

IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS PARA APLICAÇÃO EM SENSOR INTERDIGITADO VISANDO O DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Adriana Neuman A. L. M. de Brito¹; Rosa Amalia Fireman Dutra²

¹Estudante do Curso de Biomedicina-CCB-UFPE; E-mail: dricalins22@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Engenharia Biomédica-CTG-UFPE; Email:rfiremandutra@yahoo.com.br

Sumário: O Brasil é carente de métodos de diagnóstico rápidos e eficazes em relação às doenças de alta morbimortalidade. Comparado às técnicas convencionais, os biossensores têm sido reconhecido como alternativas mais atrativas, por permitirem resultados diretos sem ensaios ou provas bioquímicas. Neste trabalho foi realizada a construção de um imunossensor eletroquímico baseado na associação do polímero condutor polipirrol à tinta de carbono utilizada na confecção do eletrodo para detecção da proteína não-estrutural 1 do vírus dengue, com a intenção de posteriormente transferir esta tecnologia aos sensores interdigitados. Foram utilizadas técnicas analíticas, tais como, voltametria cíclica, para obtenção dos principais resultados. O imunossensor proposto representa um método sensível e eficaz na detecção do NS, importante na fase aguda da infecção.

Palavras-chave: biossensores; dengue; NS1; polipirrol;

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as ciências analíticas experimentam um avanço relacionado à capacidade de obtenção de informações químicas em diversos sistemas, proporcionando um elevado desenvolvimento na detecção de pequenas moléculas, resultando na automação, miniaturização e simplificação do analito em estudo (MURPHY, 2006). Neste contexto, os biossensores adquirem bastante atenção e importância devido a possibilidade de avaliação de processos sintéticos ou biológicos (ZHANG et al., 2000).

De acordo com a definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, os biossensores são um grupo de sensores químicos que são capazes de proporcionar informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa, utilizando um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas ou microorganismos) em contato a transdutores (que podem ser ópticos, eletroquímicos, térmicos, etc) que convertem o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado e amplificado. (PEREIRA, SANTOS & KUBOTA, 2002). Quando anticorpos ou fragmentos de anticorpos são utilizados como elementos de reconhecimento molecular para seus analitos específicos (antígenos) nos biossensores, estes dispositivos são denominados imunossensores, e possuem alta confiança devido à grande especificidade da reação antígeno-anticorpo.

No desenvolvimento de imunossensores, a utilização de matrizes poliméricas na construção de plataformas sensoras nanoestruturadas tem gerado novas possibilidades para exploração de superfícies eletródicas com acentuadas propriedades eletroquímicas (SILVA et al., 2014). Em particular, polímeros condutores, como polipirrol (PPi), têm se destacado por apresentarem atividade redox intrínseca podendo gerar superfícies eletrocatalíticas quando em associação à tinta de carbono utilizada na confecção dos eletrodos impressos. Como vantagens, o PPi possui uma fácil deposição eletroquímica, facilidade de controle na espessura dos finos filmes obtidos, mesmo quando aplicado diretamente sobre o eletrodo previamente fabricado. (CHANDRASEKHAR, 1999).

Considerando que a dengue é um problema da saúde pública mundial, apresentando cerca de 50 a 100 milhões de casos por ano, e com 3 bilhões pessoas em risco de infecção, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, este projeto teve como objetivo desenvolver um imunossensor, teste rápido (*point-of-care testing*). A proteína não-estrutural 1 (NS1) do vírus dengue é um importante marcador precoce da fase aguda da doença, encontrado em altas concentrações no sangue de pessoas infectadas logo nos primeiros dias da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Confeção dos eletrodos impressos

Os eletrodos impressos (EICPPy) foram feitos em um suporte de PET (politereftalato de etila), previamente moldado com superfície adesiva. A tinta de carbono foi misturada ao PPy (polipirrol) na concentração de 2,5%. Antes de aplicar a mistura no suporte, a superfície de PET foi limpa com álcool 70% a fim de retirar qualquer possível impureza. Após a impressão da tinta, os eletrodos foram submetidos à secagem em estufa a 60°C, por 20 minutos.

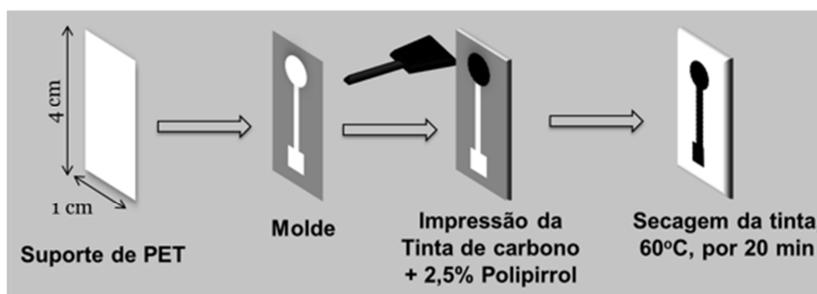


Figura 1. Representação esquemática da confecção dos eletrodos impressos de carbono com PPy

2- Limpeza eletroquímica dos eletrodos impressos

Previamente a sua utilização nos ensaios eletroquímicos, o EICPPy foi submetido a um procedimento eletroquímico de limpeza. Foram realizados 40 ciclos voltamétricos, na faixa de potencial de -2 a 2 V, em KCl 100mM. Análises por VC em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (0,05 M) preparado em KCl (0,1M) foram realizadas após pré-tratamento eletroquímico para caracterização do perfil dos picos redox do eletrodo.

3- Imobilização do Anti-NS1 no EIC-PPy

Uma solução de anticorpos anti-NS1 (10 mg/mL) foi tratada com uma solução de EDC (*N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) 2mM e NHS (*N*-hidroxi succinimida) 5mM, diluída em tampão PBS (10 mM, pH 7,4), durante 60 minutos, para a ativação dos grupos carboxílicos.

Uma alíquota de 5 μ L da solução de anti-NS1 foi pipetada na superfície do eletrodo e incubada por 60 minutos em câmara úmida, tempo suficiente para ocorrer a ligação entre os grupos carboxílicos do anti-NS1 e os grupamentos amina do PPy presentes no eletrodo.

4- Caracterização eletroquímica do imunossensor

A caracterização eletroquímica foi realizada por meio da técnica de voltametria cíclica. Todos os voltamogramas do imunensaio eletroquímico foram realizados em $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (5 mM) preparado em KCl (0,1 M), na faixa de potencial de -0,6 a 1 V, sob velocidade de varredura de 50 mV/s.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A incorporação do polipirrol a tinta de carbono resultou em um aumento de aproximadamente 52% da densidade de corrente (Figura 2A (a)). O EICPPy se mostrou altamente reprodutível e ofereceu métodos sensíveis de detecção de analitos alvo, mantendo a produção de baixo custo por meio de escalas de economia. O desvio padrão relativo das medições para dez eletrodos foi de 2,9%, sugerindo precisão e reprodutibilidade aceitáveis. Ambos os resultados podem ser atribuídos ao uso do polipirrol em conjunto com a tinta de carbono, demonstrando que o polímero contribuiu consideravelmente para melhor transferência de carga, melhorando o desempenho técnico do eletrodo.

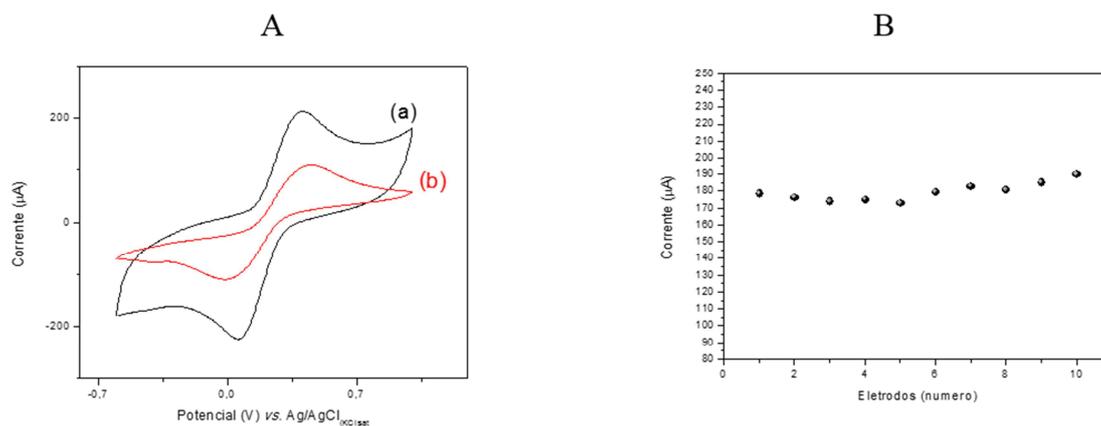


Figura 2. A: (a) EIPPy; (b) EI. Medidas realizadas em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM) preparado em KCl (0,1 M), sob velocidade de varredura de 50 mV/s. B: Gráfico de pontos correspondente à reprodutibilidade do EIC-PPy (n=10).

Após a imobilização do anti-NS1 na superfície do EICPPy, foi observada uma diminuição da corrente podendo ser explicada pela interação entre as cargas positivas da superfície do eletrodo e as cargas negativas presentes nos grupos carboxílicos do anti-NS1. Com isso foram feitos estudos de velocidade de varredura e estabilidade desta etapa. Ao variar a velocidade das varreduras cíclicas, observou-se um leve deslocamento das correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}) para uma região de potencial mais positiva e negativa, respectivamente, em função do aumento da velocidade de varredura (Figura 3A). As variações de I_{pa} e I_{pc} foram linearmente proporcionais à raiz quadrada das velocidades de varredura, indicando que a transferência de elétrons na interface sensora é controlada por difusão (Figura 3A inset). O estudo de estabilidade do anti-NS1 na superfície do eletrodo foi realizado submetendo o EIC-PPy/anti-NS1 a 20 sucessivos ciclos voltamétricos (Figura 3B). Os voltamogramas foram registrados na faixa de potencial de -0,6 a 1 V e velocidade de varredura fixa de 50 mV/s em $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mM). Não foi observado decréscimo significativo na corrente após os 20 ciclos de varredura. O coeficiente de variação calculado para I_{pa} foi 0,94%. Este valor está dentro do valor ótimo citado na literatura (coeficiente de variação $\leq 5\%$).

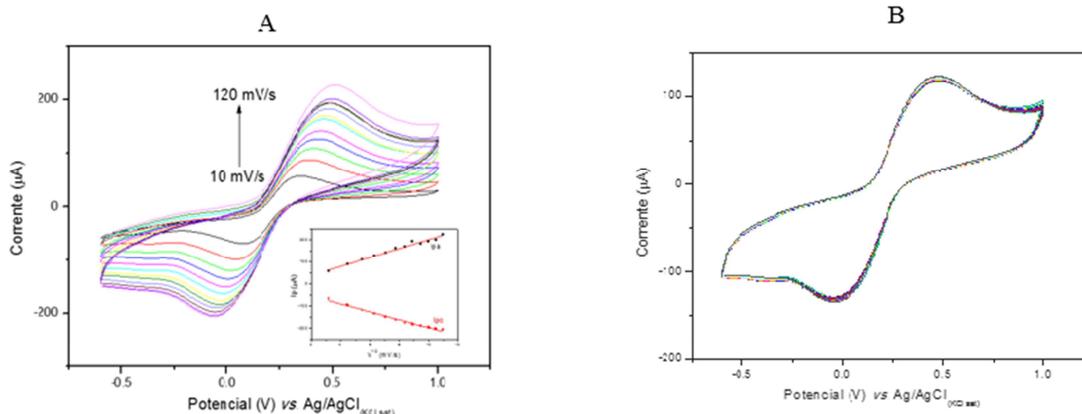


Figura 3. A: Voltamogramas cíclicos do EIC-PPy/Anti-NS1 sob diferentes velocidades de varredura (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 mV/s). B: Voltamogramas cíclicos sucessivos do EIC-PPy/Anti-NS1. Medidas realizados em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5 mM) preparado em KCl (0,1 M), sob velocidade de varredura de 50 mV/s.

A resposta do sensor foi testada após a incubação de NS1 à superfície sensora com uma diminuição de 12,51% na I_{pa} , mostrando a viabilidade na detecção da proteína em concentração de 1 μ g/mL devido a observada diminuição na corrente.

CONCLUSÕES

- Metodologias irão ser testadas para aprimorar a resposta sensora, tornando o imussensor proposto uma tecnologia acessível, de baixo custo e prática.
- A dengue é uma doença que possui alta taxa de mortalidade no Brasil, e construir dispositivos analíticos para o seu diagnóstico é uma prioridade, pois diminuiria o tempo de espera por exames convencionais, facilitando assim o tratamento precoce, aumentando as chances de sobrevivência do paciente.
- O protótipo desenvolvido mostra-se promissor como uma alternativa de baixo custo e prático para o diagnóstico da dengue. Pretende-se aplicar a plataforma e as biomoléculas utilizadas em eletrodos interdigitados.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à PROPESQ, à UFPE. À minha professora orientadora Rosa Dutra e à Ana Carolina Dias por toda sua paciência.

REFERÊNCIAS

- CHANDRASEKHAR, P. "Conducting Polymers, Fundamentals and Applications: A Practical Approach". Kluwer Academic Publishers Boston, 1999.
- DENGUE: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.7-16, dez. 2010. Nature Publishing Group.
- MURPHY, L.; (2006). Biosensors and bioelectrochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 10 (2), 177-184.
- PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Química Nova*, v. 25, p. 1012-1021, 2002.
- SILVA, M.m.s. et al. A thiophene-modified screen printed electrode for detection of dengue virus NS1 protein. **Talanta**, [s.l.], v. 128, p.505-510, out. 2014. Elsevier
- ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosens. Bioelectron.* 15 (5-6), 273-282.