

# DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR VOLTAMÉTRICO PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DENGUE 1 BASEADO EM CAMADA AUTOMONTADA DE CISTEÍNA E NANOPARTÍCULAS DE OURO MODIFICADAS

Karen Yasmim Pereira dos Santos Avelino<sup>1</sup>; Maria Danielly Lima de Oliveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Farmácia – CCS – UFPE; E-mail: kareniasmim@hotmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: m\_danielly@yahoo.com.br

**Sumário:** Neste estudo foi desenvolvido um imunossensor voltamétrico baseado em camada automontada de cisteína (Cys) e nanopartículas de ouro (AuNps) modificadas com ácido mercaptobenzóico (AMB) para a detecção do sorotipo 1 do vírus da dengue (DENV1). A técnica de voltametria cíclica (VC) foi utilizada para a caracterização eletroquímica das etapas de montagem do sistema sensor e para avaliar sua bioatividade frente às amostras biológicas. As análises voltamétricas foram realizadas a uma faixa de potencial de -0,2 a 0,7 V e velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. A interação do imunossensor com o sorotipo DENV1 resultou em alterações nos valores das correntes amperométricas, indicando o processo de reconhecimento bioespecífico entre o anticorpo e antígeno. Portanto, verifica-se o potencial de aplicabilidade do imunossensor para a detecção do vírus da dengue diretamente no soro de pacientes infectados com elevada sensibilidade e seletividade.

**Palavras-chave:** dengue, imunossensor; nanopartículas; voltametria cíclica.

## INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença febril aguda considerada um grave problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais. O vírus causador da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* e possui cinco sorotipos geneticamente distintos (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4 e DENV5) responsáveis por ocasionar três síndromes clínicas: dengue clássica, dengue hemorrágica e síndrome do choque da dengue. Considerando que a dengue possui um amplo espectro clínico, a obtenção de um diagnóstico preciso é essencial para a implementação de estratégias terapêuticas eficazes [1].

Neste cenário, os biossensores destacam-se por serem dispositivos capazes de fornecer informações analíticas sobre substâncias alvo com elevada sensibilidade, seletividade, baixo custo e rápida análise. Inúmeros elementos biológicos que podem ser utilizados para a construção de sistemas biossensíveis. No entanto, os anticorpos representam uma das principais classes de biomoléculas usadas para a obtenção de biossensores com elevada especificidade, comumente denominados de imunossensores [2].

Atualmente, plataformas nanoestruturadas baseadas em moléculas biocompatíveis e nanomateriais têm sido desenvolvidas para aumentar o desempenho analítico de biossensores. Uma alternativa inovadora é o uso de nanopartículas modificadas com grupos químicos capazes de orientar a estruturação da plataforma e permitir a ancoragem de biomoléculas através de ligações químicas específicas. Entre as diversas nanopartículas, destacam-se as AuNps que possuem excelentes propriedades para o interfaceamento do reconhecimento biológico. As principais características das AuNps são a biocompatibilidade, elevada relação entre superfície e volume que proporciona uma maior área eletroquimicamente ativa e atuam como agentes para a transferência direta e efetiva de elétrons entre o eletrodo e a biomolécula [3].

Em decorrência da alta incidência, cerca de 50 a 100 milhões de infecções por ano em mais de 100 países endêmicos, a dengue é considerada a mais importante virose transmitida por artrópodes que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade. Portanto, o desenvolvimento de novas tecnologias de detecção é de grande interesse para a saúde pública.

### MATERIAIS E MÉTODOS

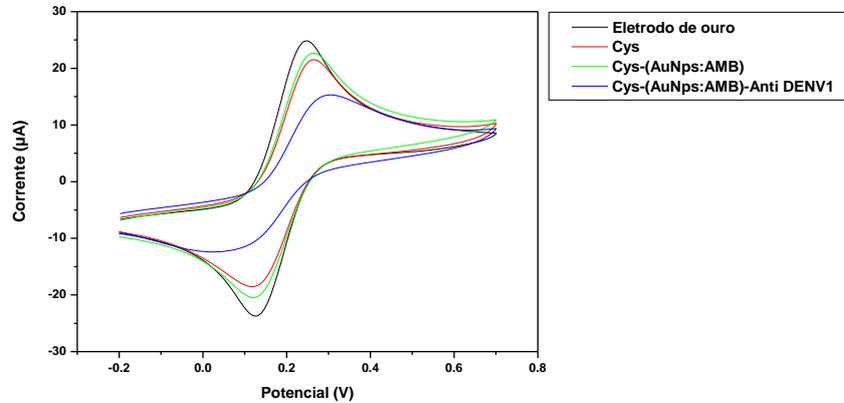
A técnica de VC foi escolhida para a caracterização eletroquímica das diferentes etapas de construção do imunossensor. As medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato/Galvanostato Autolab 128N, associado a uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos imersos em 20 mL de solução de ferro-ferricianeto de potássio a 10 mM (pH 7,4), atuando como sonda redox. O eletrodo de ouro foi utilizado como eletrodo de trabalho, o eletrodo de Ag/AgCl saturado com KCl a 3M e o eletrodo de platina foram usados, respectivamente, como eletrodo de referência e contra-referência. As análises foram registradas em uma faixa de potencial de -0,2 a 0,7 V e velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>.

Para a preparação do imunossensor, inicialmente, o eletrodo de ouro foi cuidadosamente polido em um disco de feltro com uma suspensão de alumina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) a 0,05 µM, em seguida, enxaguado com água ultrapura, submetido a um banho de ultrassom durante 10 minutos para a remoção de partículas residuais e seco ao ar. Em sequência, a superfície de ouro do eletrodo de trabalho foi imersa por 15 minutos em solução de Cys a 30 mM e pH 7,4. Após a formação da camada automontada de Cys, foram adicionados 2 µL de solução aquosa de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) a 0,4 M e N-hidroxisuccinimida (NHS) a 0,1 M, em uma proporção de 1:1 (v/v) durante 10 minutos. Em seguida, 5 µL da solução de AuNps:AMB foram adicionados sobre a monocamada de Cys ativada com EDC e NHS por 60 minutos. Posteriormente, a solução de EDC e NHS foi acrescentada sobre a plataforma nanoestruturada de Cys-(AuNps:AMB) para a imobilização química dos anticorpos anti-DENV1. Nesta etapa, foram adicionados 5 µL da amostra de anticorpo monoclonal por 40 minutos para obtenção do sistema sensor Cys-(AuNps:AMB)-AntiDENV1. A sensibilidade do imunossensor Cys-(AuNps:AMB)-AntiDENV1 foi avaliada através de estudo de reconhecimento bioespecífico com o sorotipo DENV1 em diferentes diluições (1:10, 1:25, 1:50, 1:75 e 1:100). O vírus da febre amarela (YF) foi usado como controle negativo para a verificação da seletividade do imunossensor. Em adição, foi verificada a capacidade de biodeteção do imunossensor diretamente no soro de pacientes infectados com o sorotipo DENV1. Nestes ensaios de bioatividade, o imunossensor foi exposto a 5 µL de cada amostra por 15 minutos.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

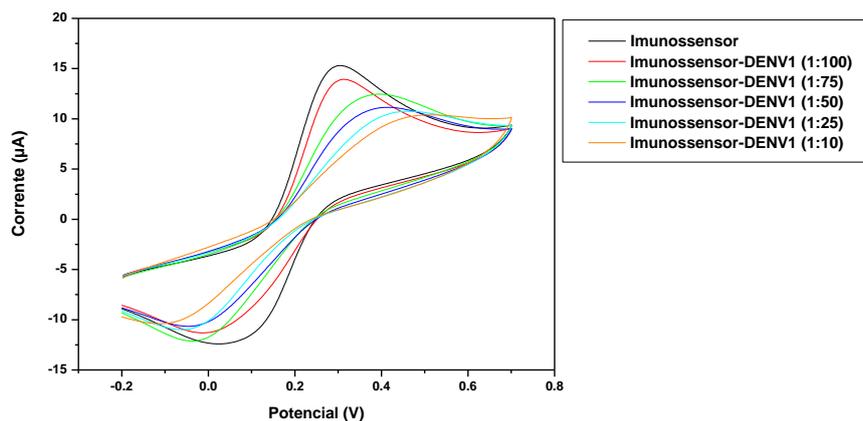
A figura 1 demonstra os voltamogramas cíclicos para cada etapa de montagem do imunossensor. A partir da caracterização voltamétrica, pode-se observar uma mudança no comportamento eletroquímico do eletrodo de ouro após a adsorção das moléculas de Cys. Verifica-se uma redução significativa das correntes de pico anódica e catódica que sugere a formação de uma camada auto-organizada de Cys sobre a superfície de trabalho, bloqueando parcialmente o processo de oxido-redução dos eletrólitos na dupla camada elétrica. Os grupos amino (-NH<sub>2</sub>) das moléculas de Cys permitem a ligação covalente com os grupos carboxílicos (-COOH) do AMB presente nas AuNps. Ao adicionar as AuNps modificadas com AMB sobre o eletrodo com Cys, foi observado um aumento no sinal de corrente devido as propriedades condutoras das nanopartículas metálicas e a presença de um anel aromático na molécula do AMB que facilita a transferência de elétrons na interface eletrodo-solução. Os anticorpos anti-DENV1 foram ancorados sobre a plataforma

nanoestruturada Cys-(AuNps:AMB) através de ligações covalentes entre grupos amino terminais de seus aminoácidos e grupos carboxílicos do AMB. Após a imobilização dos anticorpos monoclonais houve um considerável decréscimo dos picos voltamétricos em decorrência da baixa penetração da sonda redox no sistema Cys-(AuNps:AMB)-AntiDENV1.



**Figura 1.** Caracterização voltamétrica das etapas de montagem do imunossensor Cys-(AuNps:AMB)-Anti DENV1.

Para determinar a capacidade de reconhecimento bioespecífico do imunossensor, o dispositivo foi exposto ao vírus DENV1 em diferentes diluições (1:10, 1:25, 1:50, 1:75 e 1:100). Após a interação do imunossensor com as amostras virais, pode-se observar uma diminuição nos valores das correntes de pico e uma redução nas áreas voltamétricas, sendo estes decréscimos proporcionais aos menores fatores de diluição das amostras (Figura 2). Segundo Luna et al. (2015) a formação de complexos moleculares com propriedades não condutoras, como por exemplo, os complexos de anticorpo-antígeno, reduzem o fluxo de elétrons para o transdutor e alteram a resposta eletroquímica do sistema [4]. Assim, pode-se verificar a capacidade de biodeteção e a sensibilidade do imunossensor frente ao vírus DENV1.

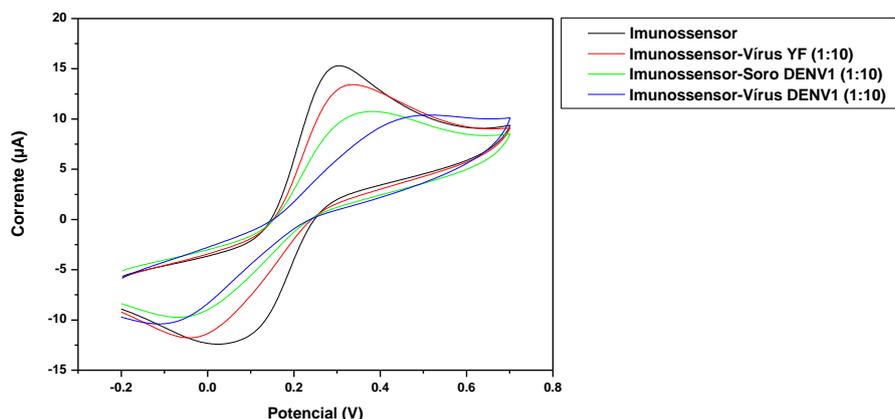


**Figura 2.** Voltamogramas cíclicos obtidos após a exposição do imunossensor Cys-(AuNps:AMB)-Anti DENV1 ao sorotipo 1 do vírus da dengue em variáveis diluições (1:10, 1:25, 1:50, 1:75 e 1:100).

Para avaliar a seletividade, o imunossensor foi exposto ao vírus da febre amarela, um flavivírus da mesma família do vírus da dengue responsável por causar resultados falso-positivos em métodos convencionais de diagnóstico para dengue. Após a interação do imunossensor com o vírus da febre amarela foi observada uma mudança sutil na resposta

voltamétrica, refletindo a seletividade do sistema sensor Cys-(AuNps:AMB)-AntiDENV1 (Figura 3).

Em adição, a capacidade de biodeteção do imunossensor foi verificada frente a amostras clínicas de pacientes infectados com o sorotipo DENV1. Como demonstrado na figura 3, após o processo de reconhecimento molecular foi obtido um voltamograma cíclico menos sigmóide e uma redução no sinal de corrente. Estes resultados sugerem a formação de imunocomplexos na superfície do sistema sensor, demonstrando que o biodispositivo é capaz de reconhecer o sorotipo DENV1 na presença de interferentes.



**Figura 3.** Análise voltamétrica da bioatividade do imunossensor Cys-(AuNps:AMB)-Anti DENV1 frente ao soro de paciente contaminado com o sorotipo DENV1 e a amostra viral purificada. Em adição, a seletividade do imunossensor foi avaliada após sua exposição ao vírus da febre amarela.

## CONCLUSÕES

Um imunossensor voltamétrico baseado em camada automontada de Cys e AuNps modificadas com AMB foi desenvolvido com sucesso para a detecção do sorotipo I do vírus da dengue. As análises voltamétricas possibilitaram a caracterização das etapas de montagem do sistema sensor Cys-(AuNps:AMB)-AntiDENV1 e evidenciaram sua capacidade de reconhecimento bioespecífico. Em adição, o imunossensor foi capaz de fornecer informações analíticas qualitativas ou semi-quantitativas com elevada especificidade, sensibilidade e seletividade. Portanto, o biodispositivo nanoestruturado desenvolvido pode ser considerado uma ferramenta alternativa para o diagnóstico molecular da dengue em laboratórios clínicos e centros de pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

À UFPE, PROPESQ e CNPq pelo auxílio para elaboração desta pesquisa.

## REFERÊNCIAS

- [1] TELES, F. Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 687, p. 28-42, 2011.
- [2] PRODROMIDIS, M.I. Impedimetric immunosensors - a review. **Electrochimica Acta**, v.55, p. 4227-4233, 2010.
- [3] PINGARRÓN, J. M.; YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 5848-5866, 2008.
- [4] LUNA, D.M.N. et al. Electrochemical immunosensor for dengue virus serotypes based on 4-mercaptobenzoic acid modified gold nanoparticles on self-assembled cysteine monolayers. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 565-572, 2015.