

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP)
em microchip de poliéster-toner**

Kézia Gomes de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Goiânia
2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

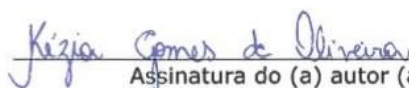
Nome completo do autor: Kézia Gomes de Oliveira

Título do trabalho: Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em microchip de poliéster-toner

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 20 / 12 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP)
em microchip de poliéster-toner**

Kézia Gomes de Oliveira

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química da Universidade Federal
de Goiás como exigência para
obtenção do título de Mestre em
Química

Orientadora: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão

Goiânia
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Kézia Gomes de

Amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP) em microchip de poliéster-toner [manuscrito] / Kézia Gomes de Oliveira. - 2016.

ix, 72 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte; co orientador Dr. Alexandre Melo Bailão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2016.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. LAMP. 2. microdispositivos de PeT. 3. E.coli. 4. gene malB. I. Duarte, Gabriela Rodrigues Mendes , orient. II. Título.

CDU 543



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de Kézia Gomes de Oliveira, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestra em Química.

Aos dias 07 (sete) de outubro do ano de 2016 (dois mil e dezesseis), com início às 14:00 hs (quatorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes membros: Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG), Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão (UFG), Prof. Dr. Emanuel Carrilho (USP) e o Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (UFG), sob a presidência da primeira, para julgar a dissertação de Kézia Gomes de Oliveira intitulada: "Amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP) em microchip de poliéster-toner". A presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte: Aprovada
Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão: APROVADA
Prof. Dr. Emanuel Carrilho: APROVADA
Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro: Aprovada

A seguir, na presença do público e da candidata, a presidente da Banca Examinadora declarou que Kézia Gomes de Oliveira, candidata ao título de mestra em Química, foi: Aprovada ; Reprovada (). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, a Senhora Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Ana Cláudia Silva de Almeida, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora.

Goiânia, 07 de outubro de 2016.



Profa. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte - orientadora (IQ/UFG)



Prof. Dr. Alexandre Melo Bailão – coorientador (UFG)



Prof. Dr. Emanuel Carrilho (IQSC/USP)



Prof. Dr. Wendell Karlos Tomazelli Coltro (IQ/UFG)

A Deus e aos meus pais, Juscelino Carlos e
Maria de Fatima Gomes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por me dar forças nessa caminhada.

A minha família que sempre esteve ao meu lado no decorrer do curso. Em especial a minha irmã Raizza Gomes, aos meus pais, Juscelino Carlos e Maria de Fatima, a vida simplesmente me deu a oportunidade de ter pais maravilhosos que sempre estiveram ao meu lado e investiram em meus sonhos mesmo sendo difícil de realizá-los. Agradeço a vocês por me transmitirem segurança, força e perseverança. Amo vocês!

A minha professora e orientadora, Gabriela R.M. Duarte por sua inteligência, dedicação, paciência e até mesmo pelas broncas. Jamais esquecerei suas frases sem respostas quanto aos experimentos voltados para a Lei de Murphy: “Kezia o que aconteceu com esses experimentos hoje”? Vai ter que repetir tudo! Esse é controle positivo ou negativo? Enfim, obrigada por suas orientações na pesquisa e na vida, afinal quem tem a Gabriela como orientadora ganha um combo “mamãe” que vive trazendo docinho pros “filhos”, comprando caneca e fazendo bolinhos de aniversários na data respectiva de cada um. Agradeço a ela por todas as horas dedicadas a mim e gostaria de enfatizar que foram dois anos de muita aprendizagem em todas as áreas de minha vida.

Ao meu coorientador Alexandre M. Bailão e a todos de seu grupo de pesquisa, pela ajuda quanto à área biológica e por fornecer acesso ao laboratório de biologia molecular. Obrigada pelo interesse de buscar “n” alternativas para solucionar as frequentes contaminações presente em nossos experimentos e por sempre finalizar uma conclusão científica com palavras motivacionais do tipo: “Vai dar certo”.

Ao professor Nelson pelas sugestões no exame de qualificação, por ter fornecido uma água ultra-pura para realização dos experimentos. Ao professor Wendell Coltro por proporcionar a realização de algumas etapas das reações em seu laboratório.

A todos os colegas do laboratório de biologia molecular que tive o prazer de conhecer, dentre eles: Sheila, Meire, Marta, Andreia, Lilian, Mariana, Laura, Luiz Paulo, Leandro, André e Igor. Ao apoio do pessoal do laboratório de GME, principalmente ao Eulício, Fabrício, Carol, Cariolanda, Gerson, Roger, Lucas, Anderson (Gaúcho) e Cyro.

Em especial aos meus amigos do laboratório de Biomicrofluídica: Thiago Dadalto (Thêago cérebro), Geovana (Tchofãna) e Thiago Moreira (Rock Balboa), foram incontáveis vezes que buscamos solucionar problemas, limitações e desenvolvimento da pesquisa. Gostaria de destacar que vocês foram muito além de um apoio científico, vocês proporcionaram um ambiente de trabalho maravilhoso, muito obrigada pelo companheirismo, amizade, pelas conversas nos intervalos de almoço, pelas piadas de nossas situações científica, pelo meu novo apelido: berinkezia, enfim pelos vários momentos compartilhados e pelo convívio diário.

A Capes pela bolsa de estudo.

A Juliane Borba e Emanuel Carrilho pela colaboração no desenvolvimento desta dissertação.

A todos vocês o meu sincero agradecimento. Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIACOES.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Amplificação isotérmica de DNA mediada por <i>loop</i> (LAMP).....	5
1.1.1 Etapa não-cíclica	6
1.1.2 Etapa cíclica	8
1.2 Detecção visual	11
1.3 Vantagens e desvantagens da LAMP	14
1.4 LAMP em microdispositivos	18
1.5 <i>Escherichia coli</i>	22
2. OBJETIVOS.....	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	25
3.1 Materiais e reagentes.....	25
3.2 Amostras:	26
3.2.1. Extração de DNA da bactéria <i>E.coli</i>	26
3.2.2. Sequência dos iniciadores para amplificação do gene <i>malB</i> da <i>E.coli</i>	27
3.3. Microdispositivos de PeT.....	28
3.3.1. Fabricação dos microdispositivos de PeT.....	28
3.3.2. Passivação dos microdispositivo de PeT	30

3.4. Desenvolvimento e otimizações da LAMP em microdispositivos de PeT	30
3.4.1. Separação eletroforética dos fragmentos de DNA amplificados por LAMP	32
3.4.2. Detecção visual dos produtos de ampliações	33
3.5. Caracterização das transparências utilizadas na fabricação dos dispositivos	33
3.5.1. Espectroscopia na região do UV-vis	33
3.5.2. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)	33
3.5.3. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS).....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Microchip de PeT	35
4.1.1. Passivação da superfície de poliéster e otimização das dimensões da microcâmara reacional	36
4.1.2. Diferentes transparências para a fabricação de microdispositivos de PeT	40
4.2. Otimização da LAMP nos microchips de PeT.....	47
4.2.1. Avaliação de dois diferentes tipos de <i>Bst</i> DNA polimerase	47
4.2.2. Alterações na concentração de Betaína	49
4.2.3. Tempo de reação	51
4.2.4. Detecção do gene <i>malB</i> da <i>E.coli</i> em microdispositivos de PeT ..	52
4.2.5. Detecção visual	54
4.2.6. Filmes transparentes como alternativas para fabricar microchips para LAMP	58
4.2.7. Comparação do perfil de amplificação por LAMP no microchip de PeT com a LAMP realizada por outros trabalhos em outras plataformas ..	59
5 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da etapa não-cíclica da LAMP. A) Desenho das seis regiões distintas da sequência alvo, denominadas, F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3 e desenho dos pares internos, FIP e BIP, e externos, F3 e B3. B) Início da etapa não-cíclica. (TOMITA *et al.*, 2008)..... 8
- Figura 2.** A) Representação da etapa cíclica de amplificação molecular LAMP. Nesta figura observa-se que nessa etapa o deslocamento da fita é proporcionado somente pelos iniciadores internos FIP e BIP [5 e 7]. A fita complementar é deslocada pela formação de um *loop* na região B1 e B1c na extremidade 3' [6]. A medida que essa síntese é iniciada a outra fita sintetizada pelo iniciador interno FIP é liberada [7a]. A formação de cópias inversamente alternadas da sequência alvo [9a] juntamente com o anelamento dos iniciadores internos podem gerar n-estruturas.[10-12] (TOMITA *et al.*, 2008). B) Separação eletroforética via gel de agarose, apresentando as múltiplas estruturas (diferentes tamanhos de fragmentos) formadas ao final da LAMP para a amplificação do gene *malB* da bactéria *Escherichia coli*..... 10
- Figura 3.** A) Representação das etapas de fabricação dos microchips de poliéster-toner. (I) filme de poliéster; (II) filme de poliéster revestido com três camadas de toner em ambos os lados; (III) *layout* do microdispositivo, canal e reservatório recortado em uma cortadora a laser; IV) Alinhamento das cinco folhas de poliéster, sendo três camadas intermediárias, uma base e um topo. (B) Dispositivo pronto. Adaptado de Duarte *et al.*, 2011..... 29
- Figura 4.** Representação da amplificação LAMP em microdispositivos de PeT. 31

Figura 5 A) Estudo da passivação dinâmica da superfície do poliéster para melhoria da eficiência da LAMP. Avaliação do sucesso da reação adicionando 0, 10, 15 ou 20 pedaços de Pe em um tubo contendo 25 µL de solução, na presença e ausência de BSA na mistura reacional. B) Dimensão da microcâmara reacional.....	38
Figura 6. Gel de agarose a 2% corado com GelRed, apresentando os produtos de ampliações do gene <i>malB</i> da bactéria <i>E.coli</i> em microchip de PeT com diferentes quantidades de DNA e diferentes passivações do microdispositivo. A) Microdispositivo com passivação prévia da superfície. B) Passivação dinâmica. C) Microdispositivo sem nenhuma passivação. Para os três painéis (A, B e C): M) Marcador 1 kb Invitrogen; amostras 1-8, produtos de ampliações em diferentes números de cópias de DNA: 1) controle negativo; 2) 10 ⁶ cópias; 3) 10 ⁵ ; 4) 10 ⁴ ; 5) 10 ³ ; 6) 10 ² ; 7) 10; 8) 1 cópia.	40
Figura 7. Espectro de transmitância no UV-vis de diferentes transparências (CG 5000 e Ink Jet Multilaser).....	42
Figura 8. Amplificação do gene <i>malB</i> em microdispositivos de PeT utilizando diferentes transparências. M. Marcador; 1. Controle negativo; 2. Controle positivo com transparência CG 5000; 3. Controle positivo com transparência Ink Jet Film.	44
Figura 9. Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos (em pares de base, pb) amplificados por LAMP nos microchips de PeT. 15 e 1500 pb são marcadores de tamanho.....	45
Figura 10. Micrografias evidenciando a diferença entre as superfícies das duas transparências: A) transparência para impressão a jato de tinta (InkJet Multilaser). B) Transparência para impressão a laser (CG 5000).....	46
Figura 11. Espectroscopia dispersiva de energia de raio-X (EDS) para análise de filmes de transparência com diferentes marcas (A) Inkjet Multilaser e (B) CG 5000, 3M.....	46
Figura 12. Produtos de ampliações utilizando diferentes enzimas (<i>Bst</i> e <i>Bst 2.0</i>) em diferentes quantidades de cópias iniciais de DNA. NC) Não contem DNA. As reações foram aquecidas a 66 °C apresentando produtos de ampliações em tempos mínimos de incubação equivalente a 180 min para a <i>Bst</i> e 60 min para a <i>Bst 2.0</i>	48
Figura 13. Tempo de detecção dos produtos de ampliações utilizando diferentes enzimas (<i>Bst</i> e <i>Bst 2.0</i>). Diferentes concentrações das enzimas foram utilizadas, 0.96 U µL ⁻¹ para a <i>Bst</i> ou 0.8 U µL ⁻¹ a <i>Bst 2.0</i> . A mistura reacional foi aquecida a 66 °C em diferentes tempos de incubação: 60, 90 e 120 min e posteriormente por separação eletroforética em gel de agarose foram confirmados os produtos de ampliações.....	49

Figura 14. A) Confirmação dos produtos de ampliações com diferentes quantidades iniciais de DNA modificando a concentração inicial da betaína na mistura reacional.B) Gel de agarose 2% mostrando a variação da intensidade dos produtos de ampliações ao alterar a concentração final de betaína (concentração final de DNA igual a 1 ng μL^{-1} . Amostras: 1) controle negativo; 2) 0,8 M; 3) 1 M e 4) 1,2 M.....	50
Figura 15. Amplificação do gene <i>malB</i> em diferentes tempos de incubação variando o numero de cópias iniciais.....	52
Figura 16. Gel de agarose a 2% corado com GelRed, apresentando os produtos de ampliações da bactéria <i>E.coli</i> em microchip de PeT com diferentes quantidades de DNA variando de 10^6 - 0,1 cópias. Amostras: M) Marcador 1 kb Invitrogen; NC) controle negativo.....	53
Figura 17. Limite de detecção em microdispositivos de PeT partindo de diferentes quantidades de cópias iniciais do fragmento de gene <i>malB</i> inseridas na mistura reacional.....	54
Figura 18. Detecção visual dos produtos de ampliações do gene <i>malB</i> via LAMP quando em diferentes quantidades de cópias iniciais do alvo. Coloração visualizada devido a adição de dois diferentes intercaladores de DNA seguida da exposição da câmara reacional a uma luz UV. A) Syber green. B) Iodeto de propídeo.....	56
Figura 19. Determinação da curva analítica utilizando o tratamento das imagens pelo programa Image J. avaliando a intensidade da coloração presente em cada microcâmara reacional do dispositivo de PeT quando em diferentes quantidades iniciais de cópias de DNA.....	57
Figura 20. Detecção visual dos produtos de ampliações mediante a inserção de do intercalador Syber green na câmara reacional expostos a uma iluminação UV. O microdispositivo foi fabricado com diferentes substratos, contendo nas partes intermediarias o PeT e no topo e base substrato de PP. A) Controle Positivo; B) Controle Negativo.....	59
Figura 21. Comparação dos perfis de amplificação do gene <i>malB</i> em diferentes plataformas: a) PeT; B) Micro tubo(HILL <i>et al.</i> , 2007); C) Papel (CONNELLY <i>et al.</i> , 2015); D) PDMS (LIU <i>et al.</i> , 2011). Os poços de cada plataforma são classificados em: Plataforma A: M) marcador, NC) não contém DNA, 10^6 e 10^5 quantidades iniciais de DNA; Plataforma B: 1) controle positivo, 2) marcador, 3-5) controles negativos; Plataforma C: M) marcador, 1) controle positivo ; Plataforma D: M) marcador, 1-5 diferentes quantidades iniciais de DNA, correspondendo respectivamente a 250, 100, 25, 10 e 0.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela1. Sequência dos pares de iniciadores para LAMP da *E.coli*.... **28**

LISTA DE ABREVIATURAS

μTAS – *Micro total analysis systems* (Microsistemas para análises totais)

BSA – *Bovine serum albumine* (Albumina de soro bovina)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

LAMP – *Loop-mediated isothermal amplification* (Amplificação isotérmica mediada por *loop*)

pb – Pares de bases

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PDMS – Poli(dimetilsiloxano)

PeT – Poliéster-toner

Pe – Poliéster

PP – Polipropileno

PMMA – Poli(metilmacrilato)

POC – *Point-of-care*

Razão A/V – Razão área/volume

RNA – Ácido ribonucleico

RT-LAMP – *Reverse transcription-loop mediated isothermal amplification* (Amplificação isotérmica mediada por *loop* pós transcrição reversa)

RT-PCR – *Reverse transcription-polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase pós transcrição reversa)

TEB – Tris-EDTA-Borato

UDG – Uracil DNA Glycosylase

UFC – Unidade Formadora de Colônia

RESUMO

As diversas vantagens da miniaturização das reações de amplificação de DNA e o acoplamento com as etapas de preparo da amostra e de detecção no mesmo chip já são bem conhecidas. Até o presente momento, a maioria dos sistemas miniaturizados para a análise de ácidos nucleicos são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR necessita de controle preciso de temperatura, alternando entre aquecimento e resfriamento da solução em três temperaturas específicas. Desta forma, a adaptação da PCR em microchips é relativamente complexa apresentando algumas limitações relacionadas principalmente a utilização em lugares remotos. Sem a necessidade de ciclos de aquecimento, os microsistemas isotérmicos podem ser projetados para serem simples e de baixo consumo de energia e, portanto, pode sobrepor a PCR em sistemas de detecção portáteis. A amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) é uma técnica recente e inovadora que surgiu como uma ferramenta simples e rápida de amplificação de DNA que pode ser utilizada para detecção e identificação de diversos patógenos. A LAMP utiliza a enzima *Bst* DNA polimerase que é uma enzima com atividade de deslocamento de fita e utiliza um conjunto de quatro iniciadores desenhados a partir de seis segmentos específicos da sequência a ser amplificada. Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia simples e rápida para detecção de *E.coli* através da amplificação isotérmica do gene *malB* em dispositivos descartáveis de poliéster-toner (PeT) contendo um microcâmara com capacidade para 5 µL, e a reação foi incubada a 66 °C em um termobloco por 60 minutos. Os microchips de PeT demonstraram compatibilidade com todos os reagentes utilizados na LAMP e o sucesso da amplificação isotérmica foi observado por eletroforese em gel de agarose, obtendo quantidade de *amplicons* detectáveis no gel em reações que partiram de 1 cópia de DNA. Além disso, o sucesso da reação de amplificação do ácido nucleico também foi avaliado através da detecção visual dos produtos amplificados no microchip através do uso de intercaladores fluorescentes de DNA, que produziram fluorescência nas reações positivas. A LAMP realizada em microdispositivos de PeT representa um método simples e de baixo custo, que permitiu a detecção rápida (62 minutos) da *E.coli*. Devido a simples operação, e sem a necessidade de instrumentação sofisticada, a LAMP realizada no microchip

de PeT demonstrou ser uma ferramenta valiosa para diagnósticos moleculares, apresentando grande potencial para aplicações no *point-of-care*.

Palavras-chaves: LAMP, microdispositivos de PeT, *E.coli*, gene *malB*.

ABSTRACT

The several advantages of miniaturization of DNA amplification and coupling with sample preparation and detection steps on the same chip are well known. Currently, most miniaturized systems for nucleic acids analysis are based on polymerase chain reaction (PCR). PCR amplification requires precise temperature control, switching between heating and cooling solution in three specific temperatures. Therefore, the adaptation of PCR for microchip is relatively complex and presents some limitations particularly for use in remote locations. Without the need for heating cycles, isothermal microsystems for DNA amplification can be designed to be simple and low energy consumption and hence can overlap the portable PCR detection systems. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is a novel technique which has emerged as a simple and fast tool for DNA amplification which can be used for the detection and identification of several pathogens. The LAMP using Bst DNA polymerase enzyme which is an enzyme having strand displacement activity and uses a set of four primers designed from six individual segments of the sequence to be amplified. In this study, we developed a simple and rapid LAMP reaction for the *E. coli malB* gene amplification in disposable polyester toner devices (PeT) containing a microchamber with 5 μ L capacity, and the reaction was thermally controlled with a thermoblock for 60 minutes at 66 ° C. The PeT microdevices demonstrated compatibility with all reagents used in the LAMP and the success of the isothermal amplification was observed by agarose gel electrophoresis, yielding detectable amount amplicons as few as starting with 1 copy of DNA. Moreover, the success of the nucleic acid amplification reaction was evaluated by visual detection of the amplicons in the microchip by the use of fluorescent DNA intercalators, which yielded fluorescence in positive reactions. The LAMP in PeT microdevice is a simple and inexpensive method, that allowed a rapid detection (62 minutes) of *E. coli*. Because of simple operation and without the need for sophisticated instrumentation, LAMP held in microchip PeT has proven to be a valuable tool for molecular diagnostics, with great potential for applications in point-of-care.

Keywords: LAMP, PeT microdevice, *E.coli*, gene *malB*.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico de doenças ou detecção de patógenos baseiam-se na amplificação e detecção de um fragmento específico do material genético (DNA/RNA) presente em amostras ou organismos. De modo geral a amplificação ocorre *in vitro*, baseado na síntese de iniciadores (*primers*) a partir da seleção de um fragmento específico do ácido nucleico. Os iniciadores hibridizam na sequência alvo e posteriormente, em conjunto com a DNA polimerase, promovem a amplificação do fragmento de interesse durante o aquecimento. (VASOO e PRITT, 2013; CAMARGO e MUNOZ, 2014).

O desenvolvimento da microbiologia em conjunto com o avanço das técnicas moleculares vem auxiliando no diagnóstico rápido de infecções causadas por diversos patógenos. Esses métodos são sensíveis e específicos e vêm sendo utilizados com intuito de proporcionar o diagnóstico precoce de doenças infecciosas em um curto período de tempo. Estas reações de amplificação de ácidos nucleicos permitem a amplificação de um fragmento específico de DNA presentes em amostras de materiais biológicos como sangue, urina, outros fluidos corporais, cabelo e fragmentos teciduais. Amostras de microorganismos, células vegetais ou animais mesmo que com milhares de anos, também podem ser utilizadas (FODE-VAUGHAN *et al.*, 2003; PARIDA *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2009; MADEJ *et al.* 2010; WANG *et al.*, 2013).

A técnica de amplificação de ácidos nucleicos mais utilizada atualmente é a PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A PCR foi descrita em

1986 por Kary Mullis e trata-se de um processo enzimático utilizado para a amplificação de um gene específico do ácido nucleico que após hibridizado é replicado repetidamente para produzir milhares de cópias (MULLIS *et al.*, 1986).

A especificidade da PCR prove da atuação do par de iniciadores que possui uma sequência complementar ao fragmento de DNA a ser amplificado. Após o anelamento dos iniciadores uma enzima termoestável, *Taq DNA Polimerase*, auxilia na síntese da fita complementar. A amplificação do alvo é mediada por três etapas: desnaturação, hibridização e extensão. Essas etapas possuem diferentes temperaturas, alternando entre aquecimento e resfriamento até o término do ciclo. Inicialmente as fitas duplas de DNA são desnaturadas a 94 °C, posteriormente a temperatura é reduzida para que os iniciadores se anelem (temperatura que varia de acordo com o tamanho e sequência do iniciador, estando entre 55-65 °C). Após o anelamento, a temperatura é elevada para 72 °C e inicia-se a etapa de extensão. Nessa etapa os iniciadores direcionam a enzima *Taq DNA polimerase* para a síntese das fitas complementares promovendo a extensão da fita. Os ciclos de aquecimento na PCR são realizados convencionalmente em um equipamento conhecido como termociclador, que utilizam blocos metálicos que são aquecidos e resfriados de forma a aquecer e resfriar a solução. Ao término de cada ciclo o número de cópias é dobrado, produzindo ao final um número de cópias igual a 2^n , sendo n o número de ciclos de amplificação na PCR (MULLIS *et al.*, 1986; HUANG *et al.*, 1992).

O sucesso da amplificação do alvo por PCR está diretamente ligada à pureza dos ácidos nucleicos extraídos das amostras. Inibidores como a Imunoglobina G, ureia, proteinase K e altas concentrações de sais afetam diretamente a sensibilidade da técnica. Caso não haja a remoção suficiente dos inibidores, falsos resultados podem ser apresentados com relação à detecção e amplificação do ácido nucleico (KHAN *et al.* 1991; DELARUE *et al.* 2014).

Apesar da PCR possuir grande especificidade, a necessidade da remoção dos inibidores e a complexidade quanto a realização dos ciclos de aquecimento para a amplificação do ácido nucleico desfavorecem a sua adequação em laboratórios com recursos limitados ou aplicações no *point-of-care*. Assim, nos últimos anos, diferentes métodos isotérmicos de amplificação de ácidos nucleicos foram desenvolvidos na tentativa de eliminar o uso de termocicladores (GUATELLI *et al.*, 1990; LIZARDI *et al.*, 1998; VICENT *et al.*, 2004; NOTOMI *et al.*, 2000).

As técnicas isotérmicas de amplificação de ácidos nucleicos vêm se expandindo devido a facilidade quanto a manipulação e análise de sequências específicas presentes em um determinado genoma (VICENT *et al.* 2004; WU *et al.*, 2013). Tais vantagens oferecem uma alternativa atraente, uma vez que o processo de amplificação não requer variações precisas de temperatura, necessitando de equipamentos simples que mantenham a temperatura constante, sendo considerados equipamentos de baixo custo.

A amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*, LAMP), representa uma das principais técnicas isotérmicas de amplificação de DNA. O método é baseado no deslocamento da fita (NOTOMI *et al.*, 2000; MORI *et al.*, 2001; NAGAMINE *et al.*, 2002). Diferentemente da PCR, o fragmento alvo amplificado por LAMP não apresenta apenas uma região específica para atuação de um par de iniciador específico. Nessa técnica os oligonucleotídeos (iniciadores) reconhecem seis regiões específicas do gene. A identificação dessas seis regiões alvos presentes no ácido nucleico se dá pela hibridização de dois ou três pares de iniciadores. Cada par de iniciador hibridiza e direciona a enzima DNA polimerase para síntese e posterior deslocamento da fita (NOTOMI *et al.*, 2000).

Por se tratar de um método que trabalha em condições isotérmicas é considerada uma técnica molecular simples, devido à praticidade quanto à detecção do gene de interesse. Essa vantagem está diretamente associada ao tipo de DNA polimerase utilizada para a síntese, nesse caso a enzima *Bst* DNA polimerase (*Bacillus stearothermophilus*) que possui atividade enzimática à temperatura similar à de anelamento dos pares de iniciadores (60 - 66 °C) (NOTOMI *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2015).

1.1 Amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP)

A LAMP surgiu em 2000, quando Notomi e colaboradores amplificaram o fragmento de DNA presente no vírus da Hepatite, mais especificamente do tipo B (HBV). As cópias foram obtidas devido aos

deslocamentos das fitas de DNA como consequência da hibridização de dois pares de iniciadores (pares internos e externos) em seis regiões alvos presentes no DNA viral. A atuação direta dos iniciadores em seis regiões distintas do gene proporcionou grande especificidade à técnica (NOTOMI *et al.*, 2000).

Os pares de iniciadores que atuam na amplificação do alvo são denominados pares internos, FIP (*forward inner primer*) e BIP (*backward inner primer*) e pares externos (F3 e B3). Esses iniciadores amplificam o alvo alternando entre duas etapas denominadas, cíclica e não-cíclica. Os iniciadores externos atuam somente na etapa não-cíclica e executam o deslocamento da fita complementar sintetizada pelos iniciadores FIP e BIP. Os iniciadores internos atuam na formação dos *loops* (na etapa não-cíclica) e posterior amplificação inversamente alternada do alvo na etapa cíclica (NOTOMI *et al.*, 2000; TOMITA *et al.*, 2008).

De modo geral, o processo de amplificação por LAMP é iniciado após a hibridização dos iniciadores que direcionam a enzima *Bst* DNA polimerase para iniciar a síntese da fita complementar. Posteriores hibridizações e deslocamentos das fitas de DNA conduzirão a formação de novas cópias, resultando ao final da reação uma grande quantidade de cópias do gene alvo (CHIARI, 2010; CHEN *et al.*, 2011; SANTOS, 2011; WOZNAKOWSKI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013;).

1.1.1 Etapa não-cíclica

Amplificação de DNA por *loop* é iniciada na etapa não-cíclica. Nessa etapa, os *loops* são formados nas extremidades da fita de DNA. O

desenvolvimento dos *loops* se dá pela atuação dos iniciadores internos juntamente com o deslocamento propiciado pelos iniciadores externos (TOMITA *et al.*, 2008). A síntese é feita no sentido *sense* e *anti-sense*. Os iniciadores que atuam no sentido *sense* são os FIP e F3, já no sentido *anti-sense*, o BIP e B3 (NOTOMI *et al.* 2000; CHIARI, 2010).

A etapa não-cíclica, como é mostrado na Figura 1, é iniciada após a reação atingir a temperatura em que a enzima passa a ter a atividade. Primeiramente, o iniciador interno FIP se anela a região F2c da sequência alvo direcionando a enzima *Bst* polimerase para dar início a síntese de uma fita complementar [1]. Posteriormente, o iniciador externo F3 reconhece sua região específica (F3c) [2] e então se anela e direciona a enzima para iniciar a extensão da fita. A medida que a síntese é iniciada, a fita complementar sintetizada pelo iniciador FIP [3] é deslocada. Na fita complementar deslocada [3], o iniciador BIP se anela a região B2c [4]. Finalizada a síntese, o iniciador externo B3 reconhece sua região alvo (B3c) na extremidade 3' provocando o deslocamento da fita complementar anteriormente sintetizada pelo iniciador interno BIP [5]. A fita sintetizada pelo iniciador BIP [5] apresenta em suas extremidades os *loops*, indicando que o alvo pode ser amplificado posteriormente pela etapa cíclica (TOMITA *et al.*, 2008).

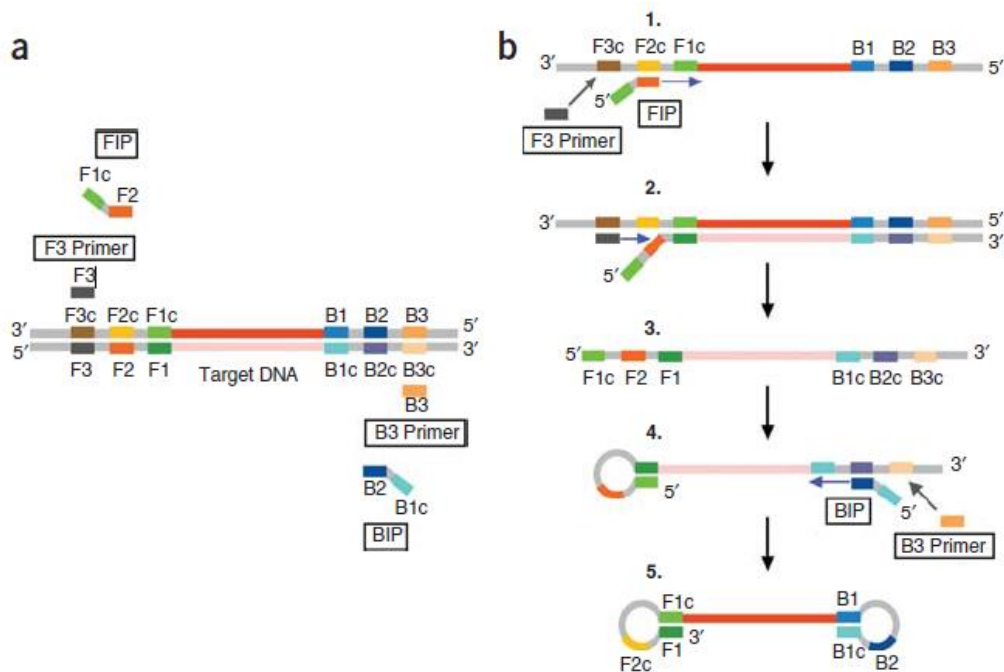


Figura 1. Representação esquemática da etapa não-cíclica da LAMP. A) Desenho das seis regiões distintas da sequência alvo, denominadas, F3c, F2c, F1c, B1, B2 e B3 e desenho dos pares internos, FIP e BIP, e externos, F3 e B3. B) Início da etapa não-cíclica (TOMITA *et al.*, 2008).

A etapa posterior (etapa cíclica) possui limitações quanto ao início da síntese, sendo necessária a identificação da fita produzida na etapa não-cíclica. NOTOMI e colaboradores (2000) em seus estudos identificaram a necessidade dessa etapa, pois sem ela haverá ausência de produtos de amplificação ao final da reação.

1.1.2 Etapa cíclica

A etapa cíclica ocorre logo após a formação de *loops*, apresentando *loops* tanto na extremidade 3' quanto na 5'. Nesta etapa somente os iniciadores internos atuam no anelamento e síntese das quatro regiões distintas do alvo, sendo elas as sequências, F2c, F1c, B1 e B2. Isso ocorre, porque diferentemente da etapa não-cíclica, as regiões em que os

iniciadores externos se anelam (F3c e B3c) não estarão presentes nessa etapa, logo, a fita sintetizada pelo iniciador interno não será deslocada pelo iniciador externo, mas será deslocada pelos *loops* formados nas extremidades da fita (NOTOMI *et al.*, 2000).

Na etapa cíclica, primeiramente, o iniciador FIP reconhece a região F2c presente na extremidade 3' do *loop* da estrutura modelo. Após o anelamento desse iniciador, esse direciona a *Bst* DNA polimerase para a síntese da fita. Finalizada a síntese é formado um intermediário haste-laço, a formação desse *loop* promove a auto-ativação (*auto-primed*) da síntese (Figura 2). Portanto na fase cíclica, após o anelamento e formação do *loop* pela região B1 e B1c, a síntese é iniciada. Com a auto-ativação da síntese promovida pelo *loop* nessa região, a fita anteriormente sintetizada pelo iniciador FIP é liberada. A fita simples liberada é uma repetição invertida da estrutura de partida, e é nessa fita invertida que o iniciador BIP reconhece a região B2c, esse se anela e sintetiza o DNA formando uma nova fita complementar que apresentará outros haste-laços produzindo novas cópias invertidas da sequência alvo. Essas sequências poderão formar múltiplas estruturas devido ao deslocamento das fitas complementares sintetizadas pelos iniciadores internos (NOTOMI *et al.*, 2000; TOMITA *et al.*, 2008). N-ciclos são repetidos até que os iniciadores internos sejam totalmente consumidos (CHIARI,2010).

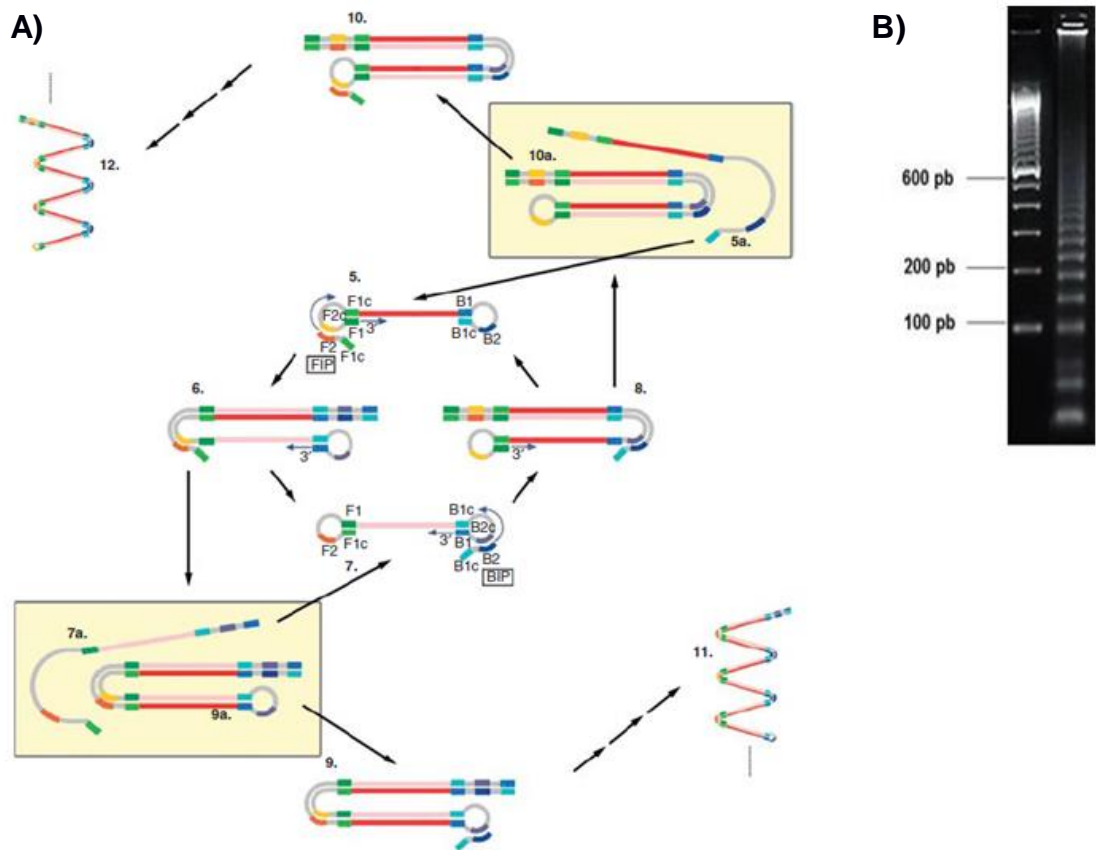


Figura 2. A) Representação da etapa cíclica de amplificação molecular LAMP. Nesta figura observa-se que nessa etapa o deslocamento da fita é proporcionado somente pelos iniciadores internos FIP e BIP [5 e 7]. A fita complementar é deslocada pela formação de um *loop* na região B1 e B1c na extremidade 3' [6]. A medida que essa síntese é iniciada a outra fita sintetizada pelo iniciador interno FIP é liberada [7a]. A formação de cópias inversamente alternadas da sequência alvo [9a] juntamente com o anelamento dos iniciadores internos podem gerar n-estruturas.[10-12] (TOMITA *et al.*, 2008). B) Separação eletroforética via gel de agarose, apresentando as múltiplas estruturas (diferentes tamanhos de fragmentos) formadas ao final da LAMP para a amplificação do gene *malB* da bactéria *Escherichia coli*.

Sendo assim, a LAMP é uma técnica molecular que promove uma repetição alternadamente invertida da sequência alvo, essa repetição alternada se dá pelo deslocamento das fitas do ácido nucleico em decorrência das etapas cíclicas e não-cíclicas. Devido a este comportamento, ao final da reação são produzidos vários fragmentos de

tamanhos diferentes, apresentando um padrão no gel de eletroforese diferente da PCR (CHIARI, 2010).

1.2 Detecção visual

Tradicionalmente, a detecção dos produtos amplificados por técnicas moleculares como a PCR é feita por separação eletroforética em gel. Porém, a possibilidade de reduzir etapas e simplificar a detecção podem ser alternativas que reduzam o tempo para o resultado final. (KUMAR e MONDAL, 2015). Além da vantagem quanto à manipulação isotérmica, a LAMP destaca-se também pela alternativa da detecção visual (PHAM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2008; DRAME *et al.*, 2014).

O desenvolvimento da detecção visual conjugada com agentes intercaladores de DNA possibilita uma análise rápida e simples para detecção e confirmação da reação de amplificação por LAMP. De modo geral os marcadores fluorescentes apresentam afinidade pelas bases de DNA, interagindo de forma espontânea as cópias dos fragmentos amplificados. Logo após a interação do intercalador às fitas de DNA, a fluorescência é gerada. A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional a quantidade de fitas de DNA intercaladas (MAO *et al.*, 2012; BHIMANI *et al.*, 2015).

A confirmação da amplificação por adição de intercaladores fluorescentes podem ser visualizada a olho nu ou sob iluminação UV. Diferentes colorações são observadas nas reações positivas (fluorescência) e negativas (ausência de fluorescência). Desta forma, os resultados são de fácil interpretação, sendo necessário um curto tempo para detecção,

facilitando a obtenção dos resultados pós-amplificação (BHIMANI *et al.*, 2015).

Nesse sentido, são descritos alguns trabalhos que relatam a visualização dos produtos amplificados pela LAMP com a inserção de corantes fluorescentes e outros pela adição de indicadores fluorescentes de íon metal. Alguns trabalhos utilizam corantes como Iodeto de Propídio (HILL *et al.*, 2008), Syber green (BHIMANI *et al.*, 2015), Hydroxynaphthol blue (DUAN *et al.*, 2014), Calceína (HSIEH *et al.*, 2014), Picogreen (CHIARI 2010), dentre outros. Esses corantes podem ser adicionados antes da reação, como o Hydroxynaphthol blue (DUAN *et al.*, 2014) e calceína (HSIEH *et al.*, 2014) ou depois da amplificação, podendo citar o Iodeto de propídeo, Syber green (HILL *et al.*, 2008) e Picogreen (CHIARI, 2010). De acordo com estudos feitos por Hataoka *et al.* (2004), a adição de alguns intercaladores de DNA fluorescentes, como o Syber green, inseridos antes do aquecimento podem inibir a amplificação por LAMP.

Os indicadores fluorescentes de metais, Hydroxynaphthol blue (DUAN *et al.*, 2014) e calceína (HSIEH *et al.*, 2014) são adicionados diretamente na mistura reacional, antes da reação. Isto minimiza a possibilidade de contaminações pós-amplificação, pelo fato da fluorescência da mistura ser visualizada logo após o aquecimento da reação não sendo necessária a abertura do tubo reacional ao final da LAMP.

Cabe mencionar que existem outras abordagens baseadas na detecção visual da LAMP, além da adição de reagentes metálicos

fluorescentes. A reação de amplificação também pode ser detectada através do monitoramento da turbidez (MORI *et al.* 2001; ENOMOTO *et al.*, 2005).

O monitoramento da turbidez baseia-se na turvação da mistura reacional, uma vez que na etapa de extensão do ácido nucleico um sub-produto pouco solúvel é liberado. A turvação da reação é originada pela reação entre íons pirofosfatos advindos do dNTP (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados) juntamente com o íon metálico divalente presente na mistura reacional. À medida que o fragmento de DNA é amplificado, íons de pirofosfatos são despreendidos na forma de sub-produtos. Esses íons possuem alta afinidade por metais divalentes (como o magnésio) ocasionando a formação de um precipitado insolúvel que conduz a turvação da reação (pirofosfato de magnésio). Quanto maior a turbidez maior é a quantidade de cópias formadas ao final da reação (MORI *et al.*, 2001; TOMITA *et al.*, 2012; HSIEH *et al.*, 2014; SUEBSING *et al.*, 2015).

Outro método de detecção visual baseia-se na adição de indicadores fluorescentes de metais. O princípio dessa detecção está na adição de um corante quelante fluorescente, sendo frequentemente utilizado a calceína. A calceína livre ou na captura de outro metal divalente emite fluorescência, exceto na presença do metal manganês. A fluorescência produzida pela calceína procede da grande quantidade de sub-produtos formados (íons pirofosfatos), esses capturam o manganês (inibidor da fluorescência) deixando-a livre. A fluorescência propiciada pela calceína pode ser intensa na captura de outro metal (magnésio) presente na solução. As reações que não contem o alvo não apresentarão fluorescência, pois a mesma está

diretamente ligada à liberação dos íons pirofosfatos ocasionados pela amplificação dos fragmentos de DNA alvo (NOTOMI, *et al.*, 2000; IMAI *et al.* 2007; XU *et al.*, 2009; TOMITA *et al.*, 2012).

1.3 Vantagens e desvantagens da LAMP

A amplificação de ácidos nucleicos por LAMP apresenta diversas vantagens, sendo elas: i) manuseio isotérmico; ii) tempos de reações que variam de 15 - 60 minutos; iii) detecção visual através da adição de corantes fluorescentes; iv) técnica molecular sensível e específica; v) amplificação do fragmento de gene específico diretamente em amostras complexas; vi) ausência de inibidores que bloqueiem a amplificação; vii) utilização de equipamento de baixo custo (NOTOMI *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2008; TOMITA *et al.*, 2008; CHIARI, *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2012; DRAPALA e KORDALEWSKA, 2013).

Devido a todas as vantagens apresentadas pela LAMP, ela vem sendo aplicada na detecção de diversos patógenos como, fungos *Paracoccidioides brasiliensis* (ENDO *et. al.*, 2004), vírus da hepatite B (HPV) (LEE *et al.*, 2007), vírus da dengue (PARIDA *et al.*, 2005), vírus Chikungunya (PARIDA *et al.*, 2007), Zika vírus (TIAN *et al.*, 2016), bactéria *Ehrlichia canis* (CHIARI, 2010), protozoários como o *Theileria annulata* (SANTOS, 2011), nematódeo parasita *Loa Loa* (DRAME *et al.*, 2014), dentre outros.

Um aspecto interessante quanto á LAMP está na especificidade da técnica. HILL *et. al* (2008) demonstraram em seu trabalho que essa técnica molecular apresenta uma detecção rápida e precisa do gene *malB* da *E. coli*. As reações foram realizadas em escala convencional sem a extração do

DNA, amplificando o alvo diretamente na amostra complexa. De 89 testes em amostras de urina, 87 confirmaram a especificidade da técnica.

A LAMP também tem demonstrado ser capaz de amplificar o gene de interesse e realizar a detecção do patógeno diretamente em amostras complexas. De acordo com os experimentos de Xu e colaboradores (2009) a detecção da *Schistosoma japonicum* pode ser feita em amostras de sangue e fezes. Neste trabalho os estudos apontaram a amplificação do gene de interesse por meio das técnicas moleculares LAMP e PCR. Em alguns casos a PCR mesmo na presença do alvo, não proporcionou a amplificação do ácido nucleico; já a mesma amostra quando submetida à LAMP foi positiva para presença do agente patogênico (HILL *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009; WOZNIAKOWSKI *et al.*, 2012). Os resultados destacaram a sensibilidade da LAMP quando comparada a PCR.

Outros trabalhos, também compararam a eficiência e robustez da PCR e LAMP (PARIDA, *et al.*, 2007; HILL *et al.*, 2008; CHEN, *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, ao utilizar a PCR os resultados obtidos apresentaram uma amplificação precisa, porém na presença de algum composto inibidor, o resultado final da análise via PCR foi comprometido. Em contrapartida a técnica de amplificação LAMP, devido à atuação específica dos pares de iniciadores na sequência alvo e também por não sofrer efeitos de inibidores, amplificou diretamente o alvo (PARIDA *et al.*, 2007; BAKHEIT *et al.*, 2008; WU *et al.*, 2013).

De acordo com os registros realizados por LLOYD *et al.* (2014), de 2005 a 2014 dezesseis trabalhos confirmaram a sensibilidade e

especificidade da LAMP resultando numa porcentagem de 95% de eficiência na detecção de infecções provenientes de *Clostridium difficile* em amostras complexas. Esses dados são similares ao estudo feito por Yan *et al.* (2016) que apontam uma porcentagem de 94% de especificidade e sensibilidade para o diagnóstico de tuberculose pulmonar.

Em contrapartida as vantagens apresentadas pela LAMP, à técnica também apresenta como sua principal desvantagem a fácil contaminação das reações podendo gerar resultados falsos-positivos. Essas contaminações podem estar ligadas a manipulação dos reagentes, instrumentos e cuidados necessários para a realização da técnica (TOMITA *et al.*, 2012).

A contaminação também pode ser proveniente de produtos de amplificações oriundas de resíduos de DNA amplificados em reações anteriores. A presença desse tipo de contaminação é um problema, uma vez que as técnicas moleculares apresentam alta sensibilidade, podendo produzir resultados falsos-positivos, diminuindo a confiabilidade do método caso haja algum contaminante (MELO, 2006).

Alguns trabalhos na literatura relatam que resíduos de DNA amplificados de reações anteriores podem ser um dos principais motivos para visualização dos falsos-positivos. Dessa forma o uso de uma enzima que clivasse prováveis contaminantes antes do aquecimento da reação seria uma alternativa que evitaria a formação de produtos inespecíficos (UDAYKUMAR *et al.*, 1993; HSIEH *et al.*, 2014; KIL *et al.*, 2015). Um método de clivagem de contaminantes foi descrito pela primeira vez por LONGO e

colaboradores (1990), utilizando uma enzima denominada *Uracil DNA Glycosylase* (UDG), tendo como objetivo a redução de contaminantes que poderiam estar presente na mistura reacional antes de realizar a amplificação por PCR (EFTEDAL *et al.* 1993; UDAYKUMAR *et al.*, 1993). Atualmente essa é utilizada com o mesmo objetivo na LAMP (HSIEH *et al.*, 2014; KIL *et al.*, 2015).

Ao utilizar a enzima UDG, a clivagem dos possíveis contaminantes só é possível com a incorporação da base uracila a fita de DNA alvo a ser amplificada, logo ao final da reação os produtos amplificados irão conter bases uracilas. Uma vez que a UDG cliva ligações de uracila, essa é adicionada antes do aquecimento da reação. Sendo assim, caso resíduos de produtos amplificados (*amplicons*) estejam presentes na mistura reacional, o tratamento dos mesmos com a UDG serão clivados antes do aquecimento e posteriormente serão facilmente hidrolisados devido aos sítios abásicos formados. Com a degradação dos contaminantes e a subsequente inativação da UDG, é iniciada a amplificação utilizando o protocolo da técnica molecular específica (PAUL e YEE, 2010; REN *et al.*, 2016).

A desvantagem desta enzima está na eliminação de contaminações provenientes de timina, já que a UDG cliva os fragmentos de DNA nas regiões específicas que contem a base uracila não rompendo ligações de contaminantes que contem outras bases, como é o caso da timina. Assim análises mais amplas do que pode estar contaminando as reações devem ser feitas (LONGO *et al.*, 1990; KIL *et al.*, 2015).

1.4 LAMP em microdispositivos

A microfluídica é uma tecnologia que tem demonstrado recentemente muitas aplicações clínicas (YAGER *et al.*, 2006; MYERS *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013) e promete ter um forte impacto em um futuro próximo nas ciências da saúde, gerando plataformas de baixo custo para implementação de diversas técnicas de diagnósticos, incluindo os diagnósticos moleculares para detecção e identificação de patógenos. Com o intuito de contornar os problemas existentes em escala convencional, cada vez mais, as comunidades clínicas buscam novos caminhos para melhorar as análises moleculares para diagnósticos, de forma que se tornem mais rápidas, eficientes e produzam resultados confiáveis. Sendo assim os diagnósticos moleculares, especialmente para monitoramento de saúde pública, representam um importante nicho para plataformas microfluídicas, que são capazes de realizar um protocolo completo de biologia molecular em um único dispositivo portátil e de baixo custo (EASLEY *et al.*, 2006).

Os sistemas microfluídicos tem demonstrado ser uma ferramenta analítica poderosa para análise de DNA e RNA, especialmente para diagnóstico molecular. Processos como extração de RNA (HAGAN *et al.*, 2011) e DNA (BREADMORE *et al.*, 2003; BIENVENUE *et al.*, 2006), a amplificação via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HÜHMER *et al.*, 2000; GIORDANO *et al.*, 2001) e separação de DNA (WOOLLEY *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1999) já são realizados em plataformas miniaturizadas.

A LAMP, por ser uma técnica molecular isotérmica e por permitir a detecção visual direta dos produtos amplificados, apresenta um grande potencial de integração analítica para realização de diagnósticos moleculares em microdispositivos. A disponibilidade de equipamentos eletrônicos para o aquecimento isotérmico dessa reação facilita o uso desta técnica molecular em ambientes que necessitam de uma análise rápida e em laboratórios com recursos limitados, auxiliando na identificação precoce de agentes patogênicos, evitando sua propagação e determinando um resultado com urgência (HATAOKA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2008; FANG *et al.*, 2010; CONNELLY *et al.*, 2015).

Recentemente, dispositivos microfluídicos integrados com a LAMP têm sido desenvolvidos para detecção de patógenos (SHEN *et al.*, 2011; TLILI *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2013). Esses dispositivos tem demonstrado grande potencial para diagnósticos moleculares rápidos de doenças infecciosas através do uso dessas plataformas acopladas a diferentes sistemas de detecção tais como colorimétrica (WU *et al.*, 2011), espectrofotométrica (FANG *et al.*, 2010) e detecção eletroquímica (NAKAMURA *et al.*, 2007).

São encontrados na literatura trabalhos que realizaram a LAMP em dispositivos microfluídicos fabricados com diferentes materiais: vidro (WU *et al.*, 2011), dispositivos poliméricos como o poli(dimetilsiloxano), PDMS (FANG *et al.*, 2010), poli(metilmetacrilato), PMMA (LEE *et al.*, 2008) e dispositivos a base de papel (CONNELLY *et al.*, 2015).

O vidro, apesar de ter suas características bem estabelecidas e por apresentar transparência ótica, algumas desvantagens do material quanto a produção de microchips como, por exemplo, tempo e custo de fabricação são fatores que limitam seu uso. Dispositivos de vidro necessitam de ambiente de sala limpa e instrumentação sofisticada para sua produção. Estas desvantagens levaram a busca por materiais alternativos para a produção mais rápida e barata dos dispositivos microfluídicos. Estes novos substratos, idealmente, devem oferecer benefícios significativos sobre o vidro como, por exemplo, facilidade e rapidez no processo de microfabricação, reproduzir canais com alta fidelidade e baixo custo. Nesta busca, os materiais poliméricos surgiram como excelente alternativa ao vidro. Dentre os materiais poliméricos, o PDMS é material mais utilizado por possuir biocompatibilidade e transparência ótica, além de baixo custo e de fácil fabricação (DUFFY *et al.*, 1998).

O papel como substrato também vem sendo utilizado para realização da LAMP (CONNELLY *et al.*, 2015). Dispositivos á base de papel são conhecidos como μ PADs (do inglês, microfluidic paper-based analytical devices). Diagnósticos em dispositivos analíticos de papel tem sido implementados com sucesso devido ao fluxo lateral espontâneo apresentado por este substrato hidrofílico e poroso que realiza com simplicidade o transporte microfluídico das soluções. Estes sistemas requerem mínima preparação de amostras e nenhuma instrumentação. Conelly e colaboradores (2015) detectaram *E.coli* em dispositivos á base de papel,

através a amplificação do gene *malB* integrando extração e amplificação por LAMP e detecção visual no próprio dispositivo utilizando Syber green.

Um polímero que vem sendo utilizado com sucesso para produzir microdispositivos são os filmes de poliéster (transparência para impressão) (DUARTE *et al.*, 2011; DUARTE *et al.*, 2012; GABRIEL *et al.*, 2013). O método de impressão direta utilizado para produzir os dispositivos microfluídicos foi descrito pela primeira vez por Lago e colaboradores (2003) e utiliza uma camada de toner depositada no filme de poliéster para definir os microcanais. O toner também serve como adesivo para vedação do dispositivo através de uma etapa de laminação a quente.

Dispositivos de poliéster-toner (PeT) com canais mais profundos também podem ser construídos, como descrito por Duarte *et al.* em 2011. Neste caso, são utilizados mais do que dois filmes de poliéster na montagem do microchip e os canais são definidos por uma cortadora a laser e não pela impressora. A profundidade dos canais é definida pelo número de transparências inseridas entre a base e o topo do microchip. Cada filme de transparência possui cerca de 100 μm e dessa forma, dispositivos feitos com três filmes de poliéster (base, intermediário e topo) possuem canais com aproximadamente 100 μm de profundidade. Quando o dispositivo é feito com quatro filmes (base, dois filmes intermediários e topo) os canais possuem profundidade de aproximadamente 200 μm .

O processo rápido e de baixo custo de produção dos dispositivos dispensam o uso de equipamentos sofisticados. Os microchips de PeT já demonstraram serem compatíveis com todas etapas analíticas de uma

análise genética (DUARTE *et al.*, 2011, DUARTE *et al.*, 2012). Neste contexto, os microchips de PeT representam uma alternativa simples e barata para produção de dispositivos para aplicações bioanalíticas. A simplicidade de produção dos dispositivos, o baixo custo de materiais e equipamentos necessários para fabricação e a possibilidade de integrar diferentes domínios nos dispositivos, tornando possível a produção de um verdadeiro *lab-on-a-chip*, fazem com que os microchips de PeT apresentem grande potencial para produção de dispositivos microfluídicos para análises genéticas.

1.5 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) pertence à família Enterobacteriaceae, uma família que contém bacilos gram-negativos. Cabe mencionar que esta bactéria apresenta grande diversidade patogênica e por isso representa uma das bactérias mais estudadas (MEAD *et al.*, 1999). Além disso, essa bactéria também pode ser utilizada para estudos voltados a análise de resistência antimicrobiana por ser considerada uma bactéria intestinal capaz de adquirir resistência a antibióticos (KANG *et al.*, 2005).

Como patógenos, são classificadas em diferentes cepas que possuem diferentes atividades de contágio. Essas variações dependem do tipo de virulência podendo ser classificadas em: uropatogênicas, produtoras de toxina de Shiga, enterotoxigênicas, meningite neonatal, enteropatogênica, enteroinvasivas (RUSSO e JOHNSON, 2003; CONSTANTINIU *et al.*, 2001; SCHREMMER *et al.*, 1999). Esses organismos patogênicos promovem desde contaminações alimentícias (ARAÚJO *et al.*, 2002) até contaminações

intra e extra-intestinais, incluindo a infecção no trato urinário (DUNITZ *et al.* 2014). Como consequência efeitos colaterais ocasionados por esses patógenos podem lesionar a mucosa intestinal, ou promover infecções urinárias (DUNITZ *et al.*, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho visa o desenvolvimento e otimização de uma metodologia de amplificação isotérmica de DNA mediada por *loop* (LAMP) em microdispositivos descartáveis de poliéster-toner (PeT).

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições experimentais para amplificação do gene *malB* da *E.coli* por LAMP em microdispositivos de PeT
- Avaliar a necessidade da passivação da superfície da câmara reacional
- Separar os fragmentos amplificados através da LAMP por eletroforese
- Avaliar o uso da detecção visual dos produtos amplificados mediante o uso de intercaladores fluorescentes de DNA.
- Avaliar a sensibilidade da técnica realizada nos microdispositivos de PeT.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes

Os filmes de poliéster (transparência) foram adquiridos da 3 M, modelo CG 5000 (Austin, TX,USA) e Multilaser, modelo InkJet film (São Paulo,SP, Brasil).

A água utilizada no preparo das soluções foi água ultrapura, Sigma Aldrich W4502 (livre de DNase, RNase e Protease). O marcador padrão de tamanhos de DNA *100 pb DNA ladder* foi obtido junto à Invitrogen/Life Technologies (Foster City, CA). Os dNTP's foram adquiridos da Ludwig Biotech (Alvorada, RS) e dUTP obtidos da Applied biosystems (Warrington, UK). A Betaína, etanol, hidrocloreto de Guanidina (GuHCl) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Albumina de soro bovina (BSA) foi obtida junto à Amersham/GE Healthcare. A proteinase K (20 mg mL^{-1}) foi obtida da Qiagen (Valência, CA). Os reagentes Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e etilenodiaminotetracético (EDTA) foram obtidos junto à Vetec/Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Triton X-100 foi adquirido junto à Usb Corporation (Cleveland, OH). Os iniciadores foram obtidos da IDT (San Diego, USA). A enzima *Bst* DNA polimerase e sulfato de magnésio (MgSO_4) foram adquiridos junto à New England Biolabs (Ipswich, MA).

3.2 Amostras:

As bactérias *Escherichia coli* BL21 foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (UFG), Campus Samambaia, Goiânia, GO.

3.2.1. Extração de DNA da bactéria *E.coli*

Todos os experimentos de amplificação de DNA realizados neste trabalho utilizaram como alvo DNA pré-purificado da bactéria *E.coli* BL21 extraídos através de metodologia convencional de extração de DNA.

Para o preparo do cultivo da bactéria, inicialmente foi feito um estriamento prévio da bactéria em placa de petri com meio LB sólido (37 °C por 16 horas). Posteriormente uma UFC foi selecionada e cultivada em meio LB líquido por 16 h a 37 °C sob agitação (120 rpm).

Pipetou-se 1,2 mL da cultura da bactéria *E.coli* adicionou a um tubo Eppendorf e centrifugou a 1300 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação, eliminou-se o sobrenadante e foi adicionado 600 µL de solução de lise de DNA (50 µM Tris pH 7,6; 20 mM solução EDTA; 400 mM NaCl, 1% SDS). A mistura foi incubada por 10 minutos a 80 °C. Posteriormente as amostras foram esfriadas em banho de gelo por 5 minutos. Adicionou-se 3 µL da solução de RNase (24 µg mL⁻¹) e incubou-a a 37 °C por 15 minutos. Foi acrescentado 200 µL de NaCl 5 mol L⁻¹ na mistura homogeneizada por inversão e levou-a ao banho de gelo por 5 minutos. A mistura foi centrifugada a 1300 rpm por 3 minutos. Transferiu o sobrenadante para um novo tubo que já continha 600 µL de isopropanol PA a temperatura ambiente

e foi levado ao banho de gelo por 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 1300 rpm durante 15 minutos e descartou o sobrenadante. O precipitado foi ressuspendido em 600 µL de etanol 70%. A mistura foi centrifugada a 1300 rpm por 2 minutos e descartou o sobrenadante. O precipitado foi submetido à secagem em temperatura ambiente por 24 horas e posteriormente o precipitado foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura e estocado a -20 °C.

3.2.2. Sequência dos iniciadores para amplificação do gene *malB* da *E.coli*

Para a amplificação do gene *malB* da *E.coli*, três pares de iniciadores foram utilizados. A formulação desses iniciadores foi baseada no protocolo descrito por Hill e colaboradores (2008), chamados de iniciadores internos, externos e *loops*, sendo eles: iniciadores externos (F3 e B3), ambos apresentando 18 bases em sua estrutura; iniciadores internos (FIP e BIP) com 40 e 42 bases respectivamente; iniciadores *loop* (LF e LB) com 24 e 25 bases respectivamente. A Tabela 1 mostra a sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho.

Tabela1: Sequência dos pares de iniciadores para LAMP da *E.coli*

Iniciadores	Sequência dos Iniciadores 5' → 3'
F3	GCCATCTCCTGATGACGC
B3	ATTACCGCAGCCAGACG
FIP	CATTTTGCAGCTGTACGCTCGCAGCCCATCATGAATGTTGCT
BIP	CTGGGGCGAGGTCGTGGTATTCCGACAAACACCACGAATT
LF	CTTTGTAACAACCTGTCATCGACA
LB	ATCAATCTCGATATCCATGAAGGTG

3.3. Microdispositivos de PeT

3.3.1. Fabricação dos microdispositivos de PeT

Os microdispositivos de PeT foram fabricados como descrito anteriormente por Duarte *et al.* em 2011, utilizando uma impressora a laser (HP laser Jet P4014n) e uma cortadora a laser de CO₂ (Red Sail laser, modelo M500), cortados na empresa GravLaser (Goiânia, GO).

Para a fabricação dos microdispositivos de poliéster-toner foram utilizados 5 filmes de poliéster, divididos em partes intermediárias, topo e base, como ilustrado na Figura 3. Nas partes intermediárias, os filmes de poliéster (transparência) recobertos com toner foram recortados como o auxílio de um cortadora a laser e criadas microcâmaras com 7 mm x 2 mm. Para a câmara reacional de 5,0 µL, foram utilizados 3 filmes de poliéster-

toner entre a base e o topo. Para base e topo foram utilizados apenas filmes de poliésteres e no topo foram criados furos para dar acesso aos reservatórios. Os filmes foram alinhados e laminados em uma laminadora operando a 170°C.

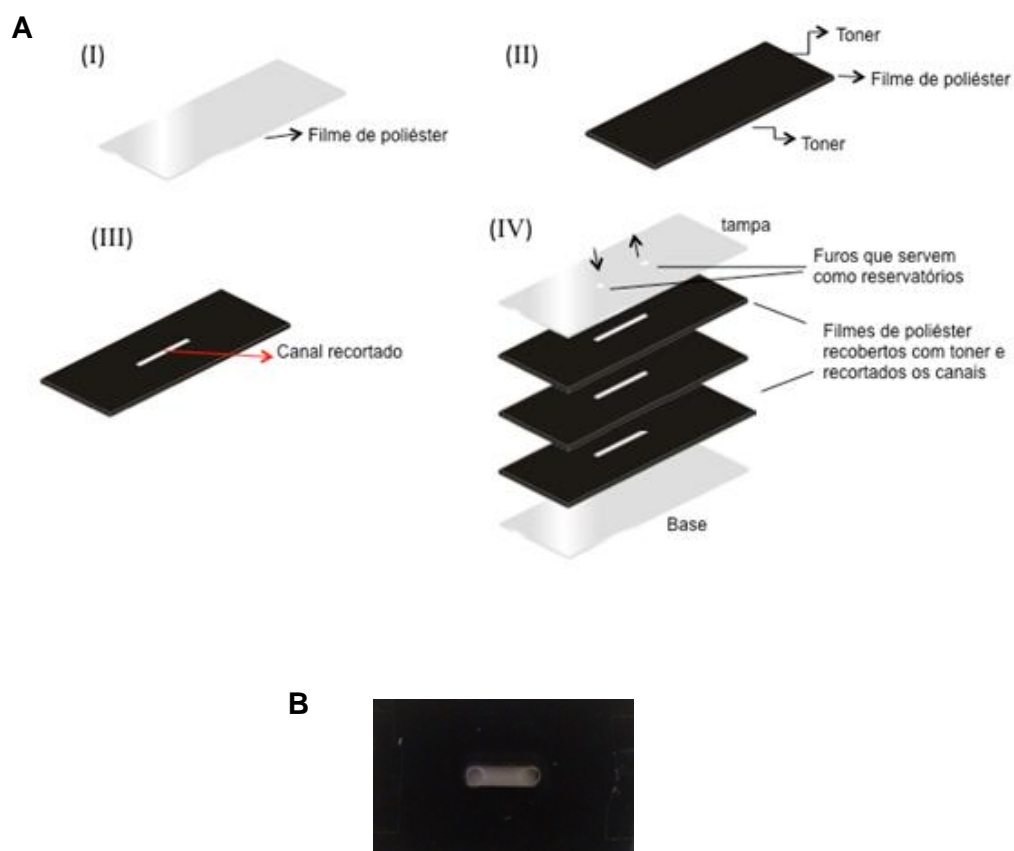


Figura 3. A) Representação das etapas de fabricação dos microchips de poliéster-toner. (I) filme de poliéster; (II) filme de poliéster revestido com três camadas de toner em ambos os lados; (III) *layout* do microdispositivo, canal e reservatório recortado em uma cortadora a laser; (IV) Alinhamento das cinco folhas de poliéster, sendo três camadas intermediárias, uma base e um topo. (B) Dispositivo pronto. Adaptado de Duarte *et al.*, 2011.

3.3.2. Passivação dos microdispositivo de PeT

Após a laminação do dispositivo, a microcâmara reacional do dispositivo foi preenchida com uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a uma concentração de $0,6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Após a evaporação dessa solução, a mistura reacional LAMP foi adicionada a microcâmara do microdispositivo.

3.4. Desenvolvimento e otimizações da LAMP em microdispositivos de PeT

Inicialmente os reagentes que compõe a mistura reacional foram adicionados e homogeneizados em microtubos de polipropileno (Figura 4).

A mistura reacional foi preparada com a seguinte composição: $0,2 \text{ } \mu\text{M}$ dos iniciadores externos F3 e B3; $1,6 \text{ } \mu\text{M}$ dos iniciadores internos FIP e BIP; $0,8 \text{ } \mu\text{M}$ dos iniciadores *loop* LF e LB; $0,8 \text{ M}$ de betaína; 8 mM de MgSO_4 ; dNTP ($0,2 \text{ mM}$ dATP, $0,2 \text{ mM}$ dCTP, $0,2 \text{ mM}$ dGTP e $0,4 \text{ mM}$ de dUTP); $0,96 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ da enzima *Bst*, adicionando $2,5 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão *Bst* (10X contendo 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , $0,1\%$ Triton X-100); ou $0,8 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ da *Bst 2.0* adicionando $2,5 \text{ } \mu\text{L}$ de tampão *Bst 2.0* (10X contendo 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , $0,1\%$ Tween 20); e concentrações variáveis de DNA entre $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e $1 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ foram testados. Posteriormente com auxílio de uma pipeta, $5 \text{ } \mu\text{L}$ da solução estoque foi adicionada ao reservatório para o preenchimento da câmara reacional. Finalizado o preenchimento da

câmara, 3 μL de óleo mineral foram adicionados em cada reservatório para evitar a evaporação da solução durante o aquecimento da reação. A reação foi aquecida isotermicamente em um termobloco (Major Science, Saratoga, CA) a 66 $^{\circ}\text{C}$ por 60 min, seguida pela inativação da enzima aquecendo a reação por 2 min a 80 $^{\circ}\text{C}$. Para a otimização da metodologia variações em relação a concentração de betaína, enzima e tempo de reação foram realizadas.

Ao finalizar o tempo de incubação da reação, ou a solução era retirada do microchip para detecção dos fragmentos por eletroforese em gel ou era adicionado o intercalador fluorescente de DNA para detecção visual, como mostrado no esquema da Figura 4.

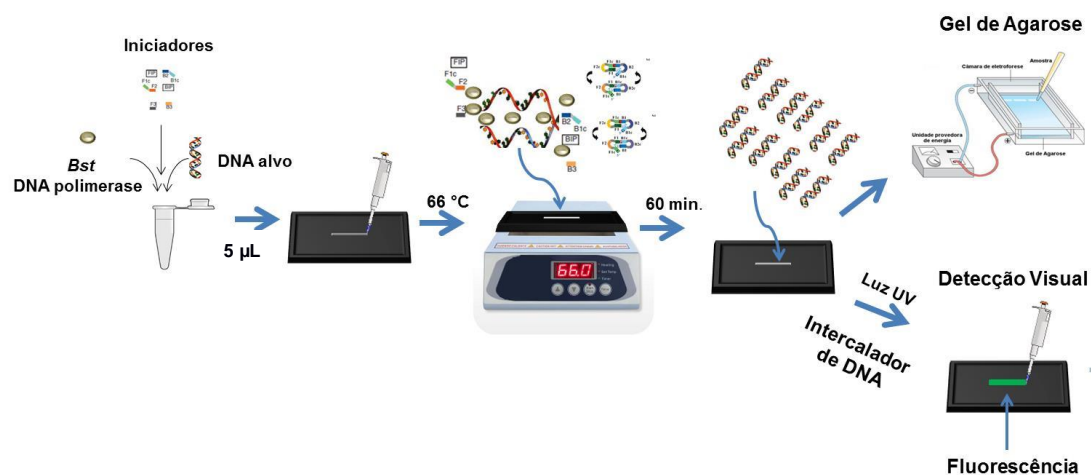


Figura 4. Representação da amplificação LAMP em microdispositivos de PET.

3.4.1. Separação eletroforética dos fragmentos de DNA amplificados por LAMP

A separação dos fragmentos de DNA amplificados por LAMP foram realizados de duas formas, gel de agarose e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies®).

A eletroforese em gel foi realizada utilizando gel de agarose a 2 % em tampão Tris-EDTA-Borato (TEB) 0,5%. A separação dos produtos foi revelada com GelRed -Biotium® em transiluminação UV. A identificação dos diferentes tamanhos de fragmentos amplificados foram avaliadas com base no tamanho molecular do marcador Invitrogen/Life Technologies (Foster City, CA) 100 pb DNA Ladder. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TEB 0,5 % nas condições de 90 V, em tempos variando de 30 e 115 minutos.

Após o tempo de corrida, as bandas de DNA foram visualizadas através de um transiluminador UV acoplado a um sistema de fotodocumentação (*GE Healthcare lifesciences*).

Algumas separações de DNA foram realizadas no equipamento Bioanalyzer 2100. A metodologia utilizada foi de acordo com o protocolo do fabricante (Agilent DNA 1000 Kit Guide). De modo geral cada chip para análise de DNA possui 12 poços, utilizados para separações independentes. Os produtos são analisados por Fluorescência Induzida a Laser, separando os diferentes fragmentos de DNA amplificados.

3.4.2. Detecção visual dos produtos de ampliações

Para a detecção visual dos produtos amplificados por LAMP foram testados dois corantes fluorescentes, o Iodeto de Propídeo e Syber green (1:10), na proporção de 0,5 µL a cada 5 µL da reação final. O corante foi adicionado e homogeneizado diretamente na microcâmara ao final da reação. Posteriormente a câmara reacional foi exposta a uma iluminação por lâmpada UV (320 nm) e as imagens do microchip foram obtidas com uma câmera de celular.

3.5. Caracterização das transparências utilizadas na fabricação dos dispositivos

3.5.1. Espectroscopia na região do UV-vis

As medidas de transmitância dos substratos foram efetuadas no espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 45 da PerkinElmer). As transparências analisadas (CG 5000 e Inkjet Multilaser) foram cortadas a 1 cm². O espectro foi produzido fazendo uma varredura de 200 a 800 nm, promovendo a caracterização da transmitância de cada transparência.

3.5.2. Microscopia Eletrônica de varredura (MEV)

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas em um microscópio da marca Jeol, modelo JSM – 6610. Esta análise

foi realizada no Laboratório multiusuário de microscopia de alta resolução (LabMic) na Universidade Federal de Goiás.

As transparências (CG 5000 e Ink Jet Multilaser) foram recobertas com uma fina camada de ouro por 2 minutos utilizando o equipamento Denton Vacuum, Desk V.

A incidência de um feixe de elétrons diretamente nessa transparência (recoberta com filmes de ouro) forneceu um sinal elétrico que gerou a imagem. A imagem do material foi capturada através de uma diferença de potencial aplicado de 5 kV, potenciais superiores comprometeram a análise (queima do material).

3.5.3. Espectroscopia Dispersiva de Raios-X (EDS)

Análise de Energia Dispersiva (EDS) foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos (CAQ/IQSC/USP) em um equipamento EDX LINK ANALYTICAL, (Isis System Series 300), com detetor de SiLi Pentafet, janela ultrafina ATW II (Atmosphere Thin Window), de resolução de 133eV à 5,9 keV e área de 10 mm² quadrado, acoplado a um Microscópio Eletrônico ZEISS LEO 440 (Cambridge, England). Utilizou-se padrão de Co para calibração, feixe de elétrons de 20 kV, distância focal de 25 mm, dead time de 30%, corrente de 2,82 A e I probe de 2,5 nA. A área da amostra analisada foi de 320x320 mm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Microchip de PeT

Os microchips de PeT já foram utilizados com sucesso para amplificação de DNA do fago lambda, da bactéria *Azospirillum brasilense* e DNA humano por PCR (OUYANG *et al.*, 2015), e este trabalho utilizou pela primeira vez os microdispositivos de PeT para a amplificação isotérmica de DNA para detecção de *E.coli*.

Os microchips de PeT são de fabricação fácil, rápida e de baixo custo. Os equipamentos necessários são computador, impressora a laser, laminadora de documento e cortadora a laser. O único equipamento que pode elevar o custo de fabricação é a cortadora a laser. Porém, é possível encontrar no mercado cortadoras a laser com o custo bem reduzido (em torno de R\$ 5.000,00) ou ainda existe possibilidade de realizar esse serviço em empresas terceirizadas que disponibilizam o serviço, como foi feito neste trabalho, onde se cobra em torno de R\$ 80,00 a hora da máquina. Em uma hora de uso da máquina cortava-se a quantidade de PeT suficiente para produzir 250 microchips. Deste modo, o custo referente ao uso da cortadora a laser foi cerca de R\$ 0,32 por dispositivo. Incluindo todos os gastos com materiais e serviços (poliéster, toner e corte a laser) o custo de cada microchip foi inferior a R\$ 0,50.

Devido ao baixo custo do dispositivo e a facilidade de fabricação, os microchips de PeT podem ser descartáveis, o que simplifica ainda mais seu uso, pois dispensa lavagens do dispositivo para novos usos, embora isso

seja possível. O fato do dispositivo de PeT ser usado apenas uma vez minimiza problemas de contaminação entre as reações.

4.1.1. Passivação da superfície de poliéster e otimização das dimensões da microcâmara reacional

Já está bem estabelecido na microfluídica que a realização de reações químicas em microescala requer atenção especial para o potencial de adsorção das espécies na superfície do substrato. A grande razão área/volume (A/V) nas câmaras reacionais dos microdispositivos pode causar efeito negativo na eficiência das reações por possuir uma grande área superficial disponível para a adsorção das espécies envolvidas.

Para avaliar qual seria o efeito da grande área superficial nos dispositivos de PeT utilizados para LAMP e a necessidade de passivação da superfície realizou-se a reação em tubos contendo 25 μL de reação na presença de pedaços recortados de poliéster (Pe). O sucesso das reações quanto a exposição dos reagentes da LAMP ao filme de poliéster foi avaliada variando o número de pedaços de Pe adicionados no tubo. Foram adicionados a 25 μL de mistura reacional 0, 10, 15 ou 20 pedaços de Pe recortados nas seguintes dimensões: 1 mm (largura), 5 mm (comprimento) e 0,1 mm de espessura, correspondendo a uma área superficial de aproximadamente 10,0 mm^2 (considerando os dois lados). Para todas as reações foram avaliadas o sucesso da reação adicionando ou não BSA na mistura reacional. O sucesso da reação foi avaliado pela presença de produto detectável por eletroforese em gel.

A Figura 5 mostra que a adição de BSA ($0,24 \text{ mg mL}^{-1}$) na mistura reacional foi eficaz para evitar a inibição da LAMP para reações contendo até 15 pedaços de Pe (100% das reações ocorreram). Com 20 pedaços de Pe apenas 17% das reações obtiveram sucesso. Experimentos adicionais foram realizados inserindo um pedaço de Pe recoberto com toner com área superficial de $10,0 \text{ mm}^2$ em cada tubo contendo as mesmas quantidades de Pe apresentadas na Figura 5, apenas para avaliar se a presença do toner provocaria algum efeito negativo nas reações. Os resultados mostraram o mesmo comportamento das reações na presença e na ausência de toner. Sugerindo dessa forma que a presença de uma pequena quantidade de toner em contato com a solução (correspondente a cerca de 5% da área total de Pe) não tem nenhum efeito negativo na LAMP.

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram a necessidade do uso de BSA para melhoria da eficiência da reação e a necessidade de se controlar a razão área de Pe e volume de solução na LAMP. Os dados fornecidos por esses experimentos, mostraram o sucesso da LAMP na presença de até 15 pedaços de Pe com $10,0 \text{ mm}^2$ em $25 \text{ }\mu\text{L}$ de solução (razão A/V de $6 \text{ mm}^2 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$). Dessa forma produziu-se dispositivos com uma microcâmara com uma razão A/V de $6 \text{ mm}^2 \text{ }\mu\text{L}^{-1}$ (dimensões da câmara: 7 mm de comprimento, 2 mm de largura e 0,35 mm de profundidade) sendo 95% da câmara constituída por poliéster e 5% constituída por toner. A câmara nessas dimensões possui capacidade para $5 \text{ }\mu\text{L}$ de solução.

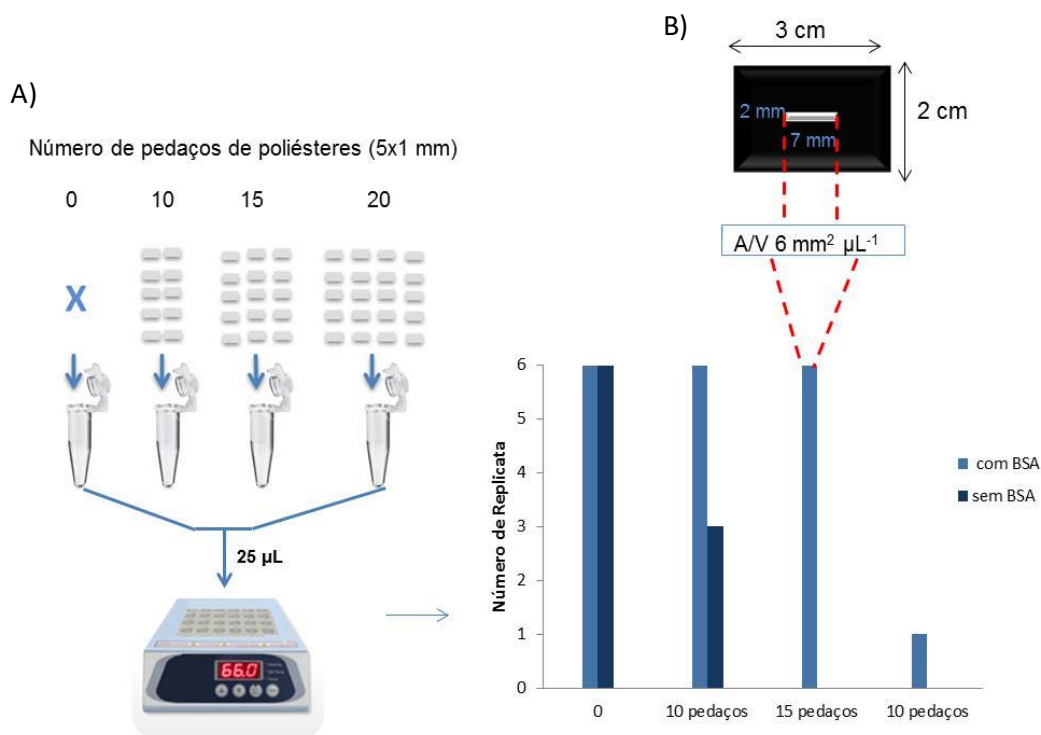


Figura 5: A) Estudo da passivação dinâmica da superfície do poliéster para melhoria da eficiência da LAMP. Avaliação do sucesso da reação adicionando 0, 10, 15 ou 20 pedaços de Pe em um tubo contendo 25 µL de solução, na presença e ausência de BSA na mistura reacional. B) Dimensão da microcâmara reacional.

Os resultados obtidos neste trabalho foram semelhantes aos resultados obtidos por Ouyang e colaboradores (2015) que realizaram reações de amplificação de DNA por PCR em microdispositivos de PeT utilizando uma câmara de PCR com capacidade para 2 µL e uma razão A/V de 9 mm² µL⁻¹ sendo 95% da superfície constituída de poliéster (Pe). Os autores mostraram que a grande razão A/V pode ter um impacto negativo na PCR devido à adsorção indesejável de *Taq* DNA polimerase e outros componentes da reação e demonstrou pela primeira vez a necessidade da passivação da superfície de poliéster para melhorar a eficiência da reação de amplificação de DNA por PCR. Para minimizar o efeito da inibição da PCR e melhorar o desempenho da PCR os autores exploraram a passivação

dinâmica da superfície de Pe através do uso de BSA e de polietilenoglicol (PEG). Essas duas substâncias, adicionadas na mistura reacional da PCR, se ligam preferencialmente a parede da microcâmara minimizando a perda da *Taq* DNA polimerase por adsorção à superfície.

Para o desenvolvimento da LAMP no microchip de PeT, a passivação da superfície de Pe foi testada utilizando duas estratégias diferentes. A primeira foi tentar a passivação dinâmica, ou seja, adicionar BSA apenas na mistura reacional da LAMP. Neste caso a passivação ocorre durante a adição da mistura reacional da LAMP na microcâmara. A segunda estratégia foi a passivação prévia da superfície. Neste caso a microcâmara foi preenchida com a solução de BSA ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) e deixada até a secagem completa e, só após esse tempo, foi adicionada a mistura reacional.

As reações realizadas em microchips que passaram pela passivação prévia da superfície apresentaram sempre melhores resultados do que aquelas reações que utilizaram a passivação dinâmica (Figura 6). A quantidade de produto amplificado detectável em gel de agarose apresentou-se sempre superior nos casos de passivação prévia (Figura 6A), principalmente para baixas concentrações de DNA. Como observa-se na Figura 6B apenas para altas concentrações de DNA (10^6 cópias/reação) a reação foi bem-sucedida quando utilizou-se a passivação dinâmica. Em contrapartida, quando não utilizou-se nenhum tipo de passivação com BSA a reação não obteve sucesso para nenhuma concentração de DNA. Deste modo, optou-se pela passivação prévia da superfície da microcâmara com BSA em todas as reações.

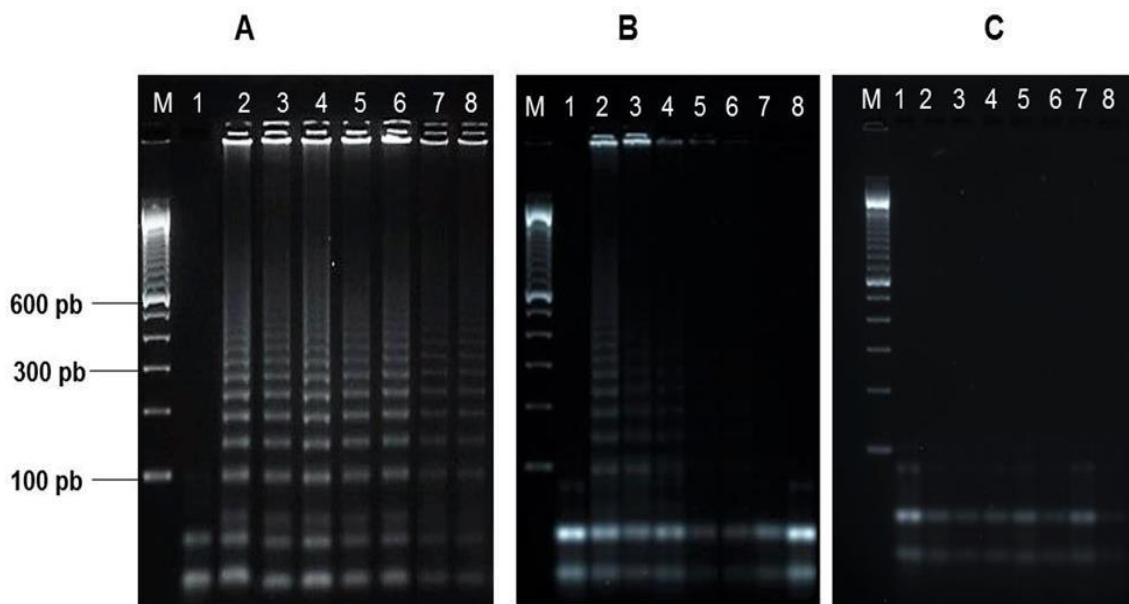


Figura 6. Gel de agarose a 2% corado com GelRed, apresentando os produtos de amplificações do gene *malB* da bactéria *E.coli* em microchip de PeT com diferentes quantidades de DNA e diferentes passivações do microdispositivo. A) Microdispositivo com passivação prévia da superfície. B) Passivação dinâmica. C) Microdispositivo sem nenhuma passivação. Para os três painéis (A, B e C): M) Marcador 1 kb Invitrogen; amostras 1-8, produtos de amplificações em diferentes números de cópias de DNA: 1) controle negativo; 2) 10^6 cópias; 3) 10^5 ; 4) 10^4 ; 5) 10^3 ; 6) 10^2 ; 7) 10; 8) 1 cópia de DNA.

4.1.2. Diferentes transparências para a fabricação de microdispositivos de PeT

A eficiência da reação de amplificação está diretamente ligada a composição do substrato utilizado para a fabricação do microdispositivo. Como descrito em trabalhos pioneiros envolvendo os microdispositivos de PeT, o toner apresenta em sua composição, óxido de ferro e uma mistura polimérica de estireno-acrilato (DO LAGO *et al.*, 2003).

Neste trabalho, a microcâmara utilizada para desenvolvimento da LAMP era constituído apenas em 5% pelo toner e 95% pela transparência. Deste modo, a maior interação das espécies é com a transparência. Diferentes transparências apresentam diferentes estiramentos do

grupamento silanol uma vez que na composição química dos filmes de poliéster apresentam uma fina camada de sílica que reveste o outro componente principal, o polietileno tereftalato (PET) (DO LAGO *et al.*, 2003; COLTRO, 2004; GABRIEL, 2012). Em geral, as quantidades de sílica presente nos diferentes tipos de transparências variam, afetando as características da superfície do substrato e conseqüentemente a eficiência da reação, uma vez que o desempenho da reação está ligado à interação do substrato (transparência) com espécies envolvidas (GABRIEL, 2012).

Inicialmente, começou-se a trabalhar com as transparências para impressão a laser (CG 5000, 3M) por ser o mesmo tipo de transparência utilizada em trabalhos anteriores que realizaram a amplificação de DNA por PCR (OYANG *et al.*, 2011). Embora a reação de amplificação do DNA estivesse sendo bem-sucedida nos microchips fabricados com as transparências para impressão a laser (sendo confirmado os produtos de amplificações do DNA através da eletroforese em gel) não era possível observar diretamente no microdispositivo a fluorescência da solução gerada após a adição do intercalador ao final da reação para realizar a detecção visual. Apenas quando a solução era retirada do microchip e colocada em tubos de polipropileno observava-se a fluorescência da solução sob incidência de radiação UV. Isso sugeriu que a transparência não estava permitindo a passagem da radiação UV. Desta forma, determinou-se o espectro de transmitância do filme de poliéster fazendo a varredura de 200 nm a 800 nm (Figura 7). Após a obtenção do espectro de transmitância do filme CG 5000 observou-se que essa transparência só possui transmitância

significativa acima de 340 nm, o que inviabilizou a utilização da radiação UV para visualização da fluorescência.

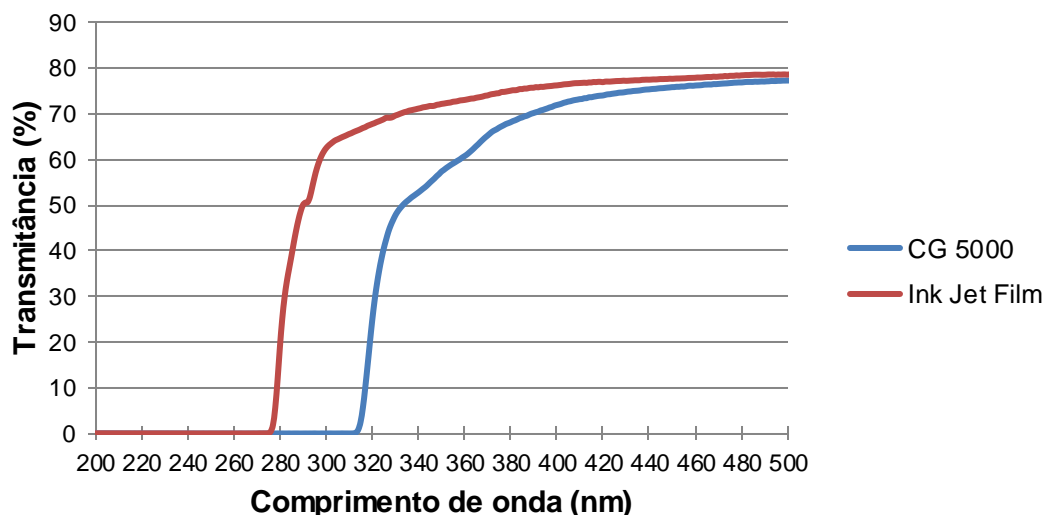


Figura 7. Espectro de transmitância no UV-vis de diferentes transparências (CG 5000 e InkJet Multilaser).

Após verificar que não seria possível realizar a detecção visual da LAMP diretamente nos microchips de PeT utilizando a transparência CG 5000, buscou-se como alternativa utilizar outros tipos de transparência que permitisse a visualização da fluorescência no próprio microchip para se fazer uso de uma das principais vantagens da LAMP, a detecção visual. Na busca por alternativas, observou-se que nas transparências para impressão a jato de tinta era possível visualizar a fluorescência da solução no próprio microchip.

Sendo assim, algumas marcas de transparências para impressão a jato de tinta foram testadas em relação à visualização da fluorescência da solução dentro do microchip. De quatro marcas testadas (Filipaper,

CopyFilm , Data Jet e InkJet Multilaser), em 3 delas foi possível observar a fluorescência de uma solução corada com Syber Green ao final da reação de amplificação no interior da microcâmara. Das 3 marcas a que apresentou melhor vedação do dispositivo foi a Multilaser e desta forma essa transparência foi escolhida para os experimentos. Desta forma, procurou-se fazer uma caracterização desta transparência. Primeiramente, determinou-se o espectro de transmitância para confirmar que ela seria capaz de transmitir a maior parte da radiação UV. Ao fazer a varredura do espectro de 200 nm a 800 nm foi observado que 70 % da radiação é transmitida no comprimento de onda de 320 nm (Figura 7), diferentemente do filme CG 5000 que transmite apenas 24% da radiação UV nesse comprimento de onda.

Após estes resultados, embora muitos experimentos já tinham sido realizados nos microchips com a CG 5000, todos eles foram repetidos com a InkJet Multilaser. Sendo assim, todas otimizações apresentadas neste trabalho foram feitas com microchips fabricados com a base e tampa da InkJet Multilaser, mantendo as partes intermediárias da CG 5000 (impressão a laser).

Após confirmar que a transparência para impressão a jato de tinta permitiria a visualização da fluorescência diretamente no microchip possibilitando a detecção visual, realizou-se a LAMP no dispositivo fabricado com essa transparência e ao final da reação a solução foi retirada do microchip e levada para separação dos fragmentos por eletroforese. Na eletroforese em gel de agarose (Figura 8) as amplificações por LAMP

revelaram como padrão uma “escada” de tamanho dos fragmentos amplificados. Isso ocorre pois na LAMP formam múltiplas estruturas que se repetem alternadamente na etapa cíclica (CHIARI, 2010), e assim diversas bandas de diferentes tamanhos são formadas (NOTOMI *et al.*, 2000; YAMADA, *et al.*, 2006).

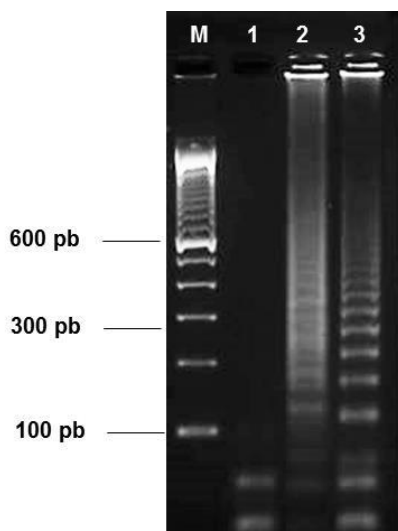


Figura 8. Amplificação do gene *malB* em microdispositivos de PeT utilizando diferentes transparências. M. Marcador; 1. Controle negativo; 2. Controle positivo com transparência CG 5000; 3. Controle positivo com transparência InkJet Film.

A LAMP realizada nos dispositivos fabricados com a InkJet Multilaser (poço 3) apresentou-se mais eficiente que as reações desenvolvidas em microchips fabricados com a CG 5000 (poço 2). Os tamanhos dos fragmentos apresentaram-se mais distintos, mostrando um gel com bandas mais definidas quando comparado com a amplificação realizada nos microchips da CG 5000 (Figura 8). Nos microchips fabricados com a InkJet além dos tamanhos dos fragmentos amplificados apresentaram-se mais definidos, esses se repetiram com bastante fidelidade em todas as reações

realizadas nos microchips. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram caracterizados com precisão pelo Bioanalyser (Figura 9), sendo eles: 106, 152, 200, 248, 314, 343, 387, 434, 527 e 576 pares de base.

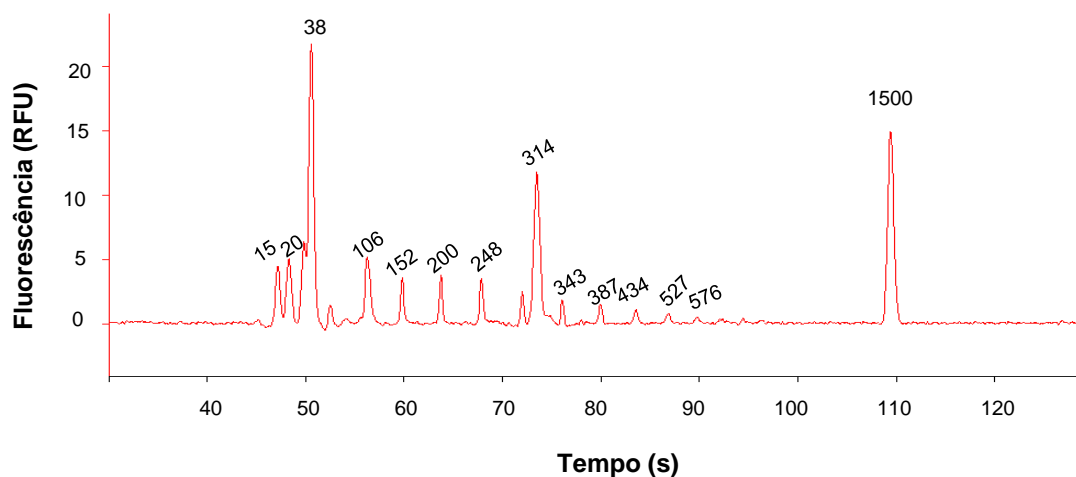


Figura 9. Eletroferograma mostrando o tamanho dos fragmentos (em pares de base, pb) amplificados por LAMP nos microchips de PeT. 15 e 1500 pb são marcadores de tamanho.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos anteriormente procurou-se entender a diferença das superfícies das duas transparências. Para isso, obteve-se imagens de microscopia eletrônica de varredura das duas transparências. Observou-se que as transparências não apresentaram poros, porém a transparência para impressão a jato de tinta, apresenta apenas irregularidades (Figura 10 A), enquanto a transparência CG 5000 apresenta elevada rugosidade (Figura 10 B), Provavelmente a rugosidade na transparência CG 5000 seja responsável pela menor eficiência da reação neste substrato.

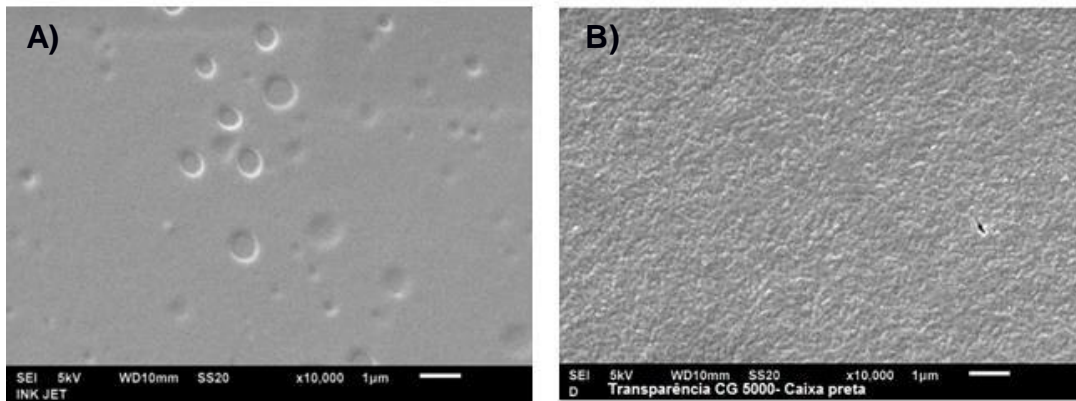


Figura 10. Micrografias evidenciando a diferença entre as superfícies das duas transparências: A) transparência para impressão a jato de tinta (InkJet Multilaser). B) Transparência para impressão a laser (CG 5000).

Análises de espectroscopia dispersiva de energia de raio-X (EDS) foram realizadas para avaliar a diferença na composição das duas transparências (Figura 11). Os espectros mostraram que a única diferença na composição das duas transparências é a presença de cloro, que apareceu apenas na transparência da 3M (CG 5000). A presença do cloro no filme da 3M deve ser devido a tratamentos específicos realizados na superfície do filme para melhoria na qualidade da impressão.

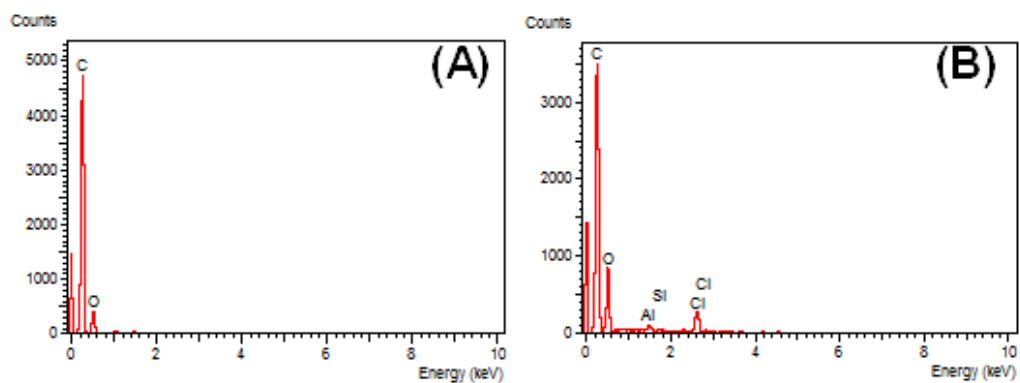


Figura 11. Espectroscopia dispersiva de energia de raio-X (EDS) para análise de filmes de transparência com diferentes marcas (A) Inkjet Multilaser e (B) CG 5000, 3M.

4.2. Otimização da LAMP nos microchips de PeT

A transição da LAMP em escala convencional para o microchip necessita da otimização de alguns parâmetros para o sucesso e melhoria na eficiência da reação a fim de se obter a máxima sensibilidade da reação. Nesse sentido, alguns parâmetros foram otimizados, dentre eles: dois tipos diferentes de enzimas foram investigados, e variações na quantidade de betaína e tempo de reação.

4.2.1. Avaliação de dois diferentes tipos de *Bst* DNA polimerase

O desempenho da reação de amplificação está diretamente ligado ao tipo de DNA polimerase utilizada, sendo assim enzimas com elevada atividade de deslocamento originam maior número de cópias devido ao curto tempo necessário para o deslocamento e síntese da fita alvo (SHUPPHAUG *et al.*, 1993; CONNELLY *et al.*, 2015). Para amplificação de DNA por LAMP em microdispositivos de PeT foram testadas duas enzimas DNA polimerase: a *Bst* e *Bst* 2.0. A diferença dessas enzimas está na potência de deslocamento da fita DNA alvo, uma vez que a *Bst* DNA polimerase 2.0 apresenta maior resistência a inibidores, alto rendimento e níveis elevados na atividade de deslocamento requerendo menor tempo para detecção e amplificação da fita alvo do ácido nucleico (New England Biolabs).

A Figura 12 apresenta os resultados da amplificação do gene *malB* em função do tipo enzima utilizada para deslocamento e síntese da fita de DNA. Pode-se observar na Figura 12 que o tipo de enzima afeta a eficiência da reação. Enquanto as reações com a *Bst* 2.0 apresentam produtos de

amplificações em 100% dos experimentos, a mesma eficiência não foi observada na presença da *Bst* polimerase, demonstrando em 50 % dos experimentos ausência da amplificação.

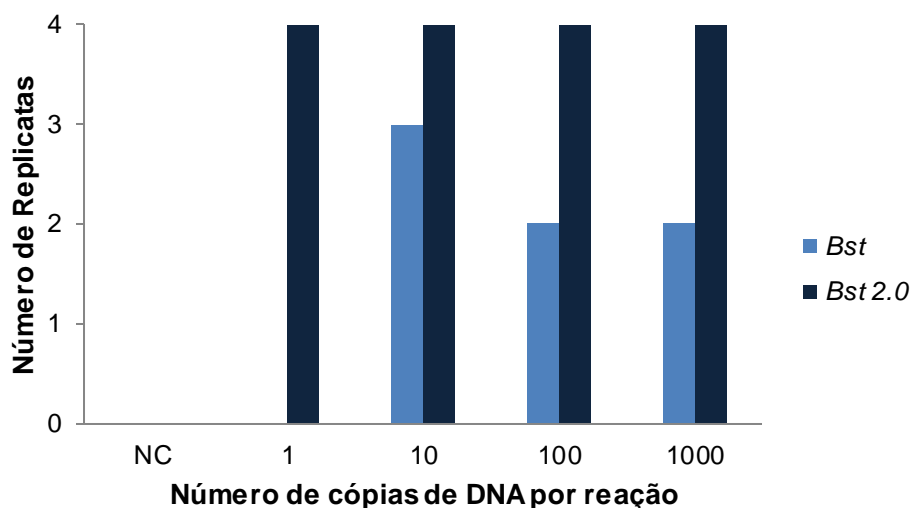


Figura 12. Produtos de amplificações utilizando diferentes enzimas (*Bst* e *Bst 2.0*) em diferentes quantidades de cópias iniciais de DNA. NC) Não contem DNA. As reações foram aquecidas a 66 °C apresentando produtos de amplificações em tempos mínimos de incubação equivalente a 180 min para a *Bst* e 60 min para a *Bst 2.0*.

A eficiência da amplificação quanto ao tempo de reação também foi diferenciada em experimentos realizados com a *Bst 2.0*. Para as reações de amplificação que continham a enzima *Bst* DNA polimerase as cópias dos fragmentos do gene amplificado só foram detectáveis com tempos de incubação superiores a 120 minutos, e somente com concentração final de enzima igual a 0,96 U μL^{-1} . A mistura reacional foi realizada sob as mesmas condições exceto a enzima, na presença da *Bst 2.0* foram observados os produtos de amplificações em 60 minutos de aquecimento, a uma concentração de enzima equivalente a 0,8 U μL^{-1} (Figura 13).

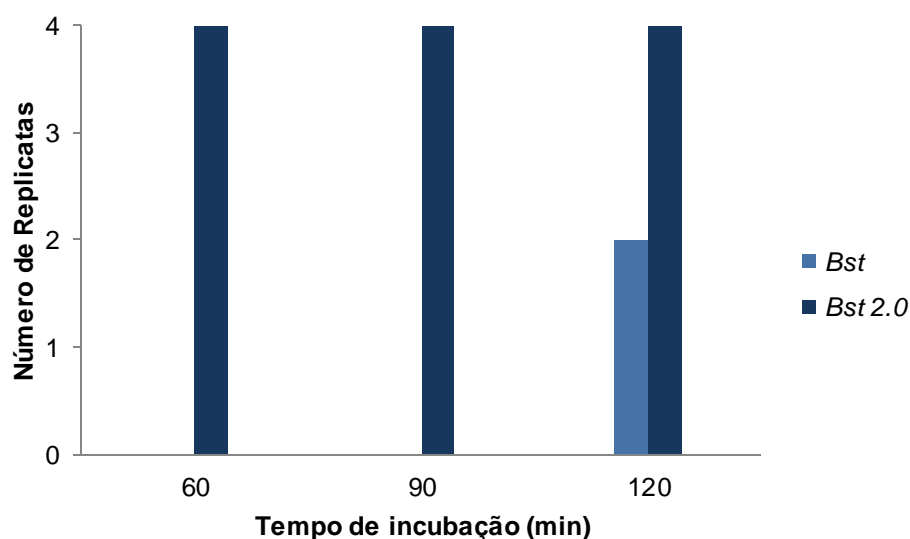


Figura 13. Tempo de detecção dos produtos de ampliações utilizando diferentes enzimas (*Bst* e *Bst 2.0*). Diferentes concentrações das enzimas foram utilizadas, $0,96 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ para a *Bst* ou $0,8 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ a *Bst 2.0*. A mistura reacional foi aquecida a $66 \text{ }^\circ\text{C}$ em diferentes tempos de incubação: 60, 90 e 120 min e posteriormente por separação eletroforética em gel de agarose foram confirmados os produtos de ampliações.

Os resultados obtidos concordam com o trabalho de CONNELLY e colaboradores (2015) por evidenciar que a escolha da DNA polimerase é fundamental para o alto ou baixo rendimento da reação.

4.2.2. Alterações na concentração de Betaína

A betaína é utilizada para evitar a formação de sub-produtos inespecíficos (CHIARI, 2010). Inicialmente, as reações de amplificação foram preparadas com base nas concentrações descritas pela maioria dos trabalhos. Experimentos foram realizados com a finalidade de verificar o perfil da amplificação utilizando as mesmas condições descritas pela maioria dos trabalhos que amplificam DNA por LAMP (0,8 M de betaína). CONELLY e colaboradores (2015) em seu trabalho de amplificação do gene *malB* em

papel observaram casos de falsos positivos em concentrações inferiores a 0,9 M de betaína. A melhor relação encontrada em nossos experimentos, foram com concentrações de betaína entre 0,8 e 1 M. Concentrações superiores reduziram a eficiência da amplificação, inibindo a formação de produtos específicos de amplificação.

A Figura 14 mostra a resposta da amplificação em diferentes concentrações de betaína. As reações que partiram de 100 ou mais cópias de DNA apresentaram o mesmo perfil de amplificação nas três concentrações de betaína estudadas, porém para as reações que partiram de um número de cópias de DNA inferiores a 100, algumas reações foram inibidas a concentrações de 1,2 M. As reações contendo 0,8 e 1,0 M apresentaram comportamento semelhante. Vale ressaltar que embora o comportamento das reações tenham sido similares com 0,8 e 1,0 M de betaína, os fragmentos amplificados nas reações com 0,8 M de betaína apresentaram mais intensos do que nas reações que utilizaram 1,0 M (Figura 14 B).

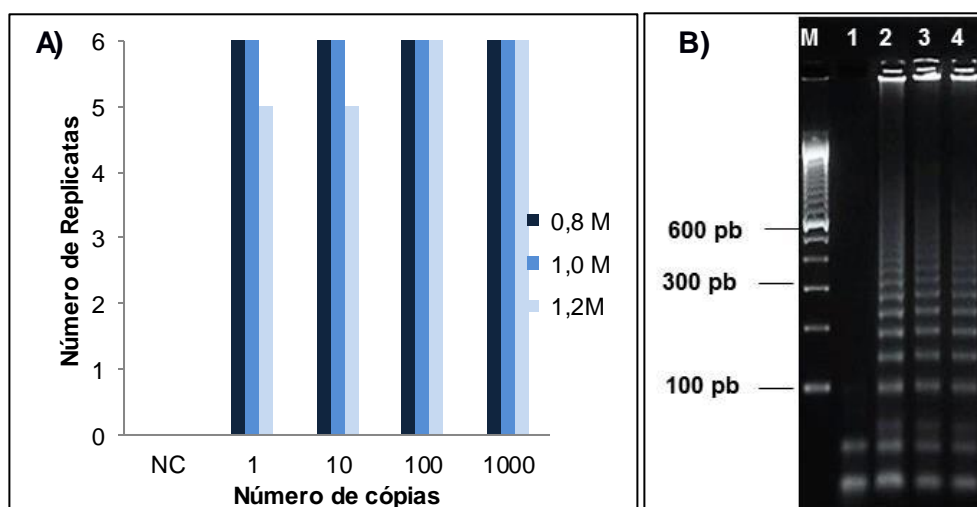


Figura 14. A) Confirmação dos produtos de amplificações com diferentes quantidades iniciais de DNA modificando a concentração da betaína na mistura

reacional. B) Gel de agarose 2% mostrando a variação da intensidade dos produtos de amplificações ao alterar a concentração de betaína (concentração final de DNA igual a $1 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. Amostras: 1) controle negativo; 2) 0,8 M; 3) 1 M e 4) 1,2 M de betaína.

4.2.3. Tempo de reação

Diferentemente da PCR que produz um grande número de cópias em tempos que variam de 2-4h, utilizando a LAMP a detecção dos produtos de amplificação podem ser visualizadas em tempos que variam de 15 a 60 minutos (HATAOKA *et al.*, 2004; WOZNIAKOWSKI *et al.*, 2012) podendo chegar a uma duração de até 120 minutos (ENDO *et al.*, 2004; TATIBANA *et al.*, 2009).

Para avaliar o desempenho da amplificação de acordo com o tempo, foram alterados os tempo de reação da LAMP para o gene *malB* da *E.coli* em diferentes quantidades de DNA por reação. O tempo mínimo para a detecção do alvo nos microchips de PeT foi de 60 minutos, não sendo observado produtos de amplificação detectáveis em gel de agarose em tempo inferiores (30, 40 e 50 minutos). Os produtos de amplificação começaram a apresentar uma pequena intensidade das bandas no gel de agarose em reações que ocorreram em 50 minutos, porém não o suficiente para detecção visual (dados não apresentados).

De forma semelhante, os controles negativos foram monitorados em função do tempo. Por meio desse teste foi observada a presença de falsos positivos em reações que foram realizadas por 90 minutos, como pode ser visualizado na Figura 15. Apenas 30 minutos a mais de incubação foi o suficiente para formação de produtos inespecíficos. Os resultados obtidos

no presente estudo concordam com os de CONNELLY *et al* (2015), que só obtiveram produtos de amplificação em controles negativos (falsos-positivos) em tempos superiores a 60 minutos de aquecimento.

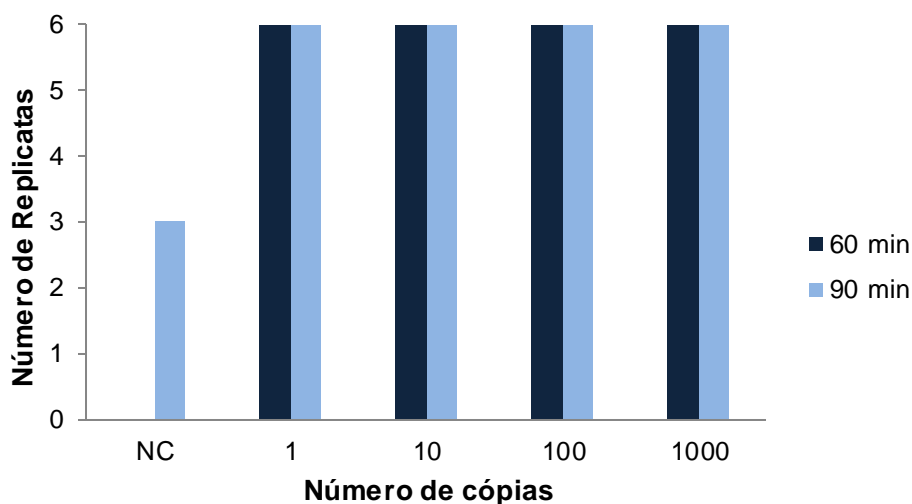


Figura 15. Amplificação do gene *malB* em diferentes tempos de incubação variando o número de cópias iniciais.

4.2.4. Detecção do gene *malB* da *E.coli* em microdispositivos de PeT

De modo a explorar o potencial da amplificação isotérmica de DNA nos microdispositivos de PeT, testes variando a quantidade de DNA por reação foram realizados. As reações foram realizadas a partir de quantidades iniciais de DNA que variaram de 10^6 - 0,1 cópias de DNA por reação. Foi possível detectar *amplicons* no gel de agarose em reações que partiram de até 1 cópia de DNA, como pode ser observado na Figura 16, o que representa uma concentração de DNA de $1 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA na mistura reacional.

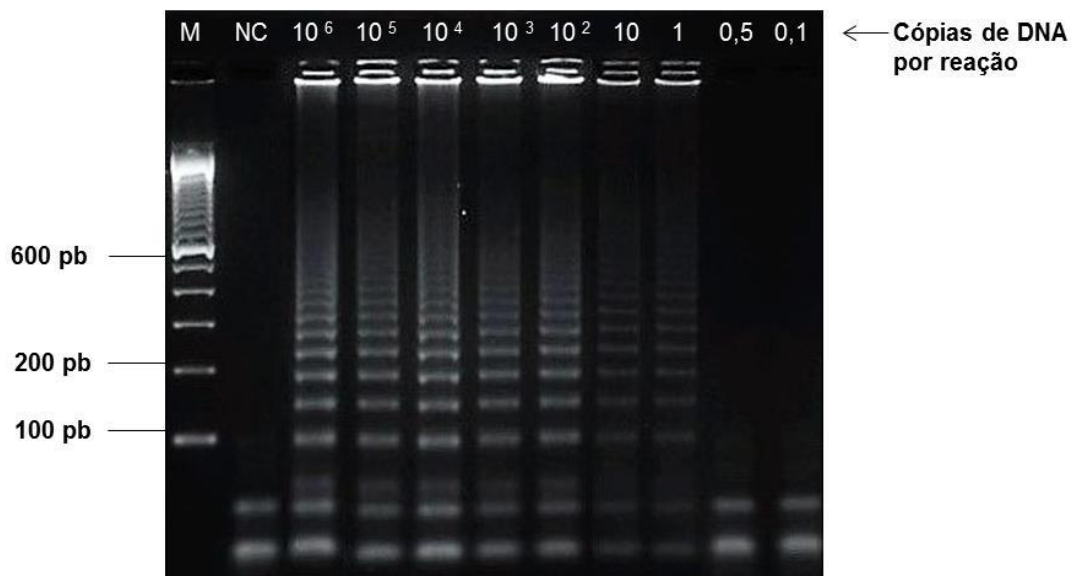


Figura 16. Gel de agarose a 2% corado com GelRed, apresentando os produtos de amplificações da bactéria *E.coli* em microchip de PeT com diferentes quantidades de DNA variando de 10^6 - 0,1 cópias. Amostras: M) Marcador 1 kb Invitrogen; NC) controle negativo.

Mesmo para pequenas quantidades de DNA como 1 cópia por reação, a LAMP nos microdispositivos de PeT apresentou alto grau de repetitividade (de 6 reações positivas as 6 amplificaram), como mostrado na Figura 17. Apenas para quantidades menores do que o referente a 1 cópia ($1 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$) a reação não apresentou repetitividade ou não amplificou.

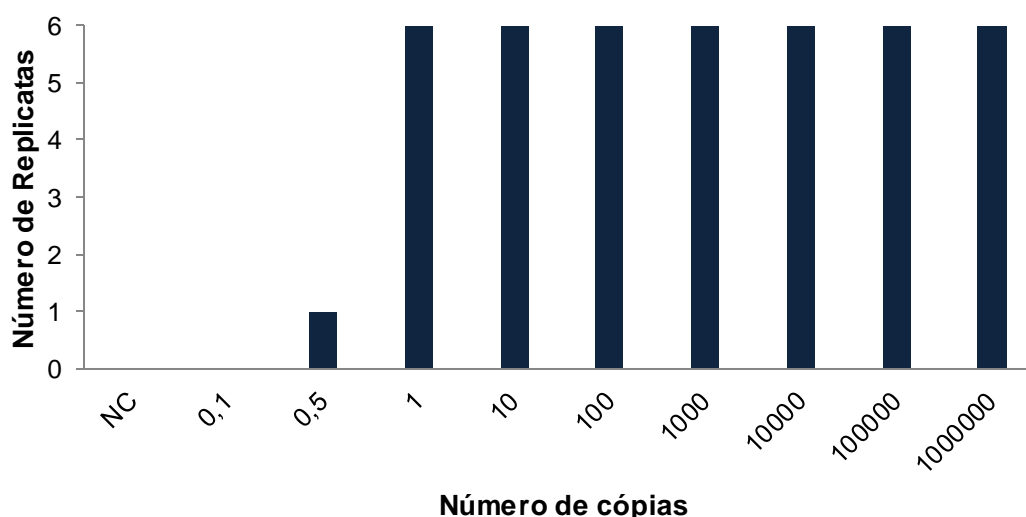


Figura 17. Limite de detecção em microdispositivos de PeT partindo de diferentes quantidades de cópias iniciais de DNA inseridas na mistura reacional.

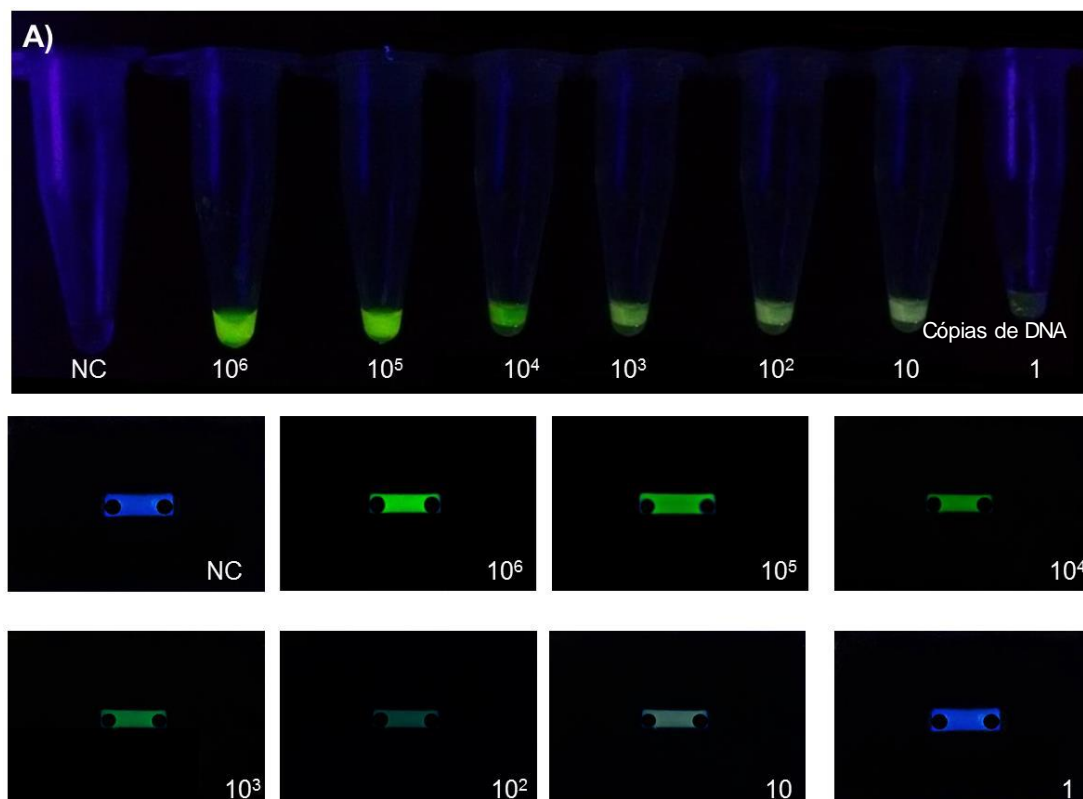
Luo e colaboradores (2014) realizaram a LAMP em dispositivos de PDMS para três bactérias: *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), *Haemophilus influenza* (HIN) e *Klebsiella pneumonia* (KPN) e encontraram um limite de detecção de 28, 17 e 16 cópias μL^{-1} respectivamente.

4.2.5. Detecção visual

A detecção visual mediante a visualização da fluorescência da solução foi realizada logo após o final da reação após adicionar o corante intercalador de DNA e incidir sobre a microcâmara radiação UV.

A detecção visual foi realizada utilizando dois diferentes intercaladores de DNA: Syber green (Figura 18A) e Iodeto de propídeo (Figura 18B). As reações positivas utilizando o Syber green apresentam fluorescência verde e as reações positivas utilizando o Iodeto de propídeo apresenta fluorescência rosa, os controles negativos não apresentaram

fluorescência. Os controles positivos exibiram diferentes intensidades de fluorescência variando de acordo com o número de cópias iniciais, como pode ser observada na Figura 18. Esses resultados coincidem com a intensidade dos fragmentos de DNA amplificados, mostrados por separação eletroforética em gel de agarose (Figura 16).



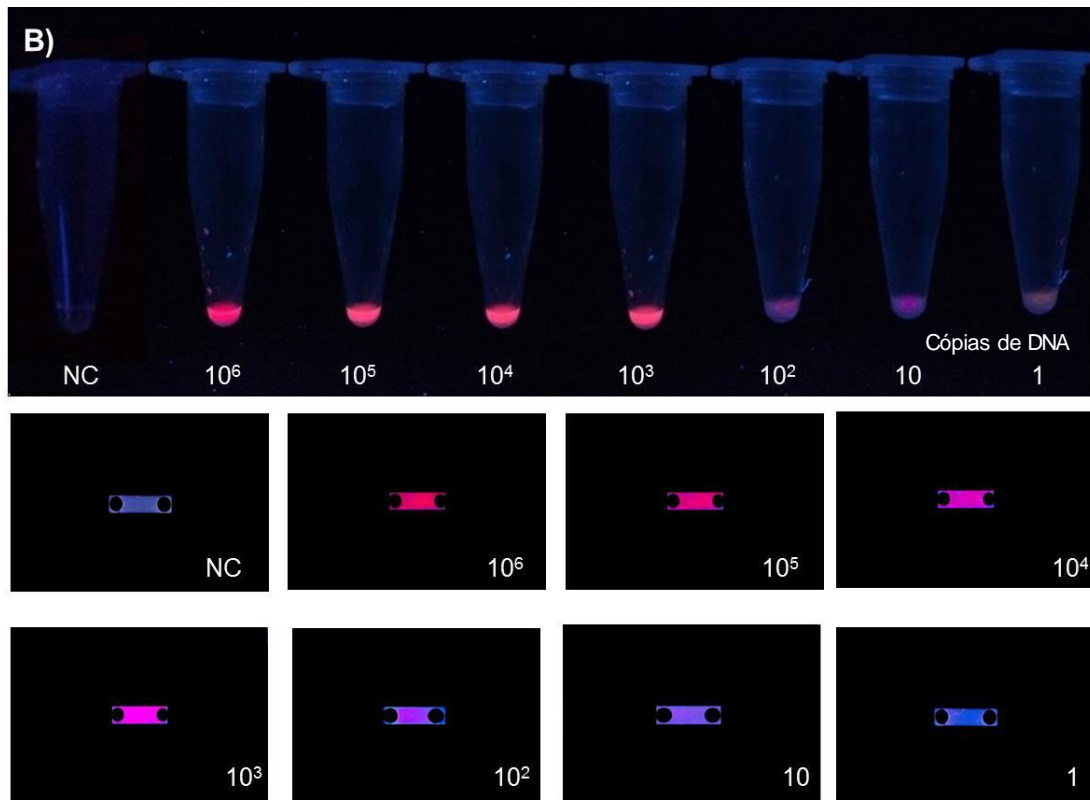


Figura 18. Detecção visual dos produtos de amplificações do gene *malB* via LAMP quando em diferentes quantidades de cópias iniciais do alvo (10^6 -1 cópia de DNA). Coloração visualizada devido a adição de dois diferentes intercaladores de DNA seguida da exposição da câmara reacional a uma luz UV. A) Syber green. B) Iodeto de propídeo.

Enquanto a detecção em gel de agarose permitiu a detecção dos *amplicons* partindo de reações com apenas 1 cópia de DNA, a detecção visual diretamente no chip foi nítida para reações a partir de 10 cópias iniciais de DNA. Para reações que iniciaram com 1 cópia de DNA a detecção visual pode gerar dúvidas em relação a positividade da reação, para os dois intercaladores utilizados. Para o Syber green e Iodeto de propídeo quando a solução foi retirada do microchip (detecção *off-chip*) e colocada em microtubos para avaliação da fluorescência produzida pela solução, a detecção visual foi nítida a partir de 10 cópias iniciais de DNA.

As imagens também foram avaliadas utilizando o programa Image J. Os valores de intensidade da cor verde foram realizados utilizando os canais de cores RGB (red,green,blue). Observou-se um comportamento linear da intensidade da fluorescência em relação ao número de cópias iniciais de DNA, como pode ser visualizado na Figura 19. Através dessa análise pode-se ressaltar que as reações contendo números de cópias iguais ou inferiores a 10 apresentaram valores similares às reações negativas (55 U.A) indicando que nessas quantidades iniciais de cópias de DNA a detecção visual direta pode afetar na determinação da positividade ou não da reação.

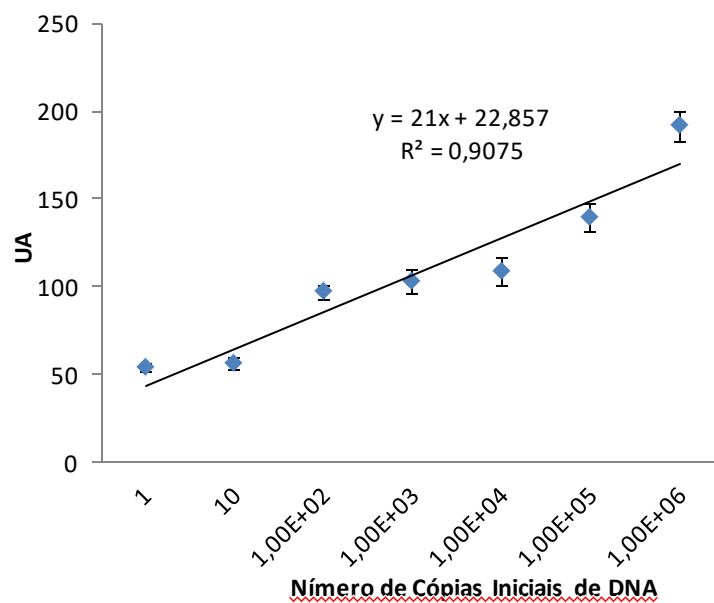


Figura 19. Determinação da curva analítica utilizando o tratamento das imagens pelo programa Image J. avaliando a intensidade da coloração presente em cada microcâmara reacional do dispositivo de PeT quando em diferentes quantidades iniciais de cópias de DNA.

Uddin e colaboradores (2015) realizaram a detecção visual da LAMP para detecção de *Salmonella* utilizando Syber green. A amplificação e detecção foi realizada em um “lab-on-a-cd” e conseguiram visualizar a

fluorescência verde da solução para as reações que utilizaram a partir de 2,5 pg μL^{-1} de DNA.

A detecção visual da LAMP nos microdispositivos de PeT foram bem-sucedidas a partir de 10 fg μL^{-1} de DNA (10 cópias por reação). Essa é a concentração de DNA em média que PCR consegue detectar, ou seja, mesmo que a detecção visual seja menos sensível do que a detecção por eletroforese em gel ainda é comparável com as quantidades de DNA que a PCR consegue detectar. Sendo assim, a detecção visual demonstrou ser uma excelente alternativa à eletroforese em gel proporcionando grande economia de tempo e reagentes, facilitando ainda mais a adaptação da metodologia para aplicações no *point-of-care*.

4.2.6. Filmes transparentes como alternativas para fabricar microchips para LAMP

Outros filmes transparentes também podem ser utilizados para fabricar dispositivos para LAMP, porém para que seja possível realizar a detecção visual diretamente no microchip o filme deve ser transparente a radiação UV, como foi mostrado para o filme InkJet. Um exemplo de um material que pode ser utilizado para fabricar dispositivos para LAMP são os filmes de polipropileno (PP), que são transparentes a radiação UV e podem permitir a detecção visual da reação, como mostrado na Figura 20. Os filmes de polipropileno são vendidos comercialmente e são utilizados para embalagem de produtos entre outras aplicações. O dispositivo mostrado na Figura 20 foi fabricado com filme de PP fabricado pela Cepalgo, empresa residente em Aparecida de Goiânia.

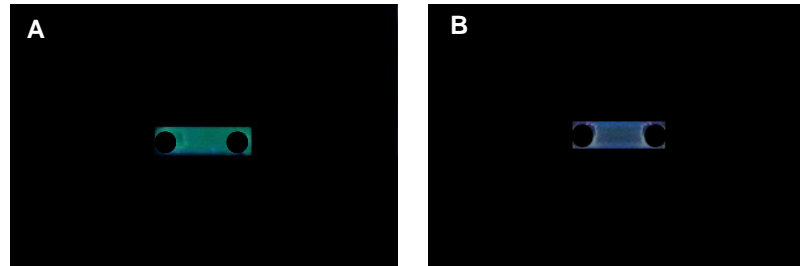


Figura 20. Detecção visual dos produtos de ampliações mediante a inserção de do intercalador Syber green na câmara reacional expostos a uma iluminação UV. O microdispositivo foi fabricado com diferentes substratos, contendo nas partes intermediárias o PeT e no topo e base substrato de PP. A) Controle Positivo; B) Controle Negativo.

4.2.7. Comparação do perfil de amplificação por LAMP no microchip de PeT com a LAMP realizada por outros trabalhos em outras plataformas

Outros trabalhos encontrados na literatura realizaram a amplificação do gene *malB* por LAMP tanto em escala convencional (em microtubos) (HILL *et al.*, 2008) quanto em microescala, utilizando plataformas com diferentes substratos como PMDS (LIU *et al.*, 2011) e papel (CONNELLY *et al.*, 2015). Em todos os artigos citados acima foram utilizadas as mesmas sequências dos iniciadores utilizados neste trabalho, que foram baseados no artigo de HILL e colaboradores (2008). A Figura 21 apresenta a comparação dos perfis da amplificação do gene *malB* por LAMP em diferentes plataformas.com o perfil de amplificação apresentado pelos microchips de PeT.

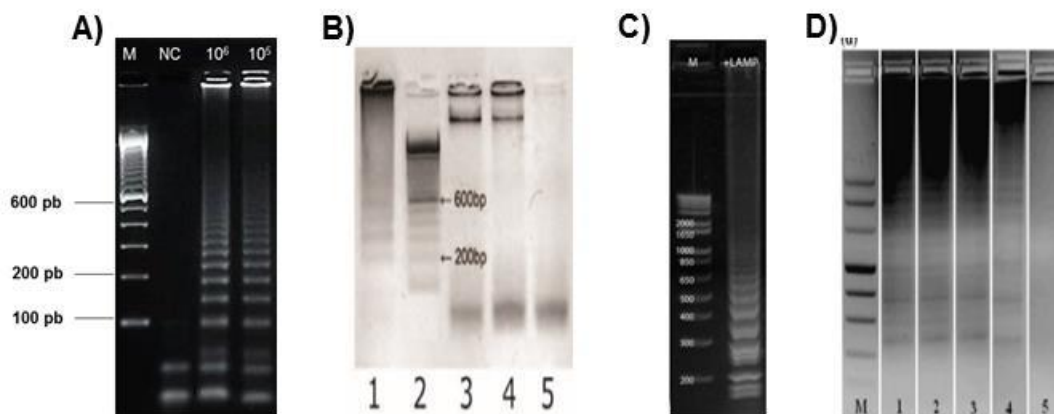


Figura 21. Comparação dos perfis de amplificação do gene *malB* em diferentes plataformas: a) PeT; B) Micro tubo(HILL *et al.*, 2007); C) Papel (CONNELLY *et al.*, 2015); D) PDMS (LIU *et al.*, 2011). Os poços de cada plataforma são classificados em: Plataforma A: M) marcador, NC) não contém DNA, 10^6 e 10^5 quantidades iniciais de DNA; Plataforma B: 1) controle positivo, 2) marcador, 3-5) controles negativos; Plataforma C: M) marcador, 1) controle positivo ; Plataforma D: M) marcador, 1-5 diferentes quantidades iniciais de DNA, correspondendo respectivamente a 250, 100, 25, 10 e 0.

A Figura 21 mostra que as diferentes plataformas foram eficientes para a amplificação do gene *malB* por LAMP. Porém, os fragmentos amplificados nos microchips de PeT (Figura 21A) apresentaram-se em tamanhos mais distintos e característicos, o que facilita a identificação do tamanho dos fragmentos amplificados. Além do perfil de amplificação, as diferentes plataformas apresentaram limites de detecção distintos. Os microdispositivos de PMDS apresentaram os mesmos valores quando comparado ao microtubo (limite de detecção com quantidade inicial de DNA superior a 10 cópias). A LAMP realizada no papel, apresentou-se mais sensível, amplificando quantidades de DNA superiores a 1 cópia inicial (CONNELLY *et al.*, 2015), mesmo valor obtido neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

A simplicidade de uma metodologia isotérmica de amplificação de DNA associada as vantagens da miniaturização proporcionou neste trabalho o desenvolvimento de uma metodologia rápida e de baixo custo para a detecção de *E.coli*, sem sacrificar a sensibilidade e a especificidade características às análises genéticas.

A LAMP realizada pela primeira vez nos microdispositivos de PeT demonstrou ser uma técnica muito sensível nesta plataforma, produzindo quantidades de *amplicons* detectáveis em gel de agarose em reações que partiram de $1 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA, o que representa 1 cópia de DNA por reação. A passivação prévia da superfície da microcâmara com BSA demonstrou ser adequada para evitar a adsorção indesejada da enzima e outros reagentes envolvidos no processo de amplificação. A microcâmara com capacidade para $5 \mu\text{L}$ de solução foi projetada de modo a otimizar a razão área/volume ($6 \text{ mm}^2 \mu\text{L}^{-1}$).

O processo de detecção visual diretamente no microchip foi satisfatório em transparências para impressão a jato de tinta, que demonstrou possuir alta transmitância da radiação UV. A adição de um agente intercalador de DNA diretamente na câmara reacional do microdispositivo também demonstrou ser uma excelente alternativa para a redução do tempo de detecção (2 minutos), sendo identificados produtos de amplificações a partir de 10 cópias de DNA ($10 \text{ fg } \mu\text{L}^{-1}$ de DNA).

O tempo da reação de amplificação nos microchips de PeT foi de 60 minutos e a detecção visual mais 2 minutos, totalizando o tempo total de 62

minutos para obtenção do resultado final. Em contrapartida se a mesma análise fosse realizada em escala convencional por PCR e detecção em gel de agarose levaria no mínimo 160 minutos para obtenção do resultado final.

A LAMP demonstrou ter grande potencial para substituir a PCR em sistemas miniaturizados, principalmente por dispensar o uso de instrumentação sofisticada para aquecimento. O aquecimento isotérmico utilizado pela LAMP pode ser facilmente projetado para ser simples e de baixo consumo de energia facilitando o seu uso em sistemas de detecção de portáteis, que poderão ser utilizados tanto para diagnósticos quanto para estudos epidemiológicos. Nesse sentido, o desenvolvimento da LAMP aliado aos dispositivos descartáveis de PeT apresentam alto potencial para análises genéticas completas no *point-of-care*, uma vez que a detecção e amplificação pode ser feita diretamente no microdispositivo.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, V. S.; PAGILARES, V. A.; QUEIROZ, M.L.P.; ALMEIDA, A. C. F. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheeses commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, n.6, p. 1172-1177, 2002.

BAKHEIT, M. A., TORRA, D., PALOMINO, L.A.; THEKISOE, O.M.; MBATI, P.A.; ONGERTH, J.; KARANIS, P. Sensitive and specific detection of Cryptosporidium species in PCR-negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. **Veterinary Parasitology**. Vol 158, ed. 1-2, p. 11-22, 2008.

BIENVENUE, J. M.; DUNCALF, N.; MARCHIARULLO, D.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. Microchip-based cell lysis and DNA extraction from sperm cells for application to forensic analysis. **Journal of Forensic Sciences**, vol. 51, n. 2, p. 266- 273, 2006.

BHIMANI, M.P; BHANDERI, B.B.; ROY, A. Loop-mediated Isothermal Amplification assay (LAMP) based detection of Pasteurella multocida in cases of haemorrhagic septicaemia and fowl cholera. *Veterinaria Italiana*. p. 115-121. 2015

BREADMORE, M. C.; WOLFE, K. A.; ARCIBAL, I. G.; LEUNG, W. K.; DICKSON, D.; GIORDANO, B. C.; POWER, M. E.; FERRANCE, J. P.; FELDMAN, S. H.; NORRIS, P. M.; LANDERS, J. P. Microchip-Based Purification of DNA from Biological Samples. **Analytical Chemistry**, vol. 75, n. 8, p. 1880-1886, 2003.

CAMARGO, P.C; MUNOZ, Y.G. Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. Vol 31, n. 3, p. 535-546, 2014.

CHEN, Y. H.; WANG, W. C.; YOUNG, K. C.; CHANG, T. T.; CHEN, S. H. Plastic Microchip Electrophoresis for Analysis of PCR Products of Hepatitis C Virus. **Clinical Chemistry**, vol. 45, p. 1938-1943, 1999.

CHEN, Z.Y; LIAO Y.X.; KE, X.M.; ZHOU, J.; CHEN, Y.X; GAO, L.L.; CHEN, Q.; YU, S.Y. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, conventional PCR and real-time PCR assays for Japanese encephalitis virus. **Molecular Biology Reports**. Vol. 38, n. 6, p. 4063-4070, 2011.

CHIARI, M.F. Nova Metodologia de diagnóstico para Ehrlichia Canis: PCRXLAMP. (Dissertação de mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

COLTRO, W.K.T. Fabricação e avaliação de microdispositivos para eletroforese com detecção eletroquímica. (Dissertação de mestrado em Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

CONSTANTINIU, S.; BUZDUGAN, I.; ROMANIUC, A.; COZMA, L.; FILIMON, R.; DUMBRAVA, M.; NISTOR, A.; TEODORU, L.; ONU, P.; DANIS, G. Serotypes of *Escherichia coli* enteroinvasive in northeastern districts of Romania. **The Journal of Preventive Medicine**, v.9, n.3, p.67-73, 2001.

CONNELLY, J.T.; ROLLAND, J.P.; WHITESIDES, G.M. "Paper Machine" for molecular diagnostics. **Analytical chemistry**, vol 87, p. 7595-7601, 2015.

DELARUE, S.M.; VRAY,M.; PLANTIER,J.C.; MAILLARD,T.; ADJOUT,Z.; OLIVERA,F.de; SCHNEPF,N.; MAYLIN,S.; SIMON,F.; DELAUGERRE,C. Higher Specificity of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Isothermal Technology than of Real-Time PCR for Quantification of HIV-1 RNA on Dried Blood Spots. **Journal of clinical Microbiology**. Vol 52, n. 1, p. 52-56, 2014.

DO LAGO, C. L.; SILVA, H. D. T.; NEVES, C. A.; BRITO-NETO, J. G. A.; SILVA, J. A. F. A dry process for production devices based on the lamination of laser-printed polyester films. **Analytical Chemistry**, vol. 75, n. 15, p. 3853-3858, 2003.

DRAME,P.M.; FINK,D.L.; KAMGNO,J.; HERRICK, J.A.H.; NUTMAN,T.B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid and Semiquantitative Detection of *Loa loa* Infection. **Journal of clinical Microbiology**. Vol. 52. n 6. p 2071-2077, 2014.

DRAPALA,D. e KORDALEWSKA,M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool in detection of infectious diseases. **PhD Interdisciplinary Journal**. p. 19-23, 2013.

DUAN, Y-B; GE, C.Y.; ZHANG, X.K.; WANG, J-X; ZHOU, M-G. Development and Evaluation of a Novel and Rapid Detection Assay for *Botrytis cinerea* Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification. **PLoS ONE** 9(10): e111094. doi:10.1371/journal.pone.0111094. 2014

DUARTE, G.R.M.; PRICE, C. W.; AUGUSTINE,B.H.; CARRILHO,E.; LANDERS, J.P. Dynamic solid phase DNA extraction and PCR amplification in polyester-toner based microchip. **Analytical Chemistry**. 34, p. 2169-2176, 2011.

DUARTE, R.M.D; COLTRO, W.K.T; BORBA, J.C.; PRICE, C.W.; LANDERS, J. P.; CARRILHO, E. Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. **Analytical Chemistry**, vol 137, p. 2692-2698, 2012.

DUFFY, D. C.; MCDONALD, J. C.; SCHUELLER, O. J. A.; WHITESIDES, G. M. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, vol. 70, n. 23, p. 4974-4984, 1998.

DUNITZ, M.I; COIL, D.A.; JOSPIN, G.; EISEN, J.A.; ADAMS, J.Y. Draft Genome Sequences *Escherichia coli* Strains Isolated from Septic Patients. *Genome Announc.* 2(6): e01278-14. doi:10.1128/genomeA.01278-14, 2014.

EASLEY, C. J.; KARLINSEY, J. M.; BIENVENUE, J. M.; LEGENDERE, L. A.; ROPER, M. G.; FELDMAN, S. H.; HUGHES M. A.; HEWLETT, E. L.; MERKEL, T. J.; FERRANCE, J. P.; LANDERS, J. P. A fully integrated microfluidic genetic analysis system with sample-in-answer-out capability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol.19, n. 19, p. 19272-10277, 2006.

EFTEDAL, I.; GUDDAI, P.H.; SLUPPHAUG, G.; VOLDEN, G.; KROKAN, H.E. Consensus sequences for good and poor removal of uracil from double stranded DNA by uracil-DNA glycosylase. **Nucleic Acids Res.** Vol 11, n. 9, p. 2095-2101, 1993.

ENDO, S.; KOMORI T.; RICCI, G.; SANO, A.; YOKOYAMA, K.; OHORI, A.; KAMEI, K.; FRANCO, M.; MIYAJI, M. NISHIMURA, K. Detection of *gp43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *FEMES microbiology letters*, p. 93-97, 2004.

ENOMOTO, Y. YSHIKAWA, T.; IHIRA, M.; *et al.* Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J Clin Microbiol.* 43(2). p. 951-955. 2005

FANG, X.; LIU, Y.; KONG, J.; JIANG, X. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chip for point-of-care quantitative detection of pathogens. *Analytical Chemistry*. vol 82, p. 3002-3006, 2010.

FODE-VAUGHAN, K.A; MAKI J.S.; BENSON, J.A.; COLLINS, M.L.P. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, v. 37, p. 239-243, 2003.

GABRIEL, E.F.M. Avaliação do desempenho analítico de microssistemas eletroforéticos fabricados em poliéster-toner (Dissertação de mestrado em química). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

GABRIEL, E.F.M; LAGO, C. L.; GOBBI, A. L.; CARRILHO, E.; COLTRO, W. K. T. Characterization of microchip electrophoresis devices fabricated by direct-printing process with colored toner. **Electrophoresis**, vol. 34, p. 2169-2176, 2013.

GIORDANO, B. C.; FERRANCE, J. P.; SWEDBERG, S.; HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Polymerase chain reaction in polymeric microchips: DNA amplification in less than 240 seconds. **Analytical Biochemistry**, vol. 291, n. 1, p. 124-132, 2001.

GUATELLI, J.C; WHITFIELD, K.M.; KWOH,D.Y.; BARRINGER, K.J.; RICHMAN, D.D.; GINGERAS, T. R. Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by multienzyme reaction modeled after retroviral replication. **Biochemistry**. Vol. 87, p. 1874-1878, 1990.

HAGAN, K. A.; REEDY, C. R.. UCHIMOTO, M. L.; BASU D.; ENGEL, D. A; LANDERS J. P. An integrated, valveless system for microfluidic purification and reverse transcription-PCR amplification of RNA for detection of infectious agents. **Lab on a Chip**, vol. 11, p. 957-961, 2011.

HATAOKA, Y.; ZHANG, L.; MORI,Y.; TOMITA,N.; NOTOMI,T.; BABA,Y. Analysis of Specific Gene by Integration of Isothermal Amplification and Electrophoresis on Poly(methyl methacrylate) Microchips. **Analytical Chemistry**. Vol 76, p. 3689-3693, 2004.

HILL, J., BERIWAL S., et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Common Strains of *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 46, N.8, p. 2800-2804,2008.

HUANG, M-M.; ARNHEIM,N.; GOODMAN, M.,F.; Extension of base mispairs by *Taq* DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR. *Nucleic Acids Research*, vol. 20, n. 17, p. 4567-4573, 1992.

HSIEH, K.; MAGE, P.L.; CSORDAS, A.T.; EISENSTEIN, M.; SOH, H.T.; Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical Communications*, p. 3747-3749, 2014.

HÜHMER, A.; LANDERS, J. P. Noncontact infrared-mediated thermocycling for effective polymerase chain reaction amplification of DNA in nanoliter volumes. **Analytical Chemistry**, vol. 72, n. 21, p. 5507-5512, 2000.

KHAN,G; KANGRO,H.O; HEATH,RB. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. **Journal of Clinical Pathology**, p. 360-365,1991

KANG, H.Y.; JEONG, Y.S.; OH, J.Y.; TAE, S.H.; CHOI, C.H.; MOON, D.C.; LEE, W.K.; LEE, Y.C.; SEOLI, S.Y.; CHO, D.T.; LEE,J.C. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli*

isolates from humans and animals in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.55. p 639-644, 2005.

KIL E.J.; KIM S.; LEE Y.J.; KANG, E.H; LEE, M.; CHO, S.H.; KIM, M.K; LEE K.Y.; HEO, N.Y.; CHOI, H.S.; KWON, S.T.;LEE S. Advanced loop-mediated isothermal amplification method for sensitive and specific detection of Tomato chlorosis virus using a uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination. *J Virol Methods*. **vol 213, p. 68-74, 2015.**

KUMAR,S.; MONDAL, K.K. Visual detection of *Escherichia coli* contamination in milk and fruit juice using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Food Science and Technology*, vol 52, n. 11, p. 7417-7424, 2015.

LEE,S.Y; LEE,C.N.,MARK, H. Efficient, specific, compact hepatitis B diagnostic device: Optical detection of the hepatitis B virus by isothermal amplification. *Sensors and Actuators*, p. 598- 605, 2007.

LEE, S-Y; HUANG, J-G; CHUANG, T-L; SHEU, J-C; CHUANG Y-K; HOLL, M.; MELDRUM, D.R.; LEE, C-N; LIN, C-W. Compact optical diagnostic device for isothermal nucleic acids amplification. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier. 133. p. 483-501. 2008.

LIU,C.; MAUK, M.G.; BAU, H.H. A disposable, integrated loop mediated isothermal amplification cassette with thermally actuated valves. *Microfluid Nanofluid*. 11:209-220. 2011.

LIU, D; LIANG, G.; ZHANG, Q.; CHEN, B. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* using a capillary-array microsystem with integrated DNA extraction, loop-mediated isothermal amplification, and fluorescence detection. *Analytical Chemistry*. Vol 85, n.9, p. 4698-4704, 2013.

LLOYD, A. *et al*. Accuracy of loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection: a systematic review. Elsevier. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. p. 4-10. 2015

LIZARDI, P. M.; HUANG, X.; ZHU, Z.; BRAY-WARD, P.; THOMAS, D. C.; WARD, D. C. Mutation Detection and Single-Molecule Counting Using Isothermal Rolling-Circle Amplification. *Nat. Genet*. vol 19, 225–232, 1998.

LONGO, M.C.; BERNINGER, M.S.; HARTLEY, J.L. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. **Gene**. Vol 93, p. 125-128, 1990.

LUO,J.; FANG, X.; YE, D.; LI,H.; CHEN, H.; ZHANG, S.; KONG, J. A real-time microfluidic multiplex electrochemical loop-mediated isothermal amplification chip for differentiating bacteria. **Biosensors and Bioelectronics** vol 60, p. 84-91, 2014.

MELO, F. M. Desenvolvimento de métodos moleculares baseados em PCR para a detecção de *Schistosoma mansoni*. (Tese de doutorado em Saúde pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2006.

MADEJ, R.M; DAVIS, J.; HOLDEN, M.J.; KWANG,S.; LABOURIER, E.; SCHNEIDER,G.J. International Standards and Reference Materials for Quantitative Molecular Infectious Disease Testing. **The Journal of Molecular Diagnostics**, vol. 12, n. 2, p. 133-143, 2010.

MAO, Z.; QIU, Y.; ZHENG, L.; CHEN, J.; YANG, J. Development of visual loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of the bacterial pathogen *Pseudomonas putida* of the large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). **Journal of Microbiological Methods**. Vol. 89, p. 179-184, 2012.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infections Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.

MORI, Y.; NAGAMINE, K.; TOMITA, N.; NOTOMI, T. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Vol. 289, p. 150-154, 2001.

MYERS, F. B.; HENRIKSON, R. H.; BONE, J.; LEE, L. P. A Handheld Point-of-Care Genomic Diagnostic System. **Plos one**, vol.8, p. e70266, 2013.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORNA, G.; ERLICH, H. Genetic diagnosis - development of new methodologies: specific enzymatic amplification of DNA In vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, v. 51, p. 263-273, 1986

NAGAMINE, K.; HASE, T.; NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. Vol 16. p. 223-229, 2002.

NAKAMURA, N.; ITO,K.; TAKAHASHI, M.; HASHIMOTO,K.; KAWAMOTO, M.; YAMANAKA,M.; TANIGUCHI,A.; KAMATANI, N.; GEMMA, N. Detection of six single-nucleotide polymorphisms associated with rheumatoid by a loop-mediated isothermal amplification method and an electrochemical DNA chip. **Analytical Chemistry**. Vol 79, p. 9484-9493,2007.

NOTOMI,T.;OKAMA,H.;MASUBUCHI,H.;YONEKAWA,T;WATANABLE,K.;A MINO,N.;HASE,T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Res.**, vol 28, n. 12, e63, 2000.

OLIVEIRA, K. A.; RODRIGUES DE OLIVEIRA, C.; ANTONELLI DA SILVEIRA, L.; COLTRO, W. K. T. Laser-printing of toner-based 96-microzone plates for immunoassays. **Analyst**, v. 138, p. 1114-1121, 2013.

OUYANG, Y.; DUARTE, G.R.M.; POE, B.L.; RIEHL, P.S.; SANTOS, F.M.DOS; MARTIN-DIDONET, C.C.G.; CARRILHO, E.; LANDERS, J.P. A disposable laser print-cut-laminate polyester microchip for multiplexed PCR via infra-red-mediated thermal control. **Analytica Chimica Acta**. Vol. 901. p. 59-67. 2015.

PAUL, N.; YEE, J.; PCR incorporation of modified dNTPs: the substrate properties of biotinylated dNTPs. **BioTechniques**, Vol. 48, n. 4, p. 333–334, 2010.

PARIDA, M.; HORIOKE,K.; ISHIDA,H.; *et al.*Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 43. N.6. p.2895–2903.2005

PARIDA, M.M.; SANTHOSH, S.R; TRAÇO, P.K.; TRIPATHI, N.K.; LAKSMI, V.; MAMIDI, N.; SHRIVASTVA, A.; GUPTA,N.; SAXENA, P.; BABU, J. P.; RAO, P.V.L; MORITA, K. Rapid and Real-Time Detection of Chikungunya virus by reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification assay. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol 45, n.2, p. 351-357, 2007.

PHAM, H.M.; NAKAJIMA, C.; OHASHI,K.; ONUMA,M. Loop-mediated isothermal amplification of Newcastle disease virus. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol 43, 4 ed., p. 1646-1650, 2005.

REN,X.; EL-SAGHEER, A.H.; BROWN, T. Efficient enzymatic synthesis and dual-colour fluorescent labelling of DNA probes using long chain azido-dUTP and BCN dyes. **Nucleic Acids Res.** 44(8):e79. 2016.

RUSSO, T.A.; JOHN SHON, J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.*, **vol 5, p. 449-456, 2003.**

SANTOS, M.A.F.Desenvolvimento de métodos moleculares para detecção de *Theileria annulata*. (Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 2011.

SCHREMMER, C. J. E. LOHR; U. WASTLHUBER; J. KOSTERS; K. RAVELSHOFER; H. STEINRUCK; L. H. WIELER. Enteropathogenic *Escherichia coli* in Psittaciformes. *Avian Pathology*. V.28, p. 349-354.1999

SHEN, F.; DAVYDOVA, E.K.; DU,W.; KREUTZ,J.E.; PIEPENBURG, O.; ISMAGILOV,R.F. Digital Isothermal Quantification of nucleic acids via simultaneous chemical initiation of recombinase polymerase amplification reactions on slipchip. **Analytical Chemistry**. Vol 83,n. 9, p. 3533-3540, 2011.

SUEBSING,R.; KAMPEERA,J.; SIRITHAMMAJAK,S.; WITHYACHUMNARNKUL,B; TURNER,W.; KIATPATHOMCHAI,W. Colorimetric Method of Loop-Mediated Isothermal Amplification with the Pre-Addition of Calcein for Detecting *Flavobacterium columnare* and its Assessment in Tilapia Farms. **Journal of Aquatic Animal Health**, vol 27, p. 38-44, 2015.

SLUPPHAUG,G.; ALSETH, I.; EFTEDAL,G.; VOLDEN, H.E.; KROKAN. Low Incorporation of dUMP by Some Thermostable DNA Polymerases May Limit Their Use in PCR Amplifications. **Analytical Biochemistry**. Vol. 211. Issue 1. p. 164-169. 1993

TATIBANA, B.T.; SANO,A.; UNO,J.; KAMEI,K.; IGARASHI,T.; MIKAMI,Y.;MIYAJI,M.; NISHIMURA,K.; ITANO,E.N. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp43 gene in sputa by loop-mediated isothermal amplification method. **Journal of clinical laboratory analysis**. Vol 23, p. 139-143, 2009.

TIAN, B.; ZHEN, Q.; MA, J.; *et al.* Attomolar Zika virus oligonucleotide detection based on loop-mediated isothermal amplification and AC susceptometry. **Biosensors and Bioelectronics**. Vol. 86. p. 420-425. 2016.

TLILI,C.; SOKULLU,E.; SAFAVIEH,M.; TOLBA, M.; AHMED, M.U.; ZOUROB, M. Bacteria Screening, viability, and confirmation assays using bacteriophage-impedimetric/Loop-mediated isothermal amplification dual-response biosensors. **Analytical Chemistry**. Vol 85, n. 10, p. 4893-4901, 2013.

TOMITA, N *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. **Nature Protocol**.p877-882. 2008.

UDAYKUMAR E.M; EPSTEIN J.S.; HEWLETT, I.K. A novel method employing UNG to avoid carry-over contamination in RNA-PCR. *Nucleic Acids Res*, vol.21, p.3917–3918, 1993.

UDDIN, S.M.; IBRAHIM, F.; SAYAD, A.A.; THIHA, A.; PEI, K.X.; MOHKAR, M.S.; HASHIM, U.; CHO, J.; THONG, K.L. A portable automatic endpoint detection system for amplicons of loop mediated isothermal amplification on microfluidic compact disk platform. **Sensors**, Vol 15, p. 5376-5389, 2015.

VASOO, S; PRITT B.S. Molecular diagnostics and parasitic disease. Clin Lab Med, vol 33, n. 3, p. 461-503, 2013.

VICENT, M; XU Y; KONG, H. Helicase-dependent Isothermal DNA amplification. EMBO Rep. vol 5, p. 795–800.2004

WANG, Y.H.; WANG, G.X; ZHANG, D.L.; YIN,H.; WHANG,H. Detection of acute toxoplasmosis in pigs using Loop-Mediated Isothermal Amplification and Quantitative PCR. **Korean Journal of Parasitology**. Vol, 51, n. 5; p. 573-577, 2013.

WANG,F.; JLANG,L.,GE,B. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays for Detecting Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Ground Beef and Human Stools. **Journal of clinical Microbiology**, vol 50, p. 91-97, 2012.

WOOLLEY, A. T.; MATHIES, R. A. Ultra-high-speed DNA fragment separations using microfabricated capillary array electrophoresis chips. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 91, p. 11348-11352, 1994.

WOZNIAKOWSKI, L.; KOZDRUN,W.; SAMOREK-SALAMONOWICZ,E. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. **Virology Journal**. Vol 9, n. 110, p. 3-11, 2012.

WU, L.T; THOMAS,I; CURRAN,M.D; ELLIS,J.S.;PARMAR,S.;GOEL,N.;SHARMA,P.I.; ALLAIN J.P. e LEE,H.H. Duplex Molecular Assay Intended for Point-of-Care Diagnosis of Influenza A/B Virus Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Vol. 51, n 9, p. 3031-3038, 2013.

WU, Q.; JIN, W.; ZHOU, C.; HAN, S.; YANG, W.; ZHU, Q.; JIN, Q.; MU, Y. Integrated glass microdevice for nucleic acid purification, loop-mediated isothermal amplification, and online detection. **Analytical Chemistry**. Vol 83, n.9, p. 3336-3342, 2011.

XU, J.;RONG,R.; et al. Sensitive and rapid detection of *Schistosoma japonicum* DNA by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). **International Journal of parasitology**, vol 40, n.6, p. 327-331, 2009.YAGER, P.; EDWARDS, T.; FU,E.; HELTON, K.; NELSON, K.; TAM,

M. R.; WEIGL, B. H. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. **Nature**, vol. 442, p. 412-418, 2006.

YAMADA, Y.; ITOH,H.; YOSHIDA,M. Sensitive and rapid diagnosis of human parvovirus B19 infection by loop-mediated isothermal amplification. **British Journal of Dermatology**. Vol 155, p. 50-55, 2006.

YAN, L.; XIAO H.; ZHANG,Q. Systematic review: Comparison of Xpert MTB/RIF, LAMP and SAT methods for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Elsevier. **Tuberculosis**. p. 75-86. 2016

ZHAO, Y.; CHEN F.; LI, Q.; WANG, L.; FAN, C. Isothermal Amplification of Nucleic Acids. **Chem. Rev.** 115 (22), p. 12491–12545. 2015