DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MODIFICADOS COM NANOPARTÍCULAS DE OURO PARA APLICAÇÃO NA ELETROANÁLISE DE FÁRMACOS

Luana Gonçalves (PIBIC/FA), Dhésmon Lima, Ariane Ribicki, Karen Wonrath, Sérgio Toshio Fujiwara, Christiana Andrade Pessôa(Orientador), e-mail: christianapessoa@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Ciências Exatas e da Terra e Química

Palavras-chave: Doença de Chagas, imunossensor eletroquímico, nanopartículas de ouro, silsesquioxano.

Resumo

Neste trabalho é reportado o desenvolvimento de um novo imunossensor eletroquímico para o diagnóstico da doença de Chagas (DC). O dispositivo foi baseado na imobilização de AuNPs funcionalizadas com o polieletrólito cloreto de 3-n-propil-(2-amino-4-metil)piridínio silsesquioxano ($SiAMPy^+$) e antígenos proteicos relacionados ao protozoário *Trypanosoma cruzi* sobre eletrodos de carbono vítreo oxidados (*ox*-ECV). As AuNPs-$SiAMPy^+$ foram sintetizadas e caracterizadas por UV-VIS, FTIR, MET e determinação do potencial zeta. A plataforma obtida foi caracterizada por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) na presença do marcador redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$. O princípio de detecção baseou-se na variação da corrente de pico obtida por voltametria de onda quadrada (VOQ) após imunoensaios na presença de amostras de soro contendo anticorpos policlonais específicos para antígenos de *T. cruzi* (AB_{DC}). O dispositivo mostrou-se sensível e seletivo para a detecção de AB_{DC} e não sofreu influência de outros componentes do soro (controle negativo). Os resultados obtidos sugerem que o imunossensor pode encontrar aplicações clínicas para o diagnóstico da DC.

Introdução

A doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*[1] e é classificada como uma doença negligenciada[2]. O diagnóstico clínico de infecção por *T. cruzi* é geralmente realizado a partir da utilização de métodos como coleta de sangue, exame parasitológico, exame sorológico, xenodiagnóstico e a hemocultura[3], os quais geralmente são lentos e nem sempre sensíveis[4] para o fornecimento de resultados confiáveis. Assim, o desenvolvimento de novos métodos que sejam sensíveis, robustos, práticos e economicamente viáveis para o diagnóstico clínico precoce da DC faz-se necessário. Neste cenário, o emprego de imunossensores eletroquímicos a partir da imobilização de antígenos ou anticorpos na superfície de transdutores tem ganhado destaque como uma promissora alternativa aos métodos citados anteriormente para diagnóstico da DC, devido a vantagens como especificidade, alta sensibilidade, possibilidade de miniaturização e resposta rápida[5]. O desempenho analítico de um imunossensor pode ser ainda melhorado a partir da co-imobilização de materiais nanoestruturados, juntamente com os antígenos ou anticorpos. De maneira especial, a aplicação de nanoparticulas de ouro (AuNPs) em imunossensores pode incrementar de modo substancial as suas propriedades, favorecendo o aumento de

sua sensibilidade, o aperfeiçoamento de suas propriedades eletrocatalíticas e também o aumento da estabilidade do sistema, uma vez que a biocompatibilidade apresentada pelas AuNPs pode favorecer a interação das mesmas com as biomoléculas imobilizadas na superfície do transdutor. Neste sentido, o presente trabalho visa desenvolver um novo imunossensor para diagnóstico clínico da DC, a partir da imobilização de AuNPs e antígenos proteicos sobre eletrodos de carbono vítreo oxidados (*ox*-ECV). Empregou-se AuNPs funcionadas com o polieletrólito cloreto de 3-n-2-amino-4-metil piridínio silsesquioxano (AuNPs-SiAMPy$^+$).

Material e Métodos

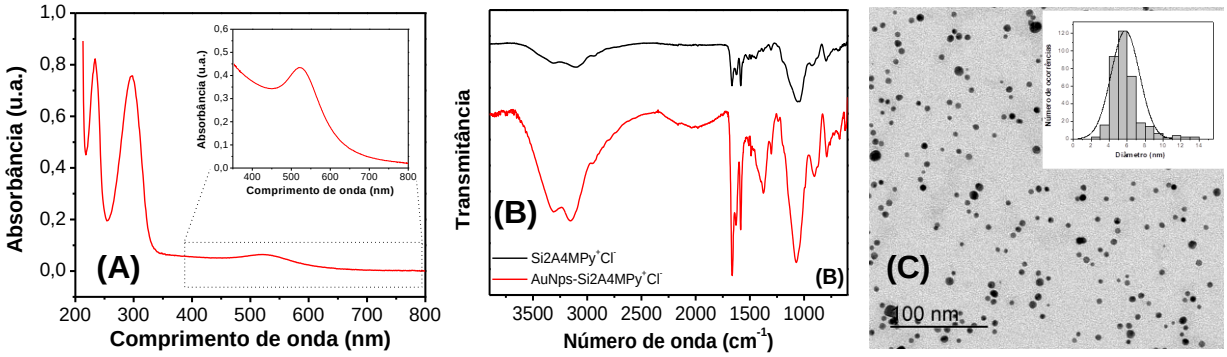
As AuNPs-SiAMPy$^+$ foram obtidas por redução do complexo $[AuCl_4]^-$ (2,25 mmol L^{-1}) empregando o SiAMPy$^+$ (3,0 g L^{-1}) como agente estabilizante e $NaBH_4$ (5,5 mmol L^{-1}) como agente redutor[6]. As suspensões obtidas foram caracterizadas por espectroscopia UV-VIS, FTIR, determinação do potencial zeta e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A superfície do ECV foi limpa[7], oxidada por VC em H_2SO_4 0,5 mol L^{-1} e então ativada por 30 min em solução de EDC 100 mmol L^{-1} e NHS 50 mmol L^{-1} [8]. A seguir, as AuNPs-SiAMPy$^+$ foram depositadas sobre o *ox*-ECV por 60 min. A imobilização de antígenos relacionados à DC (AG_{DC}) foi realizada por incubação dos eletrodos em AG_{DC} durante 60 min. Os sítios de ligação não-específicos foram bloqueados com uma solução de BSA 0,005% (m/V) por 30 min. O imunossensor foi designado como *ox*-ECV/AuNPs-SiAMPy$^+$/AG_{DC}. Os imunoensaios para detecção de DC foram realizados por incubação dos imunossensores em soro contendo anticorpos anti-*T. cruzi* (AB_{DC}) durante 30 min. Os imunossensores foram caracterizados por VC e EIE, e os imunoensaios foram realizados por VOQ. Empregou-se uma célula contendo o *ox*-ECV/AuNPs-SiAMPy$^+$/AG_{DC} como eletrodo de trabalho, um eletrodo Ag/AgCl/KCl_{sat} como eletrodo de referência e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Os experimentos foram conduzidos em um potenciostato Autolab® M204, em meio de tampão PBS 0,15 mol L^{-1} pH 7,4 contendo 5,0 mmol L^{-1} de $K_3[Fe(CN)_6]$ e $K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$. Imunoensaios para detecção de anticorpos relacionados à DC foram realizados com o imunossensor empregando-se VOQ, novamente em meio de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.

Resultados e Discussão

Espectros na região do UV-VIS evidenciaram que as AuNPs-SiAMPy$^+$ apresentaram bandas em 234 nm (transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis piridínio da estrutura do SiAMPy$^+$), em 297 nm (transferência de carga intermolecular entre os grupos 2-amino-4-metilpiridínio) e em 521 nm (ressonância *plasmon* de superfície) (Figura 1A). O espectro de FTIR obtido para o SiAMPy$^+$ mostrou bandas em 3310 e 3104 (ν NH_2), 1665 e 1584 (anel piridínio), 1044 (ν_{ass} Si-O-Si) e 797 cm^{-1} (ν_{sim} Si-O-Si). Para as AuNPs-SiAMPy$^+$, foram observadas bandas em 3312, 3156, 1663, 1585, 1071 e 791. O deslocamento das bandas referentes aos grupos -NH_2 e Si-O-Si pode ser um indicativo da interação entre o SiAMPy$^+$ e as AuNPs, sugerindo que tais grupos podem estar envolvidos na estabilização das nanopartículas formadas (Figura 1B). Imagens obtidas por MET (Figura 1C) revelaram que as AuNPs-SiAMPy$^+$ são homogêneas e apresentam uma morfologia esférica, com um diâmetro médio igual a 5,8 ± 1,6 nm. Confirma-se deste modo a eficiência do silsesquioxano SiAMPy$^+$ para a estabilização das nanopartículas formadas.

Figura 1. (A) Espectro na região do UV-VIS da suspensão de AuNPs-SiAMPy$^+$. (B) Espectros de FTIR de filmes *cast* de Si2A4MPy$^+$Cl$^-$ e da suspensão AuNps-

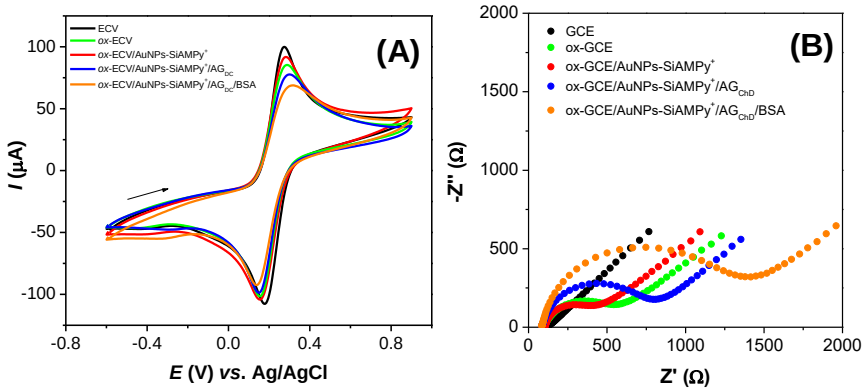
Si2A4MPy$^+$Cl$^-$. (C) Imagem de MET obtida em magnificação 50 kx para as AuNPs-SiAMPy$^+$ e histograma de distribuição de tamanho.



As AuNPs-SiAMPy$^+$ apresentaram potencial zeta igual a +58,6 mV, sugerindo sugere que as mesmas são positivamente carregadas (devido à presença dos grupos piridínio do SiAMPy$^+$) e estáveis em suspensão. A estabilização pode ser resultante de uma combinação de efeitos estéricos e eletrostáticos exercidos pelo invólucro de SiAMPy$^+$ ao redor de cada nanopartícula (estabilização eletrostérica).

As construções dos imunossensores foi monitorada pela realização de medidas de VC e de EIE (Figura 2). A oxidação do ECV em H_2SO_4 proporcionou uma diminuição nas correntes de pico (I_p) e um aumento na resistência à transferência de carga (R_{ct}) para o processo redox dos íons $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$, como consequência da repulsão eletrostática entre estes e os grupos COO^- na superfície do *ox*-ECV. A deposição das AuNPs-SiAMPy$^+$ foi acompanhada por um aumento nas I_p e uma diminuição na R_{ct}, o que se deve à condutividade elétrica elevada e à alta área superficial das AuNPs-SiAMPy$^+$ (SAHA et al., 2012). Novas diminuições na I_p e aumentos na R_{ct} foram observados após a ligação dos AG_{DC} e da BSA, o que deve-se ao efeito isolante causado a partir da imobilização das biomoléculas na superfície do eletrodo. A ligação dos AG_{DC} à plataforma *ox*-ECV/AuNPs-SiAMPy$^+$ provavelmente ocorreu por interações eletrostáticas e ligações covalentes do tipo Au-S e Au-N entre as moléculas de AG_{DC} e as AuNPs-SiAMPy$^+$.

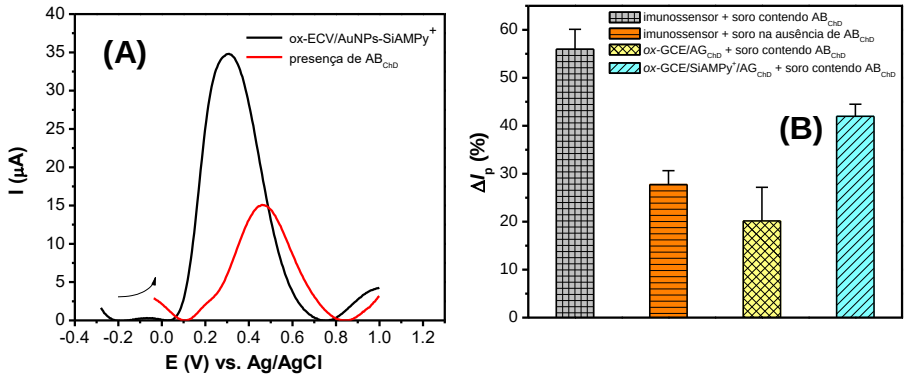
Figura 2. (A) Voltamogramas cíclicos e (B) espectros de impedância eletroquímica (diagramas de Nyquist) obtidos a cada etapa de construção dos imunossensores em meio de tampão PBS 0,15 mol L^{-1} pH 7,4 contendo 5,0 mmol L^{-1} do marcador redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$.



Uma queda significativa no valor de I_p foi observada após a incubação dos imunossensores na amostra de soro que continha anticorpos característicos da DC (AB_{DC}) (Figura 3A), o que pode estar relacionado à formação de imunocomplexos na superfície do eletrodo. A incubação dos imunossensores em amostras de soro na ausência de AB_{DC} (controle negativo) não causou uma diminuição de I_p na mesma ordem de magnitude, sugerindo que o dispositivo não exibiu influência significativa

de outros componentes proteicos presentes na amostra testada. Isto pode ser tomado, como uma evidência de que o imunossensor foi capaz de detectar de forma específica os AB_{DC}. Uma maior variação I_p foi observada para a plataforma *ox*-ECV/SiAMPy$^+$/AG_{DC} em comparação ao *ox*-ECV/AG_{DC} e ao *ox*-ECV/SiAMPy$^+$/AG_{DC} (Figura 3B), o que evidencia que as AuNPs e o silsesquioxano contribuíram de forma sinérgica para uma imobilização mais efetiva dos AG_{DC}, levando a um melhor desempenho analítico do imunossensor proposto.

Figura 3. (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos para o *ox*-ECV/AuNPs-SiAMPy$^+$/AG_{DC} antes e após incubação em amostra de soro contendo AB_{DC}, em tampão PBS 0,15 mol L^{-1} pH 7,4 contendo 5,0 mmol L^{-1} de $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$). (B) Respostas geradas pelo imunossensor após incubação em soros na presença ou ausência de AB_{DC}, e por diferentes plataformas na presença de AB_{DC}.



Conclusões

Neste trabalho, um novo e atrativo imunossensor voltamétrico para diagnóstico clínico da doença de Chagas foi desenvolvido, o qual foi baseado na imobilização de AG_{DC} sobre uma plataforma constituída por um ECV oxidado e modificado com AuNPs-SiAMPy$^+$, as quais influenciaram positivamente o desempenho do imunossensor. O princípio de detecção do imunossensor baseou-se na variação da corrente de pico gerada pelo imunossensor na presença do marcador redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ após incubação dos mesmos em amostras de soro contendo anticorpos específicos para os antígenos imobilizados. Pode-se afirmar que o imunossensor apresentado mostrou-se sensível e seletivo para a detecção dos biomarcadores de interesse, sugerindo possíveis aplicações em imunoensaios futuros para diagnóstico de DC. Ressalta-se ainda o papel eficaz do silsesquioxano SiAMPy$^+$ na síntese das AuNPs, e a possibilidade de utilização das mesmas na construção de outros sensores e biossensores eletroquímicos.

Agradecimentos

À UEPG, ao C-Labmu, ao GDEM e à Fundação Araucária.

Referências

[1]CHAGAS, C. **Memórias do Insituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p.159-218, 1909.
[2]CAMINHA, M. A. et al. **Journal of Proteomics,** v. 194, p. 179-190, 2019.
[3]MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Revista Patológica Tropical**, v. 42, p. 475-478, 2013.
[4]VINHAES, M. C.; DIAS, J. C. **Scielo,** v. 16, p. 7-12, 2000.
[5]GOODE, J. A. et al. **Langmuir,** v. 31, p. 6267-6276, 2015.
[6]CALAÇA, G. N. et al. **Electrochimica Acta,** v. 249, p. 104-112, 2017.
[7]VELOSO et al. **Analytical Chemistry,** v. 86, p. 4901-4909, 2014.
[8]LIMA, D. et al. **Biosensors and Bioelectronics,** v. 133, p. 86-93, 2019.