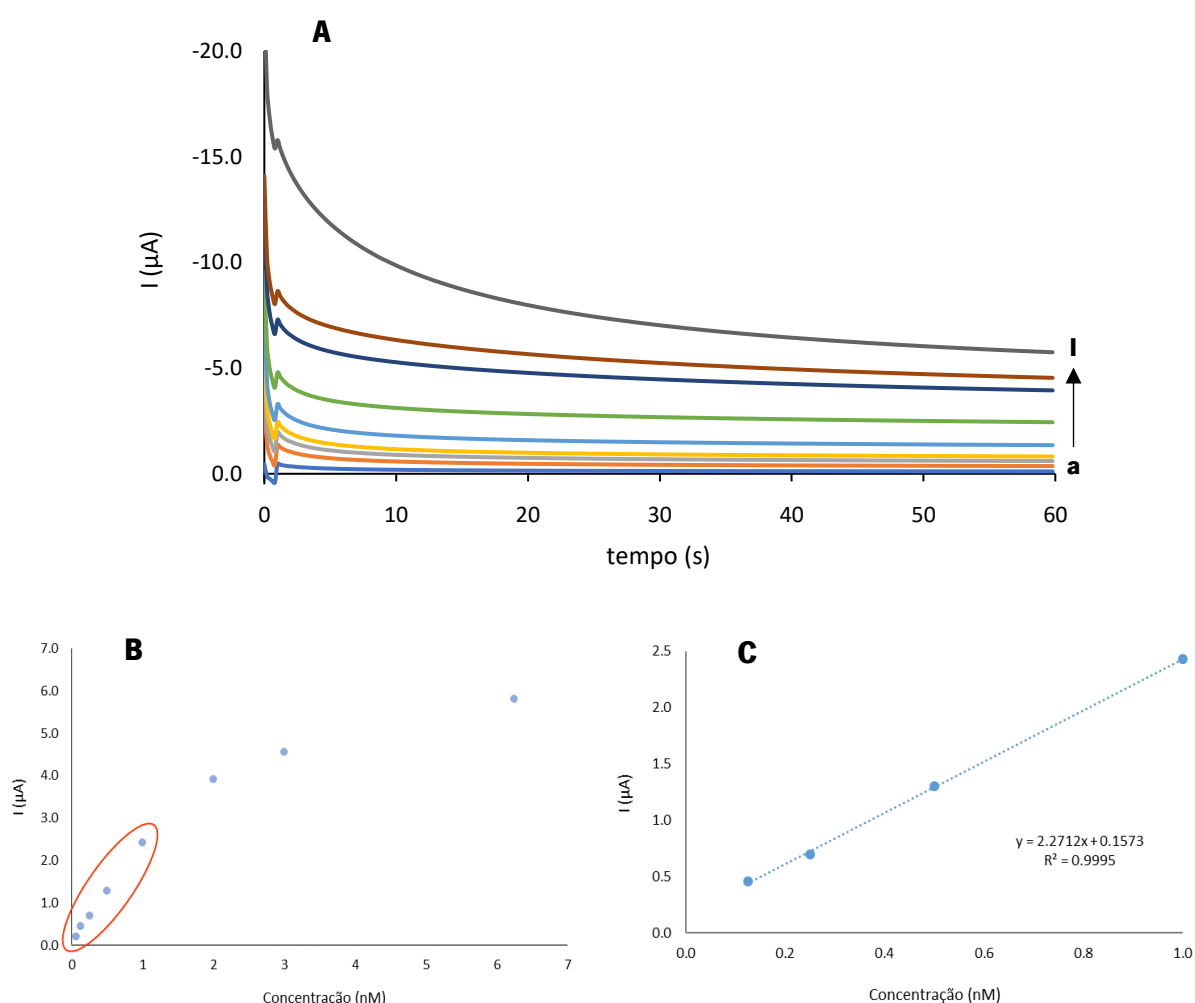


Figura 50 – Curvas cronoamperométricas obtidas nas condições experimentais ótimas na (a) ausência e à concentração de (b) 0,06; (c) 0,12; (d) 0,25; (e) 0,50; (f) 1,00; (g) 2,00; (h) 3,00 e (i) 6,25 nM de tADN; **B** Relação linear entre a concentração do ADN alvo e a I_c ; e **C** a curva de calibração correspondente ao intervalo de concentração de tADN 0,12 a 1,00 nM. As respostas obtidas são o resultado da média de três ensaios.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) calculados como três vezes e dez vezes o desvio padrão do ensaio em branco dividido pelo declive da reta de calibração foram 0,03 nM e 0,08 nM, respetivamente.

A precisão do genossensor eletroquímico foi avaliada utilizando 1,0 nM de tADN. A repetibilidade foi determinada fazendo-se medições com vários elétrodos e a reprodutibilidade foi avaliada pela realização de três medições em cinco dias consecutivos.

A repetibilidade e a reprodutibilidade expressas como o desvio padrão relativo foram de 5,39 % e 4,12 %, respetivamente.

A **tabela 15** resume a análise às características eletroquímicas do genossensor.

Tabela 15 – Caracterização dos parâmetros analíticos do genossensor desenvolvido.

Parâmetros	Resultados
Linearidade (nM)	0,120 – 1,000
Declive	2,271
Interseção	0,157
Coefficiente de correlação (R)	0,999
Desvio padrão do declive	0,028
Desvio padrão da interseção	0,014
LD (nM)	$2,478 \times 10^{-2}$
LQ (nM)	$8,260 \times 10^{-2}$
Repetibilidade ¹ (%)	5,385
Reprodutibilidade ¹ (%)	4,116
Precisão total (%)	5,159

¹ – n = 5.

Após a construção, o desenvolvimento e a otimização do genossensor, fez-se a preparação das amostras reais.

2.2. Preparação das amostras reais

2.2.1. Extração e quantificação do ADN extraído

Neste trabalho extraiu-se o ADN de 3 amostras reais: 2 dinoflagelados, *Alexandrium minutum* e *Lingulodinium polyedrum*, e das células animais do epitélio oral usando-se o kit comercial MasterPure™.

A qualidade e a quantidade de ADN genómica extraída destes organismos é fundamental para a eficácia da etapa de corte e amplificação da sequência de ADN pretendida (70 pb) pois, quanto mais concentrado estiver o ADN genómico extraído maior é a probabilidade de se amplificar a sequência de ADN pretendida,

A quantificação do ADN por espectrofotometria foi realizada por medição da quantidade de radiação absorvida pelo ADN no comprimento de onda de 260 nm. Porém, é vulgar que amostras com ácidos nucleicos estejam contaminadas com outras moléculas como é o caso, das proteínas, compostos orgânicos, etc. Por isso, determinou-se a pureza (qualidade) do ADN através do cálculo da razão entre a absorbância a 260 nm obtida e a absorbância a 280 nm na mesma solução de ADN (pureza = Abs 260nm/Abs 280 nm).

Para soluções contendo dsADN, uma razão de 260 nm/280 nm de 1,8 indica que a amostra tem um elevado grau de pureza e contém uma elevada percentagem de ácidos nucleicos. Quando a razão da Abs 260/280 apresenta valores inferiores a 1,8 normalmente é indicação da contaminação da amostra com proteínas, fenóis, ARN, entre outros compostos que também absorvem ao comprimento de onda de 260 nm (Wilfinger et al., 1997; Thermo Fisher Scientific, 2010).

A **tabela 16** mostra os resultados obtidos na quantificação do material de ADN extraído a partir das células da *Alexandrium minutum*, *Lingulodinium polyedrum* e do epitélio oral. No **anexo 4** encontra-se o cálculo detalhado efetuado na determinação da concentração do ADN.

Tabela 16 – Resultados obtidos da quantificação do ADN extraído pelo kit comercial MasterPure™. A5 = réplica 5 das células cultivadas em meio Z8; A7 = réplica 7 das células cultivadas em meio Z8; Alg7 = amostra 7 do dinoflagelado da costa algarvia; H = amostra 1 das células do epitélio oral. Os valores apresentados resultam da média de 4 leituras no Nanodrop para a quantificação do ADN extraído.

	A5	A7	Alg 7	H
Abs (260 nm)	0,942	0,961	3,291	1,437
260/280	1,810	1,813	1,850	1,820
[ng/μL]	47,13	48,01	164,53	71,90

A elevada densidade populacional das amostras da HAB do Algarve é evidente, pois apresenta uma elevada concentração de ADN (164,53 ng/μL, depois de diluída 2 vezes). Porém, esta solução registou uma razão de absorvância de 1,850 (razão >1,8) o que, apesar de não ser o ideal, continua a ser um bom grau de pureza.

Por outro lado, as amostras A5 e A7 extraídas do frasco de cultura 1 e 3 do meio Z8, respetivamente, registaram uma concentração total de ADN genómico extraído muito inferior (47,13 e 48,01 ng/μL) ao ADN extraído da amostra proveniente da maré vermelha do Algarve. Contudo, apresentam um maior grau de pureza – razões (Abs 260 nm/Abs 280 nm) \approx 1,8.

2.2.2. Amplificação da sequência do ADN de interesse específico

Após a extração do ADN genómico das amostras reais e determinada a quantidade e qualidade do mesmo, realizou-se a amplificação do ADN por PCR – técnica da biologia molecular usada para amplificar, i.e., fazer cópias de uma região específica do ADN de interesse. Neste caso, através de um termociclador, o ADN extraído foi clivado num fragmento da região pretendida (70 pb), ou seja, foi cortada a sequência de ADN específica que identifica o género *Alexandrium minutum*.

De modo a obter muitas cópias da sequência pretendida do ADN extraído, os parâmetros analíticos associados ao processo de amplificação foram otimizados.

A **tabela 17** resume as variáveis testadas e os respetivos valores otimizados.

Tabela 17 – Parâmetros analíticos testados e otimizados durante a etapa de amplificação da sequência de ADN por PCR.

Variável	Valores testados	Valor ótimo
Temperatura de annealing (°C)	55 – 62	60
Concentração de Mg (μL)	2,5 – 4,5	3,0
Concentração de Taq,	0,25; 1,25	0,25
Duração do annealing (s)	30 – 45	30
Número de ciclos	30; 35	35

Após o processo de amplificação da sequência de interesse, recorreu-se à técnica de eletroforese em gel para confirmar a eficácia de cada amplificação efetuada.

A eletroforese em gel é uma técnica usada para separar fragmentos de ADN com base no tamanho e carga dos mesmos, pelo que este processo envolve a passagem de uma corrente através do gel onde estão retidas as cadeias de ADN amplificadas por PCR. Em função do seu tamanho e carga, os fragmentos de ADN migram através do gel (normalmente num gel de agarose) a diferentes velocidades, permitindo separar os fragmentos conforme o comprimento das suas bases; quanto maior o fragmento de ADN, menor a distância que percorrerá no poço de gel e vice-versa. Nestes estudos, a eletroforese correu durante 45 – 55 minutos, a uma corrente constante de 100 V.

A **figura 51** mostra uma fotografia obtida no final da realização da eletroforese às amostras deste estudo que foram amplificadas por PCR.

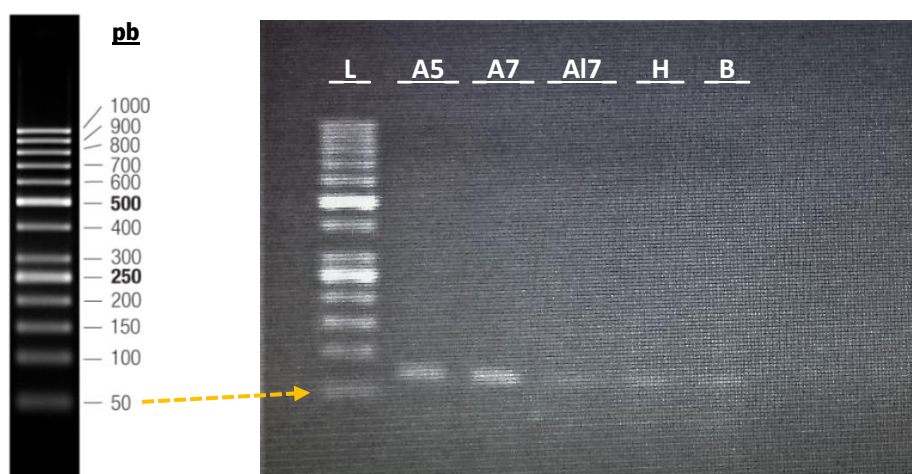


Figura 51 – Escala da marcação do ADN padrão (A) do padrão de 50 pb e (B) das bandas resultantes da eletroforese do ADN amplificado, a 0,08s de emissão.

De modo a se observar as bandas resultantes da corrida das cadeias de ADN, recorreu-se a um marcador de ADN, designado Ladder (L), cuja marcação auxilia na visualização da migração dos fragmentos de ADN ao longo do gel de agarose. Este marcador é constituído por plasmídeos que limitam 13 fragmentos no gel a diferentes pesos moleculares – marcação entre os 50 e 1000 pb. A marcação dos 250 e 500 pb apresentam uma maior intensidade do que as restantes, pois servem de indicadores da progressão, ou seja, são os indicadores de referência da banda padrão (**figura 51 A**).

Comparando as bandas obtidas com a banda padrão, verifica-se que o ADN amplificado se encontra entre as bandas dos 50 e 100 pb (**figura 51 B**), resultado conforme o previsto (uma vez que a sequência de ADN utilizada neste trabalho possui 70 pb).

Terminados todos os ensaios referentes às etapas da biologia molecular (extração e amplificação do ADN), as amostras reais foram aplicadas ao genossensor para confirmar e validar a eficiência do próprio na detecção de sequências do ADN proveniente de amostras reais.

2.3. Avaliação do genossensor eletroquímico na detecção de ADN de amostras reais

O genossensor eletroquímico desenvolvido e otimizado neste trabalho foi usado para detetar as sequências de ADN extraídas e amplificadas das células dos dinoflagelados *A. minutum* e *L. polyedrum* e das células humanas do epitélio oral.

Visto que o produto de PCR é essencialmente constituído por dsADN, foi necessário fazer um processamento de desnaturação ao ADN amplificado, através da realização de um aquecimento da amostra a 98°C por 5 minutos, seguido de um arrefecimento imediato num banho de gelo, também por 5 minutos. Este procedimento é obrigatório devido à natureza da cadeia dupla dos amplicons.

De seguida, 20 µL do gene amplificado, diluído 1:50, foi adicionado a uma solução contendo a sonda sinalizadora – hibridização homogénea. Depois da reação da hibridização heterogénea (à temperatura ambiente, durante 60 minutos), o sinal eletroquímico foi registado.

A **figura 52** apresenta os resultados eletroquímicos obtidos quando se usou o ADN amplificado das amostras reais como analito.

Como se observa na **figura 52**, as $I_{p,c}$ mais altas (na gama dos 3,0 – 5,0 µA) foram obtidas quando se usou o ADN amplificado das culturas *A. minutum* (amostras A5, A7 e Sn) como analito. Por outro lado, o ADN amplificado das células algarvias e humanas (Alg e H, respetivamente) registaram sinais eletroquímicos baixos; na mesma ordem de grandeza dos sinais dos ensaios em branco. Estes resultados prendem-se com o facto do ADN amplificado das culturas *A. minutum*, ser completamente complementar ao ADN que se encontra imobilizado na superfície do eléctrodo de trabalho – o ADN de captura – e ao ADN que se encontra marcado, ocorre (na sua totalidade) a reação de hibridação entre as duas cadeias de ADN complementar, enquanto o ADN amplificado da *L. polyedrum* e do epitélio não conseguem hibridizar com as sondas sinalizadora e de captura, uma vez que não apresentam complementariedade de bases, logo não geram nenhuma corrente elétrica.

Para além disso, também se verifica que a influência dos reagentes do PCR é desprezível na corrente analítica e que não há reatividade cruzada com outro ssADN curto presente na amostra.

Confirma-se, assim, que o genossensor eletroquímico construído consegue discriminar com uma elevada precisão o ADN de amostras, pela complementariedade do ADN das amostras reais (amostras A5 e A7) e sintética (amostra Sn) de *A. minutum* e pela não complementariedade do ADN proveniente da *L. polyedrum* (amostra Alg) e do epitélio oral (amostra H).

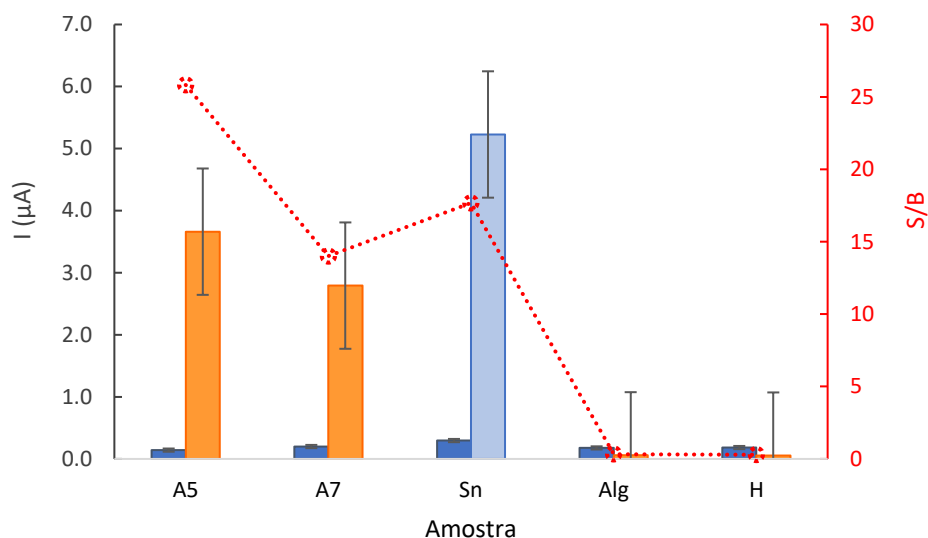


Figura 52 – Detecção eletroquímica do ADN proveniente de amostras reais. Valores da $I_{n,c}$ dos ensaios em branco, B, a azul escuro, e dos ensaios da sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro, das amostras reais a laranja e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de incubação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM , durante 30 min e concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-FITC-POD = 1,5 U/mL, a 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

Para confirmar o grau de seletividade e sensibilidade do genossensor, várias diluições das amostras de ADN amplificadas foram testadas nos ensaios eletroquímicos.

Como se verifica na **figura 53**, para as várias concentrações (correspondente às diferentes diluições) do ADN amplificado, obtiveram-se sinais eletroquímicos distinguíveis do ensaio em branco. Sendo que, quanto maior a diluição (menor concentração) da amostra menor foi a resposta analítica obtida. Assim, mesmo quando se usou o maior fator de diluição (1:50) o sinal eletroquímico foi 15 vezes superior à corrente elétrica medida no ensaio em branco. Da mesma forma, a diluição mínima (1:5) também permitiu a detecção direta da *A. minutum*.

Estes resultados indicam que o genossensor eletroquímico responde a diferentes concentrações de ADN (das culturas amplificadas) sem interferências dos reagentes utilizados na etapa de amplificação, pelo que, não é necessário purificar as amostras, mesmos quando se usa altos volumes de mistura de PCR, pois o genossensor apresenta uma grande sensibilidade.

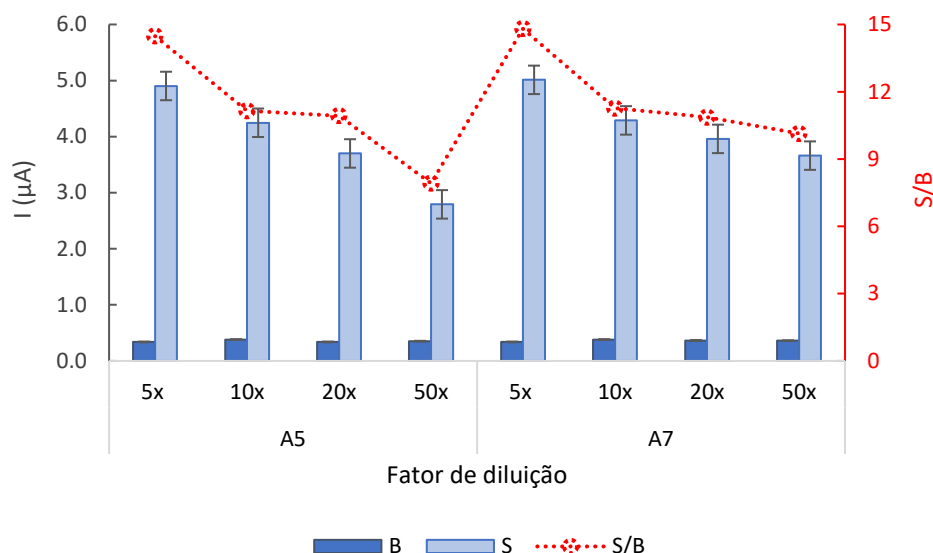


Figura 53 – Influência da diluição do ADN amplificado das culturas *Alexandrium minutum* no sinal eletroquímico obtido. Valores da I_{nc} dos ensaios em brancos, B, a azul escuro, dos ensaios com o ADN amplificado a azul claro e da razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração do ADN de captura = 1,0 μM ; concentração e tempo de incubação do MCH = 1,0 μM , durante 7,5 min; concentração e tempo de atuação da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM , durante 30 min e concentração e tempo de incubação do anticorpo anti-FITC-POD = 1,5 U/mL, a 30 min. Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

3. Comparação com a literatura

Apesar dos inúmeros artigos referentes à detecção de microrganismos por genossensores eletroquímicos, tanto quanto se pode constatar, não existe nenhum que protagonize a *Alexandrium minutum*. Metfies, et al., 2004, estudou a detecção da *Alexandrium ostenfeldii*, através de genossensores eletroquímicos e comparou os resultados de hibridização com estripes da *Alexandrium minutum*. O procedimento experimental adotado, em particular, os passos de imobilização e hibridação das sondas é relativamente semelhante ao procedimento deste projeto, contudo, os parâmetros otimizados e o método de detecção da hibridização não foram os mesmos. Também, nesse artigo apenas estudaram o ARN e não o ADN das amostras reais.

Como se referiu na **tabela 1**, o PCR é um excelente método de detecção de ácidos nucleicos, porém apresenta limitações na quantificação, pois, por si só, o PCR convencional não consegue determinar a concentração de ADN numa solução. Para preparar as misturas de PCR, o processo tem que passar pela espectroscopia – para definir a concentração de ADN exata (amostra/mL) necessária para as misturas.

Comparando as duas técnicas (PCR convencional e genossensores eletroquímicos), confirma-se a maior eficiência dos sensores, pois, para além, de nos indicar se ocorreu ou não a hibridização, também nos informam sobre concentração do ADN presente na mistura. Neste caso, em vez de compramos os dois (PCR com os genossensores eletroquímicos), é melhor acoplá-los. Como em Verma et al., 2013 a adição das sondas amplificadas no genossensor apresentam maior seletividade e especificidade.

Capítulo 5 – Conclusões

1. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido um genossensor eletroquímico descartável, montado numa superfície de ouro, capaz de detetar a microalga *Alexandrium minutum* com uma elevada sensibilidade e seletividade.

A construção do genossensor foi realizada com base na criação, na superfície de ouro, de uma SAM mista constituída por compostos tiolados – o ADN de captura tiolado (SH-ADN) e o MCH. De modo a aumentar a seletividade, realizou-se a reação de hibridação em formato “sandwich”, a amplificação do sinal eletroquímico através de uma enzima (POD) e usou-se a cronoamperometria para detetar as correntes elétricas.

Todos os parâmetros otimizados contribuíram para a diminuição do limite de deteção do sensor, ou seja, potenciaram a sua sensibilidade de deteção, pelo que o genossensor eletroquímico mostrou um bom desempenho, com alta repetibilidade e reprodutibilidade (5,39 % e 4,12 %, respetivamente) e ainda um LD e LQ na gama dos 0,03 nM e dos 0,08 nM, respetivamente.

A utilização de ADN, extraído e amplificado por PCR, proveniente de 3 amostras biológicas distintas (culturas puras de *Alexandrium minutum*, de uma maré vermelha ocorrida no Algarve a 16 de junho de 2019, contendo os dinoflagelados *Lingulodinium polyedrum* e células humanas do epitélio oral) permitiu validar e realçar a seletividade e sensibilidade do genossensor.

O genossensor mostrou-se altamente seletivo, pois permitiu detetar ADN proveniente de culturas *Alexandrium minutum* (ADN complementar aos oligonucleotídeos utilizados na construção do sensor) enquanto para as amostras de ADN não complementar (*L. polyedrum* e humano) o sensor não desenvolveu nenhuma resposta analítica (sinal eletroquímico semelhante ao sinal obtido nos ensaios em branco). Por outro lado, a deteção de diferentes diluições de ADN da *A. minutum* no genossensor eletroquímico confirmou a sensibilidade do sensor.

Assim, a facilidade de manusear torna, os genossensores uma ferramenta analítica promissora e de baixo custo para monitorizar a presença de *A. minutum* em culturas puras, no mar e em tanques de aquacultura.

2. Limitações

A maior limitação do sensor desenvolvido é a necessidade de haver uma pré-amplificação do material genético na deteção de amostras reais. A sensibilidade do sensor e a sua capacidade em formar SAM advém do comprimento reduzido (70pb) das sondas em estudo, porém, amostras reais possuem sequências com milhares de pb o que não só dificulta a hibridização como também pode obstruir o sensor. Este pré-requisito ainda compromete um dos principais objetivos deste projeto: a diminuição do tempo de deteção. Contudo, visto que o sensor terá como finalidade a deteção precoce dos microrganismos tóxicos de HAB, com especial interesse nos sistemas de aquacultura, é possível realizar todo o processo em tempos espaçados.

3. Perspetivas futuras

De modo a baixar o LD do genossensor desenvolvido, pretende-se modificar a etapa da deteção eletroquímica e utilizar nanopartículas (de ouro ou prata) para amplificar o sinal analítico obtido durante a reação de hibridação e testar o método de pré-tratamento dos elétrodos adotado por López et al., 2014 no seu estudo; após o pré-tratamento, os SPGE foram mergulhados em ácido sulfúrico e submetidos a uns varrimentos por voltametria cíclica.

Futuramente, tenciona-se desenvolver um genossensor capaz de detetar a cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, para a qual já se recolheu amostras reais. A construção deste novo genossensor utilizará nanopartículas de ouro eletrodepositadas na superfície do elétrodo de maneira a aumentar a área superficial do elétrodo e, assim, diminuir o LD.

Posteriormente pretende-se, também, criar multisensores capaz de reconhecer e distinguir o sinal de várias espécies de distintas e em simultâneo, tais como o dos dinoflagelados e de cianobactérias.

Acima de tudo, pretende-se que os dispositivos desenvolvidos sejam testados e utilizados *in situ* na eventualidade da ocorrência de uma HAB na costa ou em águas aquícolas portuguesas.

Bibliografia

- “Dinoflagellate” (2008) *New World Encyclopedia*.
- “Identifying harmful marine dinoflagellates – *Alexandrium ostenfeldii*” (2017) Department of botany, Nacional Museum of Natural History, Smithsonian Institution.
- “Microbiological diagnostics: will molecular tests replace conventional methods?” (2017) *Biametrics*.
- Aasen, J., MacKinnon, S.L., LeBlanc, P., Walter, J.A., Hovgaard, P., Aune, T. & Quilliam, M.A. (2005) Detection and identification of spirolides in norwegian shellfish and plankton. *Chemical Research in Toxicology*, **18**, pp. 509–515.
- Aasen, J.A., Hardstaff, W., Aune, T. & Quilliam, M.A. (2006) Discovery of fatty acid ester metabolites of spirolide toxins in mussels from Norway using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **20**, pp. 1531–1537.
- Acres, J. & Gray, J. (1978) Paralytic shellfish poisoning. *Canadian Medical Association Journal*, **119(10)**, p. 1195.
- Alaska Division of Public Health, Prevention Promotion Protection (2012) *Paralytic Shellfish Poisoning Fact Sheet*. Section of Epidemiology, Anchorage, Alaska, pp. 1–2.
- Alaswad, A., Dassisti, M., Prescott, T. & Olabi, A.G. (2015) Technologies and developments of third generation biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **51**, pp. 1446–1460.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2015) *Molecular Biology of the Cell*, 6th Edition, New York, Garland Science.
- Alfonta, L., Bardea, A., Khersonsky, O., Katz, E. & Willner, I. (2001) Chronopotentiometry and faradaic impedance spectroscopy assignal transduction methods for the biocatalytic precipitation of an insoluble product on electrode supports: routes for enzyme sensors, immunosensors and DNA sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, pp. 675–687.
- Almandoz, G.O., Montoya, N.G., Hernando, M.P., Benavides, H.R., Carignan, M.O. & Ferrario, M.E. (2014) Toxic strains of the *Alexandrium ostenfeldii* complex in southern South America (Beagle Channel, Argentina). *Harmful Algae, Elsevier*, **37**, pp. 100–109.
- Alves, R.C., Barroso, M.F., González-García, M.B., Oliveira, M.B.P.P. & Delerue-Matos, C. (2016) New Trends in Food Allergens Detection: Toward Biosensing Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56(14)**, pp. 2304–2319.
- Alves-Balvedi, R.P., Caetano, L.P., Madurro, J.M. & Brito-Madurro, A.G. (2016) Use of 3,3',5,5' tetramethylbenzidine as new electrochemical indicator of DNA hybridization and its application in genosensor. *Biosensors and Bioelectronics, Elsevier*, **85**, pp. 226–231.
- Anderson, D.M. (1989) *Toxic algal blooms and red tides: a global perspective*. In: Okaichi, T., Anderson, D.M. & Nemoto, T. (eds.) *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, New York, pp. 11–16.
- Anderson, D.M., Alpermann, T.J., Cembella, A.D., Collos, Y., Masseret, E. & Montresor, M. (2012) The globally distributed genus *Alexandrium*: Multifaceted roles in marine ecosystems and impacts on human health. *Harmful Algae, Elsevier*, **14**, pp. 10–35.
- Ayers, K., Rhodes, L., Tyrrell, J. & Scholin, C. (2005). International Accreditation of Sandwich Hybridisation Assay Format DNA Probes for Micro-Algae. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **39**, pp. 1225–1231.
- Backer, L. & McGillicuddy, D. (2006) Harmful algal blooms. *Oceanography*, **19(2)**, pp. 94–106.
- Balech, E. & Tangen, K. (1985) Morphology and taxonomy of toxic species in the *tamarensis* group (Dinophyceae): *Alexandrium excavatum* (Baarud) comb. nov. and *Alexandrium ostenfeldii* (Paulsen) comb. nov. *Sarsia*, **70(4)**, pp. 333–343.
- Balech, E. (1989) Redescription of *Alexandrium minutum* Halim (Dinophyceae) type species of the genus *Alexandrium*. *Phycologia*, **28(2)**, pp. 206–211.
- Balech, E. (1995) *The genus Alexandrium Halim (Dinoflagellata)*. Sherkin Island Marine Station, Sherkin Island, Co., Cork, Ireland.
- Barata, C. (2017) *Comparative genomic analyses of cyanobacteria*. Tese de mestrado em Biologia Evolutiva e do Desenvolvimento, Departamento de Engenharia Geográfica, Geofísica e Energia, Universidade de Lisboa.
- Bates, S.S. & Trainer, V.L. (2006) *The Ecology of Harmful Diatoms*. In: Granéli E. & Turner J.T. (eds.) *Ecology of Harmful Algae*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, **189**, pp. 81–93.
- Batoréu, M.C.C., Dias, E., Pereira, P. & Franca S. (2005) Risk of human exposure to paralytic toxins of algal origin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **19**, pp. 401–406.
- Behrenfeld, M.J. & Falkowski, P. (1997) Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration. *Limnology and Oceanography*, **42(1)**, pp. 1–20.

- Belin, C. (1993) *Distribution of Dinophysis spp. and Alexandrium minutum along French coasts since 1984 and their DSP and PSP toxicity levels*. In: Smayda, T.J. & Shimizu, Y. (eds.) *Toxic Phytoplankton blooms in the Sea: Proceedings of the Fifth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton*, Newport, Rhode Island, U.S.A., 28 October-1 November 1991. *Developments in Marine Biology*, **3**, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 469–474.
- Beppu, R., Nojima, K., Tsuruda, S., Gomez-Delan, G., Barte-Quilantang, M., Taniyama, S., Sagara, T., Nishio, S., Takayama, H., Miyazawa, K. & Asakawa, M. (2008) Occurrence of PSP-producing dinoflagellate *Alexandrium tamiyavanichii* in Bingo-Nada, the central coastal water of the Seto Inland Sea, Hiroshima Prefecture, Japan. *Marine Pollution Bulletin*, **56**, pp. 758–763.
- Berger, P.S., Brooks, J., Evens, T.J., Gobler, C.J., Graham, J., Hyde, J., Karner, D., O'Shea, D.K., Paul, V., Paerl, H., Piehler, M., Rosen, B.H., Santelmann, M., Tester, P. & Westrick, J. (2008) In: Hudnell, H.K. (ed.) *"Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs: Chapter 9: Causes, Prevention, and Mitigation Workgroup Report"*, Springer, pp. 185–215.
- Bergkvist, J., Thor, P., Jakobsen, H.H., Wängberg, S.A. & Selander, E. (2012) Grazer-induced chain length plasticity reduces grazing risk in a marine diatom. *Limnology and Oceanography*, **57(1)**, pp. 318–324.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. (2016) Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, **60(1)**, pp. 1–8.
- Boisselier, E. & Astruc, D. (2009) Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chemical Society Reviews*, **38**, pp. 1759–1782.
- Bonanni, A., Esplandiú, M. & Del Valle, M. (2009) Impedimetric genosensors employing COOH-modified carbon nanotube screen-printed electrodes. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, pp. 2885–2891.
- Bora, U., Sett, A. & Singh, D. (2013) Nucleic Acid Based Biosensors for Clinical Applications. *Biosensor Journal*, **2(1)**, pp. 1–8.
- Bower, D.J., Hart, R.J., Matthews, P.A. & Howden, M.E. (1981) Nonprotein neurotoxins. *Clinical toxicology*, **18(7)**, pp. 813–863.
- Braarud, T. (1945) Morphological observations on marine dinoflagellate cultures (*Porella perforate*, *Goniaulax tamarensis*, *Protoceratium reticulatum*). *Avhandlingar utgitt av det Norske Videnskaps-Akademi i Oslo*, **11**, pp. 1–18.
- Brennan, L. & Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**, pp. 557–577.
- Brett, C.M.A. & Brett, A.M.O. (1993) *Electrochemistry. Principles, Methods, and Applications*. 1st Edition, *Oxford University Press*.
- Brett, C.M.A. & Brett, A.M.O. (1998) *Electroanalysis*, 1st Edition, *Oxford University Press*.
- Brosnahan, M.L., Farzan, S., Keafer, B.A., Sosik, H.M., Olson, R.J. & Anderson, D.M. (2014) Complexities of bloom dynamics in the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* revealed through DNA measurements by imaging flow cytometry coupled with species-specific rRNA probes. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **103**, pp. 185–198.
- Brownson, D.A.C. & Banks, C.E. (2014) *Interpreting Electrochemistry*. In: *The Handbook of Graphene Electrochemistry*. Springer, London, pp. 22–77.
- Brunton, L.L., Chabner, B.A. & Knollmann, B.C. (2012) *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman*, 12^a Edição. McGraw-Hill, Rio de Janeiro, Brasil.
- Bryce, C.F.A. & Pacini, D. (1998) *The structure and function of nucleic acids, Revised Edition*. The Biomedical Society, Holbrooks Printers Ltd, Portsmouth, U.K., pp. 1–70.
- Campbell, C.N., Gal, D., Cristler, N., Banditrat, C. & Heller, A. (2002) Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. *Analytical Chemistry*, **74**, pp. 158–162.
- Campuzano, S., Kuralay, F., Lobo-Castañón, M.J., Bartosik, M., Vyavahare, K., Palecek, E., Haake, D.A. & Wang, F. (2011) Ternary monolayers as DNA recognition interfaces for direct and sensitive electrochemical detection in untreated clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics*, **26(8)**, pp. 3577–3583.
- Cao, Y.C., Jin, R. & Mirkin, C.A. (2002) Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science*, **297**, pp. 1536–1540.
- Cassidy, J.F., Doherty, A.P. & Vos, J.G. (1998) *Principles of Chemical and Biological Sensors*. (ed., Diamond, D.), John Wiley & Sons Canada Ltd., Toronto, pp. 73–132.
- CDC_Centers for Disease Control and Prevention (2018) *Harmful algal bloom – associated illnesses*. <https://www.cdc.gov/habs/general.html>
- Cembella, A. & Krock, B. (2008) *Cyclic imine toxins: chemistry, biogeography, biosynthesis and pharmacology*. In: Botana, L. M. (ed.) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, 2nd Edition. CRC Press, Boca Raton.

- Cembella, A.D. (2003) Chemical ecology of eukaryotic microalgae in marine ecosystems. *Phycologia*, **42**, pp. 420–447.
- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta, L.L., Weis, A. & Valdes J.J. (2008) Biosensor Recognition Elements. *Current Issues in Molecular Biology*, **10**, pp. 1-12.
- Chandra, P., Singh, J., Singh, A., Srivastava, A., Goyal, R.N. & Shim, Y.B. (2013) Gold nanoparticles and nanocomposites in clinical diagnostics using electrochemical methods, *Journal of Nanoparticle Research*, Springer, pp. 1–12.
- Chapman, R.L. (2010) Algae: the world's most important "plants" - an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, **18(1)**, pp. 5–12.
- Chaubey, A. & Malhotra, B. (2002) Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **17(6)**, pp. 441–456.
- Chen, R.S., Huang, W.H., Tong, H., Wang, Z.L. & Cheng, J.K. (2003) Carbon fiber nanoelectrodes modified by single-walled carbon nanotubes. *Analytical Chemistry*, **75**, pp. 6341–6345.
- Chu, X., Fu, X., Chen, K., Shen, G.L. & Yu, R.Q. (2005) An electrochemical stripping metalloimmuno assay based on silver-enhanced gold nanoparticle label. *Biosensors and Bioelectronics*, **20(1)**, pp. 805–1812.
- Ciência Viva (2018) *As espécies mais populares do mar de Portugal. Num restaurante perto de si*. Ciência Viva | Agência Nacional para a Cultura Científica e Tecnológica (ed.) Onda Grafe – Artes Gráficas, Lda. Lisboa, pp. 1–53.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, S., Guerrini, F., Pistocchi, R. & Boni, L. (2003) Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic Sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon*, **42**, pp. 7–14.
- Clark, R.F., Williams, S.R., Nordt, S.P. & Manoguerra, A.S. (1999) A review of selected seafood poisonings. *Journal of the undersea and hyperbaric medical society*, **26(3)**, pp. 175–184.
- Codd, G.A., Morrison, L.F. & Metcalf, J.S. (2005) Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **203**, pp. 264-272.
- Cremer, M. (1906) "Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von den polyphasischen Elektrolytketten. *Zeitschrift für Biologie*, **47**, pp. 562–608.
- Cusick, K.D. & Saylor G.S. (2013) An Overview on the Marine Neurotoxin, Saxitoxin: Genetics, Molecular Targets, Methods of Detection and Ecological Functions. *Marine Drugs*, **11**, pp. 991–1018.
- Dahm, R. (2008) Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*, **122**, pp. 565–581.
- Daniel, M.C. & Astruc, D. (2004) Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, **104**, pp. 293–346.
- Daranas, A.H., Norte, M. & Fernandez, J.J. (2001) Toxic marine microalgae. *Toxicon, Elsevier*, **39**, pp. 1101–1132.
- Davidson, K., Tett, P. & Gowen, R. (2011) *Chapter 5 - Harmful Algal Blooms*. In: Hester, R.E. & Harrison, R.M. (eds.) Marine pollution and human health. UK: Royal Society of Chemistry, pp. 95–127.
- Demirel, Z. & Sukatar, A. (2012) Cyanobacterial toxin. *The Internet Journal of Toxicology, Internet Scientific Publications*, **8(2)**, pp. 1–8.
- DGRM (2014) *Plano Estratégico para a Aquicultura portuguesa 2014 – 2020*.
- Drummond, T.G., Hill, M.G. & Barton, J.K. (2003) Electrochemical DNA sensors. *Nature Biotechnology*, **21**, pp. 1192–1199.
- Dusenbery, D.B. (2009). *Chapter 20 - Living at Micro Scale*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- El Goumi, Y. (2017) Electrochemical genosensors: definition and fields of application. *International Journal of Biosensors and Bioelectronics*, **3(5)**, pp. 353–355.
- European Commission (2018) *Facts and figures on the common fisheries policy. Basic statistical data, 2018 edition*. Imprimerie Centrale, Luxembourg, pp. 1–52.
- Eurostat (2018) *Chapter 7 – Fisheries activities*. Agriculture, forestry and fishery statistics, 2018 Edition. Statistical Books Eurostat. Imprimeries Bietlot Frères, Belgium, pp. 107–116.
- Fabro, E., Almandoz, G.O. & Ferrario, M. (2017) Morphological, molecular, and toxin analysis of field populations of *Alexandrium* genus from the Argentine sea. *Journal of Phycology*, **53**, pp. 1206–1222.
- Falkowski, P.G., Barber, R.T. & Smetacek, V. (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, **281(5374)**, pp. 200–207.
- FAO (2018) FAO Aquaculture Newsletter n°58.
- Farré, M. & Barceló, D. (2003) Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **25(5)**, pp. 299–310.

- Ferreira, F.M., Franco Soler, J.M., Fidalgo, M.L. & Fernandez-Vila, P. (2001) PSP toxins from *Aphanizomenon flos-aquae* (cyanobacteria) collected in the Crestuma-Lever reservoir (Douro river, northern Portugal). *Toxicon, Elsevier*, **39**, pp. 757–761.
- Ferris, R. (2016) Why are there so many toxic algae blooms this year. *Consumer News and Business Channel*.
- Formisano, N., Jolly, P., Bhalla, N., Cromhout, M., Flanagan, S.P., Fogel, R., Limson, J.L. & Estrela P. (2015) Optimisation of an electrochemical impedance spectroscopy aptasensor by exploiting quartz crystal microbalance with dissipation signals. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **220**, pp. 369–375.
- Fraga, S. & Sánchez, F. (1985) *Toxic and potentially toxic dinoflagellates found in Galacian Rias (NW Spain)*. In: Anderson, D.M., White, A., Baden, D. (Eds.) *Toxic Dinoflagellates*. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, pp. 51–54.
- Freitas, M.C.C., Couto, M.M.S., Barroso, M.F., Pereira, C., De-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., Lobo-Castañón, M.J. & Delerue-Matos, C. (2016) Highly monodisperse Fe₃O₄@Au superparamagnetic nanoparticles as reproducible platform for genosensing genetically modified organisms. *American Chemical Society, Sensors*, **1(8)**, pp. 1044–1053.
- Fróis, F.A.M. (2016) *Aquacultura Multi-trófica Integrada em Tanques de Terra*. Dissertação em Engenharia Zootécnica – Produção Animal, Faculdade de medicina veterinária, Universidade de Lisboa.
- Gaines, G. & Elbrächter, M. (1987) *Heterotrophic nutrition*. In: Taylor, F.J.R. (ed.) *The biology of dinoflagellates*. Botanical Monographs, **21**, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Gaua, V., Ma, S.C., Wang, H., Tsukuda, J., Kibler, J. & Haake, D.A. (2005) Electrochemical Molecular Analysis without Nucleic Acid Amplification. *Methods*, **37(1)**, pp. 73–83.
- GEOHAB (2001) *Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms*. In: Glibert, P. & Pitcher, G. (eds). Science Plan. SCOR and IOC, Baltimore and Paris, pp. 1–87.
- Giacobbe, M.G. & Maimone, G. (1994) First report of *Alexandrium minutum* Halim in a Mediterranean lagoon. *Cryptogamie Algologie*, **15 (1)**, pp. 47–52.
- Gill, S., Murphy, M., Clausen, J., Richard, D., Quilliam, M., MacKinnon, S., LaBlanc, P., Mueller, R. & Pulido, O. (2003) Neural injury biomarkers of novel shellfish toxins, spirolides: a pilot study using immunochemical and transcriptional analysis. *Neurotoxicology*, **24**, pp. 593–604.
- Gonçalves, F. (2014) *Aquacultura em Portugal*. APA – Associação Portuguesa de Aquacultores (ed.), Portimão.
- Gribble, K.E., Keafer, B.A., Quilliam, M.A., Cembella, A.D., Kulis, D.M., Manahan, A. & Anderson, D.M. (2005) Distribution and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in the Gulf of Maine, USA. *Deep-Sea Research part II, Elsevier*, **52**, pp. 2745–2763.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. & Reimhult, E. (2008) Electrochemical biosensors – Sensor principles and architectures. *Sensors*, **8**, pp. 1400–1458.
- Griffin, E.G. & Nelson, J.M. (1916) The influence of certain substances on the activity of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, **38**, pp. 722–730.
- Grobbelaar, J.U. (2004) *Algal nutrition. Mineral nutrition*. In: Richmond, A. (ed.) “Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology”, *Blackwell publishing, Oxford*.
- Gross, M. (2012) The mysteries of the diatoms. *Feature Magazine*, pp. 581–585.
- Gu, H., Zeng, N., Liu, T., Yang, W., Müller, A. & Krock, B. (2013) Morphology, toxicity and phylogeny of *Alexandrium* (Dinophyceae) species along the coast of China. *Harmful Algae, Elsevier*, **27**, pp. 68–81.
- Guillard, R.R.L. & Ryther, J.H. (1962) Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, **8**, pp. 229–239.
- Guillard, R.R.L. (1975) *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In: Smith, W.L. & Chanley, M.H. (eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA, pp. 26–60.
- Guindon, S. & Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52(5)**, pp. 696–704.
- Halim, Y. (1960) *Alexandrium minutum* nov. g., nov. sp., dinoflagellé provocant des eaux rouges. *Vie et Milieu* **11**, pp. 102–105.
- Hallegraef, G.M., Steffensen, D.A. & Wetherbee, R. (1988) Three estuarine Australian dinoflagellates that can produce paralytic shellfish toxins. *Journal of Plankton Research*, **10**, pp. 533–541.
- Hallegraef, G.M. (1991) *Aquaculturists' Guide to Harmful Australian Microalgae*. Fishing Industry Training Board of Tasmania/CSIRO Division of Fisheries, Hobart.
- Hallegraef, G.M. (1993) A review of harmful algal blooms ADN their apparent global increase. *Phycologia*, **32**, pp. 79–99.

- Hallegraeff, G.M. (2003) *Harmful algal blooms – a global overview*. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO, Paris, pp. 25–49.
- Hansen, G., Daugbjerg, N. & Franco, J.M. (2003) Morphology, toxin composition and LSU rDNA phylogeny of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) from Denmark, with some morphological observations on other European strains. *Harmful Algae, Elsevier*, **2**, pp. 317–335.
- Hansen, P.J., Cembella, A.D. & Moestrup, Ø. (1992) The marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* paralytic shellfish toxin concentration, composition, and toxicity to a tintinnid ciliate. *Journal of Phycology*, **28**, pp. 597–603.
- Harmful Algae (2017) Distribution of HABs throughout the World. <https://www.whoi.edu/website/redtide/regions/world-distribution/>
- Harvey, D. (2017) *Voltammetric methods*. Departamento de química, Universidade de DePauw.
- Hayat, A. & Marty, J.L. (2014a) Aptamer based electrochemical sensors for emerging environmental pollutants. *Frontiers in Chemistry*, **2(41)**, pp. 1–9.
- Hayat, A. & Marty, J.L. (2014b) Disposable screen-printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. *Sensors*, **14**, pp. 10432–10453.
- Hayat, A., Catanante, G. & Marty, J.L. (2014) Current Trends in Nanomaterial-Based Amperometric Biosensors. *Sensors*, **14(12)**, pp. 23439–23461.
- He, P., Xu, Y. & Fang, Y. (2007) A Review: Electrochemical DNA Biosensors for Sequence Recognition. *Analytical Letters*, **38(15)**, pp. 2597–2623.
- Heineman, W.R. & Jensen, W.B. (2006) Leland C. Clark Jr. (1918–2005). *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, pp. 1403–1404.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K. & Suddleson, M. (2008) Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae, Elsevier*, **8(1)**, pp. 3–13.
- Hermanson, G.T. (2013) *Chapter 1 - Introduction to Bioconjugation*. In: *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition. Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, pp. 1–125.
- Heurich, M., Kadir, M.K.A. & Tohill, I.E. (2011) An electrochemical sensor based on carboxymethylated dextran modified gold surface for ochratoxin A analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, **156(1)**, pp. 162–168.
- Hoagland, P. & Scatasta, S. (2006) *The economic effects of harmful algal blooms*. In: Graneli, E. & Turner, J., (eds.) *Ecology of harmful algae*. Ecology studies Series., Springer-Verlag, Dordrecht, The Netherlands.
- Hu, T., Burton, I.W., Cembella, A.D., Curtis, J.M., Quilliam, M.A., Walter, J.A. & Wright, J.L. (2001) Characterization of spirolides a, c, and 13-desmethyl c, new marine toxins isolated from toxic plankton and contaminated shellfish. *Journal of Natural Products*, **64**, pp. 308–312.
- Hu, T.M., Curtis, J.M., Oshima, Y., Quilliam, M.A., Walter, J.A., Wright, W.M. & Wright, J.L.C. (1995) Spirolide-B and spirolide-D, two novel macrocycles isolated from the digestive glands of shellfish. *Journal of the Chemical Society*, **20**, pp. 2159–2161.
- Hu, T.M., Curtis, J.M., Walter, J.A. & Wright, J.L. (1996) Characterization of biologically inactive spirolides E and F: identification of the spirolide pharmacophore. *Tetrahedron Letters*, **37**, pp. 7671–7674.
- Hwang, D-F., Tsai, Y-H., Liao, H-J., Matsuoka, K., Noguchi T. & Jeng S-S. (1999) Toxins of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* Halim from the coastal waters and aquaculture ponds in southern Taiwan. *Fisheries Science*, **65**, pp. 171–172.
- Ikebukuro, K., Kiyohara, C. & Sode, K. (2004) Electrochemical detection of protein using a double aptamer sandwich. *Analytical Letters*, **37**, pp. 2901–2909.
- Immoos, C.E., Lee, S.J. & Grinstaff, M.W. (2004) DNA-PEG-DNA triblock macromolecules for reagentless DNA detection. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, pp. 10814–10815.
- Instituto nacional de estatística (2014) *Estatística de pesca 2013*. Direção-geral de recursos naturais, segurança e serviços marítimos, edição 2014.
- Jacobson, D.M. & Anderson, D.M. (1996) Widespread phagocytosis of ciliates and other protists by marine mixotrophic and heterotrophic thecate dinoflagellates. *Journal of Phycology*, **32**, pp. 279–285.
- Jaekisch, N., Yang, I., Wohlrab, S., Glöckner, G., Kroymann, J., Vogel, H., Cembella, A. & John, U. (2011) Comparative genomic and transcriptomic characterization of the toxigenic marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii*. *PLOS one*, **6(12)**, pp. 1–15.
- James, K.J., Bishop, A.G. & Furey, A. (2000) *New toxins on the horizon*. In: Botana, L.M. (ed.) *Seafood and freshwater toxins: pharmacology, physiology and detection*, Marcel Dekker, New York, pp. 963–714.

- Jensen, M. & Moestrup Ø. (1997) Autecology of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* life history and growth at different temperatures and salinities. *European Journal of Phycology*, **32**, pp. 9–18.
- Jiang, X., Chen, K. & Han, H. (2011) Ultrasensitive electrochemical detection of *Bacillus thuringiensis* transgenic sequence based on *in situ* Ag nanoparticles aggregates induced by biotin–streptavidin system. *Biosensors and Bioelectronics*, **28**, pp. 464–468.
- John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A. (2011). Micro and macroalgae biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource technology*, **102(1)**, pp. 186–193.
- John, U., Cembella, A., Hummert, C., Elbrächter, M., Groben, R. & Medlin, L.K. (2003a) Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *European Journal of Phycology*, **38**, pp. 25–40.
- John, U., Fensome, R.A. & Medlin, L.K. (2003b) The application of molecular clock based on molecular sequence and fossil record to explain biogeographic distributions within the *Alexandrium tamarense* “species complex” (Dinophyceae) *Molecular Biology and Evolution*, **20**, pp. 1015–1027.
- John, U., Litaker, R.W., Montresor, M., Murray, S., Brosnahan, M.L. & Anderson, D.M. (2014) Formal revision of the *Alexandrium tamarense* species complex (Dinophyceae) taxonomy: the introduction of five species with emphasis on molecularbased (rDNA) classification. *Protist*, **165**, pp. 779–804.
- Jolly, P., Formisano, N. & Estrela, P. (2015a) DNA aptamer-based detection of prostate cancer. *Chemical Papers, Springer*, **69**, pp. 77–89.
- Jolly, P., Formisano, N., Tkáč, J., Kasák, P., Frost, C.G. & Estrela, P. (2015b) Label-free impedimetric aptasensor with antifouling surface chemistry: a prostate specific antigen case study. *Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier*, **209**, pp. 306–312.
- Kissinger, P. & Heineman, W.R. (1996). *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd. Edition. CRC Press.
- Konovalova, G.V. (1993) *Toxic and potentially toxic dinoflagellates from the far east coastal waters of Russia*. In: Smayda, T.J. & Shimizu Y. (eds.) *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea*, Elsevier, Amsterdam, pp. 275–279.
- Kounaves, S.P. (1997) “*Voltammetric Techniques*”. In: Settle, F.A. (ed.) *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, New Jersey.
- Kremp, A., Lindholm, T., Dreßler, N., Erlen, K., Gerdtz, G., Eirtovaara, S. & Leskinen, E. (2009) Bloom forming *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in shallow waters of the Åland Archipelago, Northern Baltic Sea. *Harmful Algae, Elsevier*, **8**, pp. 318–328.
- Kurbanoglu, S., Dogan-Topal, B., Rodriguez, E.P., Bozal-Palabiyik, B., Ozkan, S.A. & Uslu, B. (2016) Advances in electrochemical DNA biosensors and their interaction mechanism with pharmaceuticals. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **775**, pp. 8–26.
- Labuda, J., Brett, A.M.O., Evtugyn, G., Fojta, M., Mascini, M., Ozsoz, M., Palchetti, I., Palecek, E. & Wang, J. (2010) Electrochemical nucleic acid-based biosensors: Concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, **82(5)**, pp. 1161–1187.
- Lagos, N., Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo, D., Azevedo, S.M. & Oshima, Y. (1999) The first evidence of paralytic shellfish toxins in the fresh water cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon, Elsevier*, **37**, pp. 1359–1373.
- Landsberg, J.H. (2002) The effects of harmful algal blooms on aquatic organisms. *Reviews in Fisheries Science*, **10**, pp. 113–390.
- Larsen, J. & Moestrup Ø. (1989) *Guide to Toxic and Potentially Toxic Marine Algae*. The Fish Inspection Service, Ministry of Fisheries, Copenhagen, Denmark, pp. 1–61.
- Laycock, M.V., Thibault, P., Ayer, S.W. & Walter, J.A. (1994) Isolation and purification procedures for the preparation of paralytic shellfish poisoning toxin standards. *Natural Toxins*, **2**, pp. 175–183.
- Lee, J.-O., So, H.-M., Jeon, E.-K., Chang, H., Won, K. & Kim, Y.H. (2008) Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer*, **390**, pp. 1023–1032.
- Lewis, A.M., Coates, L.N., Turner, A.D., Percy, L. & Lewis, J. (2018) A review of the global distribution of *Alexandrium minutum* (Dinophyceae) and comments on ecology and associated paralytic shellfish toxin profiles, with a focus on Northern Europe. *Journal of Phycology*, **54(5)**, pp. 581–598.
- Lilly, E.L., Halanych, K.M. & Anderson, D.M. (2005) Phylogeny, biogeography, and species boundaries within the *Alexandrium minutum* group. *Harmful algae, Science Direct*, **4**, pp. 1004–1020.
- Lilly, E.L., Halanych, K.M. & Anderson, D.M. (2007) Species boundaries and global biogeography of the *Alexandrium tamarense* complex (Dinophyceae). *Journal of Phycology*, **43**, pp. 1329–1338.

- Locey, K.J. & Lennon, J.T. (2016). Scaling laws predict global microbial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **113**, pp. 5970–5975.
- López, M.S.P., Cabanillas, G.F., Castañón, M.J.L. & López-Ruiz, B. (2014) Development of a genosensor for peanut allergen ARA h 2 detection and its optimization by surface response methodology. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, **62**, pp. 350–356.
- Love, J.C., Estroff, L.A., Kriebel, J.K., Nuzzo, R.G. & Whitesides, G.M. (2005) Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chemical Reviews*, **105**, pp. 1103–1169.
- Lucarelli, F., Marrazza, G., Turner, A. & Mascini, M. (2004) Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridization sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **19(6)**, pp. 515–530.
- Luz, R.S., Lost, R. & Crespilho, F.N. (2013) *Nanomaterials for biosensors and implantable biodevices*. In: Crespilho, F.N. (ed.) Nanobioelectrochemistry. Springer, New York, USA, pp. 27–48.
- Mackenzie, L., White, D., Ohima Y. & Kapa J. (1996) The resting cyst and toxicity of *Alexandrium ostenfeldii* (Dinophyceae) in New Zealand. *Phycologia*, **35**, pp. 148–155.
- Maguer, J.F., Denn, E.E-L., Christian, M., Le Grand, J. & Morin, P. (2000) *Relationships between nitrogen utilization and environmental conditions during an Alexandrium minutum bloom in Morlaix bay (NW France)*. In: Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful-Algal Blooms. Tasmania, Australia.
- Mahato, K., Kumar, S., Srivastava, A., Maurya, P.K., Singh, R. & Chandra P. (2018) Chapter 14 - Electrochemical Immunosensors: Fundamentals and Applications in Clinical Diagnostics. *Handbook of Immunoassay Technologies*, Elsevier, pp. 359–414.
- Malhotra, S., Verma, A., Tyagi, N. & Kumar, V. (2017) Biosensors: principle, types and applications. *IJARIIIE-ISSN*, **3(2)**, pp. 3639–3644.
- Mann, D.G. (1999) The species concept in diatoms. *Phycologia*, **38**, pp. 437–495.
- Manzanas-Palenzuela, C.L., Martín-Fernández, B., López, M.S.P. & López-Ruiz, B. (2015) Electrochemical genosensors as innovative tools for detection of genetically modified organisms. *Trends in Analytical Chemistry*, **66**, pp. 19–31.
- Marques, K.N. (2006) Análise morfológica e molecular de cianobactérias isoladas de efluentes de uma mina de urânio desativada com ênfase em *Aphanothece* e sua capacidade de biossorção do ²²⁶Ra. Dissertação do Centro de energia nuclear na agricultura – CENA/USP, Universidade de São Paulo.
- Martín-Fernández, B., Manzanas-Palenzuela, C.L., López, M.S.P., de-Los-Santos-Álvarez, N. & López-Ruiz, B. (2017) Electrochemical genosensors in food safety assessment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **57(13)**, pp. 2758–2774.
- Mata, T., Martins, A. & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14(1)**, pp. 217–232.
- McPartlin, D.A., Loftus, J.H., Crawley, A.S., Silke, J., Murphy, C.S. & O’Kennedy, R.J. (2017) Biosensors for the monitoring of harmful algal blooms. *Current option in Biotechnology*, Elsevier, **45**, pp. 164–169.
- Meng, Y., Aldous, L., Belding, S.R. & Compton, R.G. (2012) The formal potentials and electrode kinetics of the proton/hydrogen couple in various room temperature ionic liquids. *Chemical Communications*, **48**, pp. 5572–5574.
- Mestre, P.M.G. (2008) Elaboração de um projecto de uma unidade de piscicultura. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Faculdade de medicina veterinária, Universidade de Lisboa.
- Metfies, K., Huljic, S., Lange, M. & Medlin, L.K. (2004) Electrochemical detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with a DNA-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, Elsevier, **20**, pp. 1349–1357.
- Miotto C. (2011) Morfologia, distribuição e toxicidade de *Alexandrium fraterculus* (BALECH) Balech na costa de Santa Catarina. Universidade do Vale do Itajaí, pp. 1–43.
- Mistry, K.K., Layek, K., Mahapatra, A., RoyChaudhuri, C. & Saha, H. (2014) A review on amperometric-type immunosensors based on screen-printed electrodes, *Analyst*, **139(10)**, pp. 2289–2311.
- Mix, M., Rüger, J., Krüger, S., Broer, I. & Flechsig, G-U. (2012) Electrochemical detection of 0.6% genetically modified maize MON810 in real flour samples. *Electrochemistry Communications*, **22**, pp. 137–140.
- Moestrup, Ø. & Hansen, P.J. (1988) On the occurrence of the potentially toxic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* (*Gonyaulax excavata*) and *A. ostenfeldii* in Danish and Faroese waters. *Ophelia*, **28**, pp. 195–213.
- Molgó, J., Girard, E. & Benoit, E. (2007) In: Botana, L.M. (ed.) *Phycotoxins: chemistry and biochemistry*. Blackwell Publishing, Ames, pp. 319.
- Monosík, R., Stredánská, M., Sturdík, E. (2012) Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca*, **5(1)**, pp. 109–120.

- Monteiro, T., Rodrigues, P.R., Gonçalves, A.L., Moura, J.J.G., Jubete, E., Añorga, L., Píknova, B., Schechter, A.N., Silveira C.M. & Almeida, M.G. (2011) Construction of effective disposable biosensors for point of care testing of nitrite. *Talanta, Elsevier*, **142(1)**, pp. 246–251.
- Moss, G.P., Smith P.A.S. & Tavernier D. (1995) In: Burrows, H. & Stohner, J. (ed.) *Glossary of class names of organic compounds and reactive intermediates based on structure*. Pure and Applied Chemistry, IUPAC, **67(8-9)**, pp. 1307–1375.
- Munday, R., Thomas, K., Gibbs, R., Murphy, C. & Quilliam M.A. (2013) Acute toxicities of saxitoxin, neosaxitoxin, dicarbamoyl-saxitoxin and gonyautoxins 1&4 and 2&3 to mice by various routes of administration. *Toxicon, Elsevier*, **76**, pp. 77–83.
- 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., Brunaska, D. & Lima-Filho, J.L. (2012) Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics*, **38(1)**, pp. 61–66.
- Naves, J.L. (2008) Estudos sobre dinoflagelados isolados da Costa Norte do Estado de São Paulo: monitoramento, aspectos moleculares, biológicos e químicos. Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- Naylor, R.L., Williams, S.L. & Strong, D.R. (2001) Aquaculture - A Gateway for Exotic Species. *Science*, **294(5547)**, pp. 1655–1656.
- Negri, A., Stirling, D., Quilliam, M., Blackburn, S., Bolch, C., Burton, I., Eaglesham, G., Thomas, K., Walter, J. & Willis, R. (2003) Three novel hydroxybenzoate saxitoxin analogues isolated from the dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Chemical Research in Toxicology*, **16**, pp. 1029-1033.
- Nelson, J.M. & Griffin, E.G. (1916) Adsorption of invertase. *Journal of the American Chemical Society*, **38**, pp. 1109–1115.
- Nézan, E., Bilien, G., Boulben, S., Zentz, F., Chèza, K. & Chomérat, N. (2010) Diversity of the dinoflagellate genus *Alexandrium* along the French coasts, based on morphological and phylogenetic analyses. *ICES annual science conference, 20–24 September 2010, Nantes, France*.
- Nnamchi, P.S & Obayi, C.S. (2018) *Chapter 4 - Electrochemical Characterization of Nanomaterials*. In: Bhagyaraj, S.M., Oluwafemi, O.S., Kalarikkal, N. & Thomas, S. (ed.) *Micro and Nano Technologies, Characterization of Nanomaterials*, Woodhead Publishing, pp. 103-127.
- Noyce, S.G., Vanfleet, R.R., Craighead, H.G. & Davis, R.C. (2018) High surface-area carbon microcantilevers. *Nanoscale advances, Royal society of chemistry*, **1**, pp. 1148–1154.
- Oliveira, N.C.L., Ferreira, D.S.C., Nascimento, G.A., Ribeiro, W.S.B., Zanforlin, D.M.L., Santos, S.M. & Filho, J.L.L. (2011) *Desenvolvimento de um biossensor de DNA eletroquímico para a detecção de vestígios biológicos em tempo real*. XXI Congresso Nacional de Criminalística, Gramado, Brasil.
- Onodera, H., Satake, M., Oshima, Y., Yasumoto, T. & Carmichael, W.W. (1997) New saxitoxin analogues from the freshwater filamentous cyanobacterium *Lyngbya wollei*. *Natural Toxins*, **5**, pp. 146–151.
- Ozsoz, M. (ed.) *Electrochemical and biosensors*. Pan Stanford Publishing.
- Pacheco, W.F, Semaan, F.S., de Almeida, V.G.K., Ritta, A.G.S.L. & Aucéliob, R.Q. (2013) Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. *Revista Virtual de Química*, **5(4)**, pp. 516–537.
- Paerl, H.W. & Paul, V.J. (2012) Climate change: Links to global expansion of harmful Cyanobacteria. *Water Research*, **4(6)**, pp. 1349–1363.
- Palecek, E. & Bartosik, M. (2012) Electrochemistry of nucleic acids. *Chemical Reviews*, **112(6)**, pp. 3427–3481.
- Palecek, E. & Jelen, F. (2005) *Electrochemistry of Nucleic Acids*. In: Palecek, E., Scheller, F. & Wang, J. (eds.) *Electrochemistry of nucleic acids and proteins - towards electrochemical sensors for genomic and proteomics*. Elsevier, London.
- Pallela, R., Chandra, P., Noh, H-B. & Shim, Y-B. (2016) An amperometric nanobiosensor using a biocompatible conjugate for early detection of metastatic cancer cells in biological fluid. *Biosensors and Bioelectronics*, **85**, pp. 883–890.
- Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A. & Barthelmebs, L. (2013) Aptasensor and Genosensor Methods for Detection of Microbes in Real World Samples, *Methods*, **64(3)**, pp. 229–240.
- Pathak, P., Katiyar, V.K. & Giri, S. (2007) Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *AZojono Journal of Nanotechnology Online*.
- Patolsky, F., Katz, E., Bardea, A. & Willner, I. (1999) Enzyme-linked amplified electrochemical sensing of oligonucleotide-DNA interactions by means of the precipitation of an insoluble product and using impedance spectroscopy. *Langmuir*, **15**, pp. 3703–3706.
- Pedrero, M., Campuzano, S. & Pingarrón, J.M. (2011) Electrochemical genosensors based on PCR strategies for microorganism detection and quantification. *Analytical Methods*, **3(4)** pp. 780 –789.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. & Krieg, N.R. (1986) *Microbiology, International student edition*.

- Pividori, M.I., Merkok, A. & Alegret, I.S. (2000) Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosensors and Bioelectronics*, **15**, pp. 291–303.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (1999) *Microbiology*. WCB/McGraw-Hill Inc., 4th. Edition., Toronto.
- Procopiak, L.K., Fernandes, L.F. & Moreira-Filho, H. (2006) Diatomáceas (Bacillariophyta) marinhas e estuarinas do Paraná, Sul do Brasil: lista de espécies com ênfase em espécies nocivas. *Biota Neotropica*, **6(3)**, pp. 1–28.
- Protti, P. (2001) *Introduction to Modern Voltammetric and Polarographic Analysis Techniques*. AMEL Electrochemistry, 4th. Edition.
- Qiu, J., Rafuse, C., Lewis, N.I., Li, A., Meng, F., Beach, D.G. & McCarron, P. (2018) Screening of cyclic imine and paralytic shellfish toxins in isolates of the genus *Alexandrium* (Dinophyceae) from Atlantic Canada. *Harmful Algae, Elsevier*, **77**, pp. 108–118.
- Rahman, M.M., Li, X., Lopa, N.S., Ahn, S.J. & Lee, J. (2015) Electrochemical DNA hybridization sensors based on conducting polymers. *Sensors*, **15(2)**, pp. 3801–3829.
- Raiteri, R., Grattarola, M. & Berger, R. (2002) Micromechanics Senses Biomolecules. *Materials Today*, **5(1)**, pp. 22–29.
- Rashid, J.I.A. & Yusof, N.A. (2017) The strategies of DNA immobilization and hybridization detection mechanism in the construction of electrochemical DNA sensor: A review. *Sensing and Bio-Sensing Research, Elsevier*, **16**, pp. 19–31.
- Rasmussen, S.R., Larsen, M.R. & Rasmussen, S.E. (1991) Covalent immobilization of DNA onto polystyrene microwells: the molecules are only bound at the 5' end. *Analytical Biochemistry*, **198**, pp. 138–142.
- Relatório do Estado do Ambiente (2019) *Solo e biodiversidade. Produção em aquaculture*. Portal do estado do ambiente.
- Ricci, F., Adornetto, G. & Palleschi, G. (2012) A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. *Electrochimica Acta*, **84**, pp. 74–83.
- Richard, D., Arsenault, E. & Cembella, A.M.Q. (2001) *Investigations into the toxicology and pharmacology of spirolides a novel group of shellfish toxins*. In: Hallegraef, G.M., Blackburn, S.I., Bolch, C.J. & Lewis, R.J., (eds.) Harmful Algal Blooms 2000: Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms. Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Paris, pp 383–390.
- Santos, J.S.S. (2015) *Nanotoxicology: study of nanomaterials' genotoxic effects in cell lines*. Dissertação em Biologia (Biologia Humana e Ambiente), Faculdade de Ciências, Departamento de Engenharia Geográfica, Geofísica e Energia, Universidade de Lisboa.
- Sarthou, G., Timmermans, K.R., Blain, S. & Tréguer, P. (2005) Growth physiology and fate of diatoms in the ocean: a review. *Journal of Sea Research*, **53**, pp. 25–42.
- Scatista, S., Stolte, W., Graneli, E. & Van Ierland, E. (2003) *The socio-economic impact of harmful algal blooms in European Union countries*. Fifth deliverable for the EU-funded project ECOHARM.
- Schirmer, B.E., Antonelli, A. & Bagheri, H.C. (2011) The origin of multicellularity in cyanobacteria. *BioMed Central Evolutionary Biology*, **11(45)**, pp. 1–21.
- Selander, E., Kubanek, J., Hamberg, M., Andersson, M.X., Cervin, G. & Pavia, H. (2015) Predator lipids induce paralytic shellfish toxins in bloom-forming algae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112(20)**, pp. 6395–6400.
- Sharma, T.K., Ramanathan, R., Rakwal, R., Agrawal, G.K. & Bansal, V. (2015) Moving forward in plant food safety and security through nanobiosensors: adopt or adapt biomedical technologies?. *Proteomics*, **15**, pp. 1680–1692.
- Shumway, S.E., Allen, S.M. & Boersma, P.D. (2003) Marine birds and harmful algal blooms: sporadic victims or under-reported events?. *Harmful Algae, Elsevier*, **2(1)**, pp. 1–17.
- Sin, M.L.Y., Mach, K.E., Wong, P.K. & Liao, J.C. (2014) Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics, Informa UK, Ltd.*, **14(2)**, pp. 225–44.
- Sing, W.L.L. (2017) *Development of molecular platform for the detection of harmful algal bloom species, Alexandrium minutum*. Institute of graduate studies university of Malaya, Kuala Lumpur.
- Song, S., Xu, H. & Fan, C. (2006) Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. *International Journal of Nanomedicine*, **1(4)**, pp. 433–440.
- Sournia, A. (1995) Red-tide and toxic marine phytoplankton of the world ocean: an inquiry into biodiversity Harmful Toxic Algal Blooms. *Lavosier, Paris*, pp. 239–243
- Sousa, L., Rivas-Carballo, M.R. & Pais, J. (1999) Dinoflagelados. Nomenclatura portuguesa. Departamento de Ciências da Terra, Universidade Nova de Lisboa, **13**, pp. 35–77.
- Stanford University (2009) *Half of fish consumed globally is now raised on farms, study finds*. Science daily.
- Steidinger, K.A. & Tangen, K. (1996) *Dinoflagellates*. In: Tomas, C.R. (ed.), Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates, Academic Press, New York, pp. 387–598.

- Subirós, E.F. (2009) Ficotoxinas marinhas: métodos de detección en extratos de molusco. Departamento de Farmacologia. Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela.
- Sun, W., Lu, Y., Wu, Y., Zhang, Y., Wang, P., Chen, Y. & Li, G. (2014) Electrochemical sensor for transgenic maize MON810 sequence with electrostatic adsorption DNA on electrochemical reduced graphene modified electrode. *Sensors and Actuators B: Chemistry*, **202**, pp. 160–166.
- Sun, W., Zhang, Y., Hu, A., Lu, Y., Shi, F., Lei, B. & Sun, Z. (2013) Electrochemical DNA Biosensor Based on Partially Reduced Graphene Oxide Modified Carbon Ionic Liquid Electrode for the Detection of Transgenic Soybean A2704-12 Gene Sequence. *Electroanalysis*, **25**, pp. 1417–1424.
- Svitková, V. & Labuda, J. (2017) Construction of electrochemical DNA biosensors for investigation of potential risk chemical and physical agents. *Monatshefte für Chemie, Springer*, **148**, pp. 1569–1579.
- Tahri-Joutei, L., Berraho, A. & Orbi, A. (2000) *Harmful algae blooms and the upwelling regime in Atlantic coastal waters of Morocco*. In: Proceedings of the Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia.
- Taylor, F.J.R., Fukuyo, Y. & Larsen, J. (1995) *Taxonomy of harmful dinoflagellates*. In: Hallegraeff, G.M., Anderson D.M. & Cembella A.D. (eds.) Manual on Harmful Marine Microalgae, IOC Manuals and Guides No. 33, UNESCO, France, pp. 283–317.
- Teles, F.R.R. & Fonseca, L.P. (2008) Trends in DNA biosensors. *Talanta, Elsevier*, **77(2)** pp. 606–623.
- Theâvenot, D.R., Toth, K., Durst, R.A. & Wilson, G.S. (1999) Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, **71(12)**, pp. 2333–2348.
- Thermo Fisher Scientific (2010) *Nucleic Acid*. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. pp. 1–30.
- Thottumkara, A.P., Parsons, W.H. & Du Bois, J. (2014) Saxitoxin. *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, pp. 2–27.
- Tillmann, U., John, U. & Cembella, A.D. (2007) On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, **29**, pp. 527–543.
- Tomaselli, L. (1997) *Morphology, ultrastructure and taxonomy of Arthrospira (Spirulina) maxima and Arthrospira (Spirulina) platensis*. In: Vonshak, A. (ed.), *Spirulina Platensis Arthrospira: Physiology, cellbiology and biotechnology*. Taylor and Francis Inc., New York, USA, pp. 1–18.
- Tombelli, S. Mascini, M. & Turner, A.P.F. (2002) Improved procedures for immobilization of oligonucleotides on gold coated piezoelectric quartz crystals. *Biosensors and Bioelectronics*, **17**, pp. 929–936.
- Tortora, G.J., Berdell, R.F. & Christine, L.C. (2001) *Microbiology: An Introduction*, 7th Edition. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Tosar, J.P., Brañas, G. & Laiz, J. (2010) Electrochemical DNA hybridization sensor applied to real and complex biological samples. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, pp. 1205–1217.
- Toyofuku, H. (2006) Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin*, **52**, pp. 1735–1745.
- Usup, G., Pin, L.C., Ahmad, A. & Teen, L.P. (2002) *Alexandrium* (Dinophyceae) species in Malaysian waters. *Harmful Algae*, **1**, pp. 265–275.
- Uthappa, U.T., Brahmkhatri, V., Sriram, G., Jung, H-Y., Yu, J., Kurkuri, N., Aminabhavi, T.M., Altalhi, T., Neelgund, G.M. & Kurkuri, M.D. (2018) Nature engineered diatom biosilica as drug delivery systems. *Journal of Controlled Release, Elsevier*, **281**, pp. 70–83.
- Van Dolah, F.M. (2000) Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. *Environmental Health Perspectives*, **108(1)**, pp. 133–141.
- Van Dolah, F.M., Doucette, G.J., Gulland, F.M.D., Rowles, T.L. & Bossart, G.D. (2003) *Impacts of algal toxins on marine mammals*. In: Vos, J.G., Bossart, G.D., Fournier, M. & O'Shea, T.J. (eds.) Toxicity of marine mammals. Taylor and Francis Inc., New York, U.S.A., pp. 247–269.
- Van Dorst, B., Mehta, J., Bekaert, K., Rouah-Martin, E., De Coen, W., Dubruel, P., Blust, R. & Robbens, J. (2010) Recent advances in recognition elements of food and environmental biosensors: a review. *Biosensors and Bioelectronics*. **26(4)**, pp. 1178–1194.
- Vasconcelos, A.C., Vieira A.L. & Couto, J. (2014) *Saxitoxina*. Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto.
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R.M., Colla, L.M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, A.E., Aguilar, C.N., Fernandes, B.D. & Ruiz, H.A. (2018) Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Research Journal*, **17**, pp. 780–791.

- Verma, R., Sood, S., Singh, R., Sumana, G., Bala, M., Sharma, V.K., Samantaray, J.C., Pandey, R.M. & Malhotra, B.D. (2014) Coupling electrochemical response of a DNA biosensor with PCR for *Neisseria gonorrhoeae* detection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Elsevier*, **78**, pp. 16–23.
- Vila, M., Camp, J., Garcés, E., Masó, M. & Delgado, M. (2001) High resolution spatio-temporal detection of potentially harmful dinoflagellates in confined waters of the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research*, **23(5)**, pp. 497–514.
- Vila, M., Giacobbe, M.G., Masó, M., Gangemi, E., Penna, A., Sampedro, N., Azzaro, F., Camp, J. & Galluzzi, L. (2005) A comparative study on recurrent blooms of *Alexandrium minutum* in two Mediterranean coastal areas. *Harmful Algae, Elsevier*, **4**, pp. 673–695.
- Vilariño, N., Louzao, C.M., Fraga, M., Rodríguez, L.P. & Botana, L.M. (2013) Innovative detection methods for aquatic algal toxins and their presence in the food chain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer*, **405**, pp. 7719–7732.
- Walter, J.M., Coutinho, F.H., Dutilh, B.E., Swings, J., Thompson, F.L. & Thompson, C.C. (2017) Ecogenomics and taxonomy of Cyanobacteria *phylum*. *Frontiers in Microbiology*, **8(2132)**, pp. 1–18.
- Wan, Y., Zhang, J., Liu, G., Pan, D., Wang, L.H., Song, S.P. & Fan, C.H. (2009) Ligase-based multiple DNA analysis by using an electrochemical sensor array. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, pp.1209–1212.
- Wang, J. & Musameh, M. (2003) Carbon nanotube/teflon composite electrochemical sensors and biosensors. *Analytical Chemistry*, **75**, pp. 2075–2079.
- Wang, J. (2000a) *Analytical Electrochemistry, 2nd. Edition*. Wiley-CVH: New Jersey.
- Wang, J. (2000b) From DNA biosensors to gene chips. *Nucleic Acids Research*, **28(16)**, pp. 3011–3016.
- Wang, J., Shi, A., Fang, X., Han, X. & Zhang, Y. (2014) Ultrasensitive electrochemical supersandwich DNA biosensor using a glassy carbon electrode modified with gold particle-decorated sheets of graphene oxide. *Microchimica Acta*, **181**, pp. 935–940.
- Werner, D. (1977) *Introduction with a note on taxonomy*. In: Werner, D. (ed.) *The biology of diatoms*. University of California Press, Berkeley, pp. 1–17.
- WHO (1999) *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Choerus, I. & Bartram, J. (ed.) E & FN Spon, London and New York.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K. & Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*, **22**, pp. 474–481.
- Wink, Th., Van Zuilen, S.J., Bult, A. & Van Bennekom, W.P. (1997) Self-assembled Monolayers for Biosensors. *Analyst*, **122**, pp. 43–50.
- Yahia, O.K-D., Nezan, E. & Yahia, M.N.D. (2001) On the presence of the genus *Alexandrium* Halim (dinoflagellates) in the bay of Tunis (Tunisia). *Oceanologica Acta*, **24**, pp. 17–25.
- Yan, C., Fan, J. & Xu, C. (2013) *Methods in cell biology*. Elsevier, **116**, pp. 71–82.
- Yang, J., Wang, X. & Shi., H. (2012) An electrochemical DNA biosensor for highly sensitive detection of phosphinothricin acetyltransferase gene sequence based on polyaniline-(mesoporous nanozirconia)/poly-tyrosine film. *Sensors and Actuators B: Chemistry*, **162**, pp. 178–183.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S. & Madden, T. (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BioMed Central Bioinformatics*, **13(134)**, pp. 1–11.
- Yoshida, M., Ogata, T., Thuoc, C.V., Matsuoka, K., Fukuyo, Y., Hoi, N.C. & Kodama, M. (2000) The first finding of toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in Vietnam. *Fisheries Science, Springer*, **66**, pp. 177–179.
- Yu, L. & Akolkar, R. (2017) Lead underpotential deposition for the surface characterization of silver ad-atom modified gold electrocatalysts for glucose oxidation. *Journal of Electroanalytical Chemistry, Elsevier*, **792**, pp. 61–65.
- Zanchett, G. & Oliveira-Filho E.C. (2013) Cyanobacteria and Cyanotoxins: From Impacts on Aquatic Ecosystems and Human Health to Anticarcinogenic Effects. *Toxins*, **5**, pp. 1896–1917.

Anexos 1

Tabela 18 – Receita do meio de cultura f/2 (adaptado de Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975).

Componentes	Solução-mãe (Stock)	Quantidade
NaNO₃	75 g/L dH ₂ O	1 mL
NaH₂PO₄ • H₂O	5 g/L dH ₂ O	1 mL
Na₂SiO₃ • 9H₂O	30 g/L dH ₂ O	1 mL
Elementos traço		1 mL
FeCl ₃ • 6H ₂ O	-----	3,15 g
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	-----	4,36 g
CuSO ₄ • 5H ₂ O	9,8 g/L dH ₂ O	1 mL
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	6,3 g/L dH ₂ O	1 mL
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	22,0 g/L dH ₂ O	1 mL
CoCl ₂ • 6H ₂ O	10,0 g/L dH ₂ O	1 mL
MnCl ₂ • 4H ₂ O	180,0 g/L dH ₂ O	1 mL
Vitaminas		0,5 mL
Tiamina (B1)	-----	200 mg
Biotina (H)	1,0 g/L dH ₂ O	1 mL
Cianocobalamina (B12)	1,0 g/L dH ₂ O	1 mL

Anexo 2

Tabela 19 – Receita do meio de cultura Z8.

Componente	Solução-mãe (Stock)	Quantidade
NaNO₃	46,7 g/L dH ₂ O	0,467 g
MgSO₄ • 7H₂O	2,5 g/L dH ₂ O	0,250 g
Ca(NO₃)₂ • 4H₂O	5,9 g/L dH ₂ O	59 mg
NH₄Cl	-----	31 mg
Na₂CO₃	2,1 g/L dH ₂ O	0,021 g
FeEDTA		10 mL
FeCl ₃	2,8 g/100 mL dNHCl (0,1 M)	10 mL
EDTANa ₂	3,9g/100 mL dNHCl (0,1 M)	9,5 mL
Micronutrientes		1 mL
H ₃ BO ₃	3,10 g/L dH ₂ O	3,100 g
MnSO ₄ • 4H ₂ O	1,60 g/L dH ₂ O	2,230 g
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2,87 g/100 mL dH ₂ O	0,220 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ • 4H ₂ O	0,88 g/100 mL dH ₂ O	0,088 g
Co(NO ₃) ₂ • 6H ₂ O	1,46 g/100 mL dH ₂ O	0,146 g
VO ₂ SO ₄ • 6H ₂ O		0,054 g
Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ • 2H ₂ O	4,74 g/100 mL dH ₂ O	0,474 g
NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ • 6H ₂ O	1,98 g/100 mL dH ₂ O	0,198 g
Cd(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O	1,55 g/100 mL dH ₂ O	0,155 g
Cr(NO ₃) ₃ • 7H ₂ O	0,41 g/100 mL dH ₂ O	0,037 g
Na ₂ WO ₄ • 2H ₂ O	0,33 g/100 mL dH ₂ O	0,033 g
KBr	1,20 g/100 mL dH ₂ O	0,119 g
KI	0,83 g/100 mL dH ₂ O	0,083 g

Anexo 3

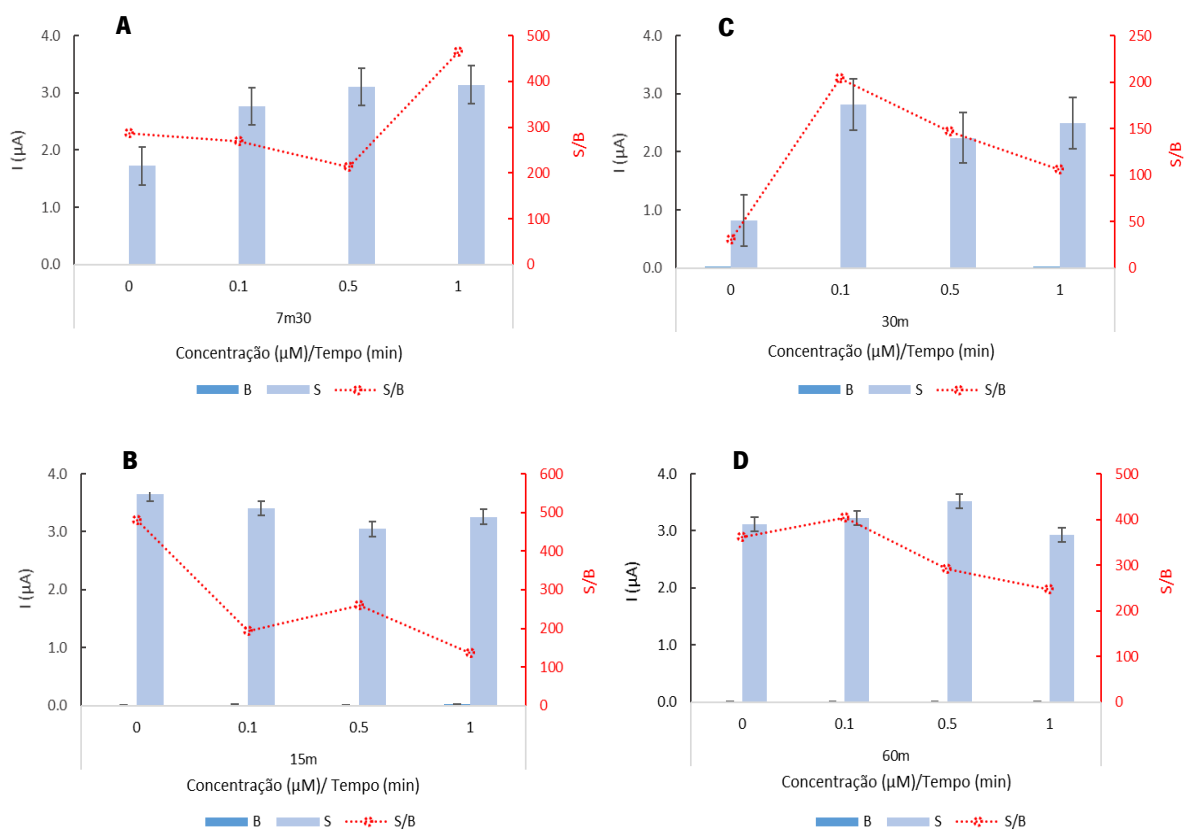


Figura 54 – Respostas cronoamperométricas obtidas na estuda da influência da da concentração do MCH a (A) 7,5 min, (B) 15 min, (C) 30 min e (D) 60 min de incubação. Valores de I_{nc} dos ensaios em branco, B, a azul escuro, da sonda sintética de tADN (1 nM) a azul claro e a razão S/B correspondente a vermelho. Parâmetros analíticos: concentração da sonda de ADN alvo = 1,0 nM, concentração da sonda de ADN sinalizadora = 0,25 μM . Barras representam o erro padrão derivado das réplicas.

Anexo 4

Tabela 20 – Tabela completa da quantificação das amostras extraídas. Valores representam média obtida após 4 leituras. Valores a negrito indicam quais as amostras escolhidas para validar o genossensor desenvolvido.

Amostras	Abs	260/280	[ng/μL]
<i>Alexandrium minutum</i>			
A1	1,034	1,763	51,700
A2	0,339	1,603	16,933
A3	0,768	1,643	38,267
A4	3,221	1,723	127,700
A5	0,942	1,810	47,133
A6	0,306	1,497	15,333
A7	0,962	1,813	48,075
A8	0,433	1,673	21,667
A9	0,936	1,780	39,667
A10	0,718	1,805	35,667
(f/2)1	1,275	1,627	65,200
(f/2)2	0,213	1,473	9,400
(f/2)3	0,246	1,643	12,300
Z81	0,570	1,740	28,567
Z82	0,244	1,810	14,650
Z8S.R	0,245	1,577	12,367
X81.R	0,258	1,457	13,767
Z84.R	0,645	1,303	28,900
Mix f/2	1,275	1,440	63,733
Mix Z81	1,079	1,353	30,633
Mix Z82	1,451	1,393	72,567
<i>Lingulodinium polyedrum</i>			
Alg1	0,810	1,310	42,875
Alg2	1,030	1,540	51,500
Alg3	2,012	2,050	101,233
Alg4	9,598	1,916	480,167
Alg5	20,469	1,693	1023,433
Alg6	19,716	1,867	985,800
Alg7	6,582	1,850	329,067
Alg8	6,122	1,943	302,733
Células humanas do epitélio oral			
H1	1,437	1,823	71,900
H2	0,557	1,62	28,567

Anexo 5

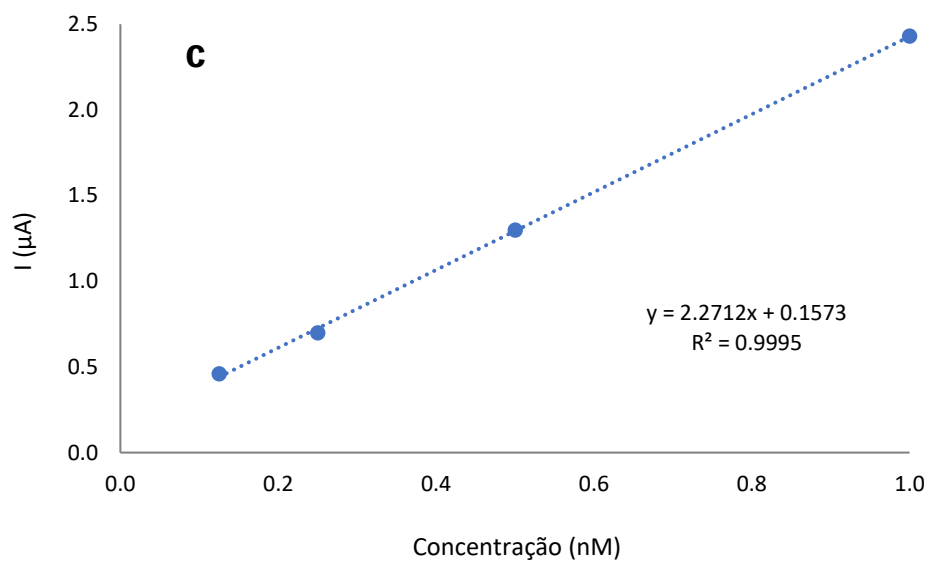
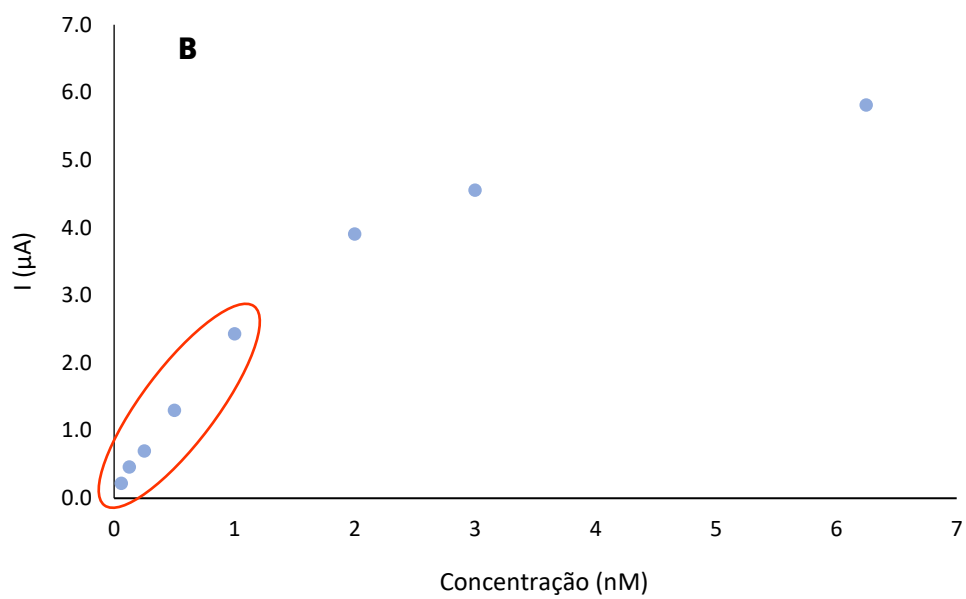


Figura 55 – Amplificação da **figura 50 B e C**.