DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR IMPEDANCIOMÉTRICO PARA A DETECÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS

Karla Mayara Correa Arias (PIBIC/UEPG), Drª Karen Wohnrath (Orientadora), Cristiane. A. Erdmann (Coorientadora)
e-mail: karen.woh@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Exatas e Naturais

Química, Eletroquímica
Palavras-chave: Imunossensor, Doença de Chagas, Técnica LbL, Nanopartícula de ouro.

Resumo
Um imunossensor é um dispositivo baseado em uma reação imunológica, entre o antígeno e o anticorpo. Uma das técnicas de se obter um dispositivo imunossensor é por meio da técnica layer-by-layer (LbL), um método de fabricação de filmes finos baseado em interações eletrostáticas de moléculas com cargas opostas. Neste presente trabalho utilizou-se a técnica LbL para a formação de uma plataforma para a incorporação de antígenos obtendo um imunossensor eletroquímico para o diagnóstico da doença de chagas. Sob substratos de ITO um filme LbL foi formado pela deposição alternada de nanopartículas de ouro estabilizadas em silano (SiAuNPs) e em citrato de sódio (Cit. Na próxima etapa, fez-se a incubação dos antígenos da doença de chagas, posteriormente a incubação de BSA1%, formando o Imunossensor. Finalmente o Imunossensor eletroquímico foi incubado nas amostras de controle positivo ou em amostra de controle negativo. Foi realizado a triagem das melhores condições de tempo de incubação e temperatura para as etapas de formação do Imunossensor, os fatores estudados foram o tempo de incubação nas amostras de AG, BSA e AB assim como a temperatura da imunorreação AG-AB.

Introdução
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas com o parasita *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)* causador da doença de chagas. É encontrada principalmente na América Latina, mas está presente em todo o mundo.[1] A suspeita clínica de doença de chagas torna necessário recorrer à confirmação diagnóstica da doença e atualmente dois testes sorológicos, onde os mesmos demandam uma grande infraestrutura como laboratórios equipados, e pessoal qualificado[2]. Com base nesses fatos faz-se necessário a elaboração de testes de diagnósticos que atendam essas demandas, como alta seletividade, baixo custo, de fácil uso e que apresentem portabilidade[3]. Atualmente os sensores eletroquímicos mais especificamente os biossensores estão sendo amplamente estudados como ferramentas promissoras nesse campo de diagnósticos de doenças infecciosas humanas[3]. Sendo assim biossensores são dispositivos nos quais um material de origem biológica, como uma enzima, organela, antígeno ou anticorpo, entre outros, são imobilizados na superfície de um transdutor.[3] O transdutor pode ser um material elétrico que transforma a interação biológica entre a substância a ser determinada e a imobilizada sob a superfície, produzindo assim uma resposta que pode ser exibida eletronicamente e mensurada.[3-4] Quando há um antígeno ou um anticorpo imobilizado na superfície do

transdutor, tem-se um imunossensor.[4] Uma das técnicas que vem sendo amplamente empregada na fabricação de imunossensores é a técnica *layer-by-layer* (LbL).[5] A técnica LbL se baseia na interação de polieletrólitos, de cargas iônicas opostas, que são depositadas sobre um substrato sólido.[5] Sendo assim o projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico para o diagnóstico rápido da doença de Chagas.

Materiais e Métodos

Fabricação de Imunossensores em ITO.

A modificação do ITO (vidro condutor de óxido de estanho dopado com índio) começa com adição do filme LbL, como a conformação: $(AuNPs\text{-}SiPy^{+}/Cit)_4$, onde o policátion foi a solução de cloreto de 3 npropilpiridínio silsesquioxano com nanopartículas de ouro ($SiPy^{+}AuNPs$) e o poliânion foi a solução de citrato de sódio (Cit), que foram preparados sobre substratos de ITO (óxido de estanho dopado com índio). Na sequência o filme LbL foi imerso em uma solução de 100 mM de cloreto de N-3(dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) para que um intermediário seja formado na superfície do filme possibilitando a incorporação do antígeno (AG) via ligações amida. Esta ligação é prevista pois os grupos carboxílicos presente no Cit podem estar expostos na superfície do filme, podendo ser ativados pela ligação com EDC/NHS. Na etapa seguinte o filme LbL foi incubado em uma suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes antigênicos do *T.cruzi* (AG) durante 30 min formando então o filme $ITO/(SiPy^{+}AuNPs\text{-}Cit)_6$/ EDCNHS/ AG. Posteriormente este filme foi imerso em solução tampão PBS pH 7,0, por 10 s para retirar as biomoléculas em excesso no filme. Após, o filme foi incubado em uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 1% por 30 min. Esta etapa é necessário para que a BSA bloquei as ligações que não são referentes ao antígeno, formando então o filme $ITO/(SiPy^{+}AuNPsCit)_6$// EDCNHS AG/BSA. Finalmente o eletrodo modificado foi imerso nas amostras de controle positivo, AB (contém o Anti-*T cruzi*) ou em amostra de controle negativo, CN (sem Anti-*T cruzi*) por 30 min. Todas as etapas de modificação foram monitoradas e caracterizadas por meio da técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametrica cíclica (VC), contendo a molécula sonda $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 5 mM. Como a primeira plataforma não gerou bons resultados testou-se outra plataforma, sendo que esta possui a mesma composição dos híbridos do filme LbL no entanto esta conformação sofreu uma única modificação, onde as $AuNPs\text{-}SiPy^{+}$ ficariam expostas na parte externa do filme para que a imobilização do AG ocorresse com mais eficácia. A nova conformação do filme deu-se como: $ITO/(AuNPs\text{-}SiPy^{+}\text{-}Cit)_6/AuNPs\text{-}SiPy^{+}$. A nossa proposta é que com esta nova configuração o AG pode ligar-se ao filme LbL via interação direta com a AuNPs, sem a utilização de EDC/NHS.

Otimização da construção do imunossensor usando o planejamento fatorial.

O planejamento fatorial foi utilizado para otimizar o processo de preparação do imunossensor eletroquímico, devido à possibilidade de avaliação de diferentes fatores ao mesmo tempo. Neste projeto, os fatores que foram avaliados foram o tempo de incubação na amostra de antígeno, tempo de incubação na solução de BSA 1%, tempo de incubação na solução de anticorpo e temperatura de imunorreação. Todo o imunoensaio foi feito seguido por espectroscopia de impedância (EIE) e a mudança no valor de resistência e transferência de carga (Rct) entre as medidas BSA e a interação do anticorpo foram avaliadas. Em cada experimento foi utilizada como resposta os valores de ΔRct (ΔRct = (Rctf-Rcti) /

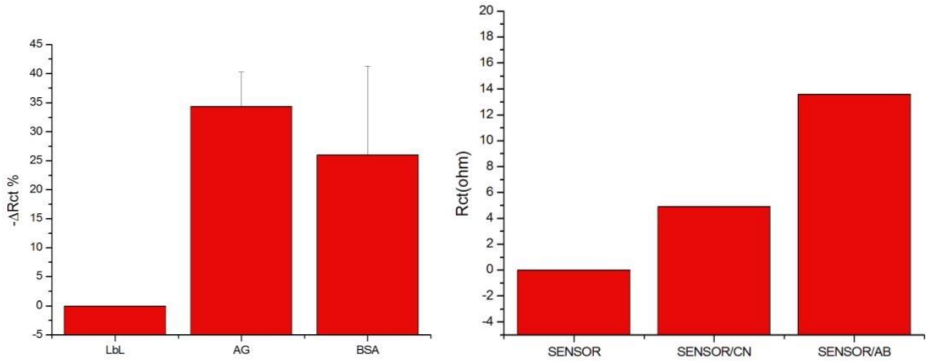
Rcti * 100, onde Rcti é o valor de Rct após o BSA e Rctf é o valor de Rct após a incubação na amostra de anticorpo. Foram necessários oito experimentos (2^{4-1}) mais a triplicata no ponto central, sendo então 11 experimentos.

Resultados e Discussão

Fabricação de Imunossensores em ITO

A primeira plataforma testada foi um filme LbL em que o citrato de sódio ficou exposto para que os grupos carboxílicos realizando a ativadção destes grupos com EDC/NHS. Observou-se primeiramente que a resistência à transferência de carga (Rct) diminui quando o filme LbL $(SiPy^{+}AuNPs\text{-}Cit)_6$ é formado sobre o ITO (de 1034,48 ohm para 92,3 ohm, respectivamente). Isto ocorre devido à presença do $SiPy^{+}AuNPs$ sobre o ITO. Embora o $SiPy^{+}$ possua características de material isolante ele contém em sua rede as AuNPs as quais intensificam a transferência de carga entre o eletrodo e o eletrólito, e além disso, este polímero inorgânico pode interagir com $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ via reação de troca iônica adsorvendo moléculas de ferro ao filme LbL, o que pode auxiliar na transferência de carga.

A adição do AG sobre o filme LbL ITO/$(SiPy^{+}AuNPs\text{-}Cit)_6$ não acarretou numa significativa variação da Rct (de 97+/-1.4 ohm para 92+/-10 ohm, com AG), indicando que a interação entre o AG e o filme LbL pode ter sido fraca, inviabilizando a ligação do mesmo sobre o filme LbL. A incubação na solução de BSA apresentou um aumento da Rct (141 +/- 88 ohm), pois a BSA é uma molécula isolante que bloqueia a transferência de carga entre o eletrodo e a solução aumentando os valores de Rct. A incubação do filme ITO/$(SiPy^{+}AuNPs\text{-}Cit)_6$/AG/BSA no AB e CN acarretou no aumento da Rct (191+/-113 e 161+/- 82 ohm, respectivamente) de forma tal que não se pode diferenciar tais amostras, o que possivelmente ocorreu pela ausência do AG no filme, todos os estudos foram realizados em triplicata. Como a plataforma anterior não apresentou seletividade nas amostras testadas preparou-se uma segunda plataforma onde as AuNPs ficariam expostas na parte externa do filme. Fez-se a caracterização de cada etapa da modificação do sensor. Como ilustrado na Figura 3a, observa-se que com a adição do AG no filme LbL acarreta na diminuição de Rct (35%+/- 5), indicando que o AG foi absorvido na superfície do filme. Após a adição do BSA a variação foi de (26%+/-15). Com a incubação do ITO/$(SiPy^{+}AuNPs\text{-}Cit)_8$/$SiPy^{+}AuNPs$ na solução contendo o AB e no CN pode ser diferenciada pelo aumento do Rct, de forma que após a incubação no AB (Figura 3b) houve um aumento da resistência de transferência de carga (13,9%) e pouca variação foi encontrada na presença de CN (4,9%), indicando a seletividade do eletrodo proposto.



(a) (b)

Figura: Histogramas para a resposta de Rct para o sensor: **(a)** ITO/(SiPy+AuNPs-Cit)8/SiPy+AuNPs, com o antígeno; ITO/(SiPy+AuNPs-Cit)8/SiPy+AuNPs /AG, com o BSA: ITO/(SiPy+AuNPs-Cit)8/SiPy+AuNPs /AG/BSA; **(b)** incubado no controle positivo (ITO/(SiPy+AuNPs-Cit)8/SiPy+AuNPs /AG/BSA /AB) e incubado no controle negativo (ITO/(SiPy+AuNPs-Cit)8/SiPy+AuNPs /AG/BSA/CN).

Otimização da construção do imunossensor usando o planejamento fatorial.

Os resultados do planejamento fatorial, com 95% de confiança, mostram que o tempo de incubação nas amostra AG, na amostra BSA e na amostra AB têm influência nos valores de ΔRct, portanto o tempo otimizado é de 30 min na amostra AG, 10 min na amostra BSA E 30 min na amostra AB. A temperatura de imunorreação não tem influência na resposta do imunossensor, porém a interação dos fatores 1 e 4 (tempo na amostra AG e temperatura) tem influência nos valores de ΔRct. Portanto, as condições otimizadas para cada etapa da preparação do sensor sob a plataforma LbL foram: nível -1 ao tempo de incubação na amostra de antígeno (30 minutos), -1 a BSA1% de incubação no tempo (10 minutos), +1 ao tempo de incubação da amostra de anticorpos (30 minutos) e +1 à temperatura de imunoreação (37ºC).

Conclusões

Com os estudos realizados, pode-se concluir que a melhor plataforma do filme LbL foi SiPy+AuNPs-Cit)$_4$SiPy+AuNPs, pois com esta plataforma houve resposta no sensor eletroquímico, onde houve a diminuição da resistência e transferência de carga de 35% com a adição do AG sob o filme LbL, sendo então um indicio de que houve absorção de AG no filme. E quando houve a incubação o no AB houve um aumento no RcT de 13,9% e pouca variação foi encontrada na presença de CN que foi de 4,9%, e essas variações indicam a seletividade do eletrodo proposto.

E com o estudo do planejamento fatorial, foi possível concluir com 95% de confiança, que a otimização nos fatores variáveis sob o filme LbL na plataforma SiPy+AuNPs-Cit)$_4$SiPy+AuNPs foram: no nível -1 ao tempo de incubação na amostra de antígeno em 30 minutos, -1 a BSA1% de incubação no tempo de 10 minutos, +1 ao tempo de incubação da amostra de anticorpos de 30 minutos e +1 à temperatura de imunoreação á 37ºC.

Agradecimentos

UEPG pela bolsa cedida e pela oportunidade e ao grupo GDEM

Referências

1- **World Health Organization**, Chagas Disease (American trypanosomiasis). Fact sheet. Updated March. 2017. Disponível em: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs/340/en Acesso em: 11/08/17 15:00.

2- ERDEMANN, Cristiane Andreia. **Desenvolvimento de sensores bioeletroquimicos para o diagnostico de doenças infecciosas humanas.** 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2013.

3- SARMA, Anil Kumar et al. Recent advances in material science for developing enzyme electrodes. **Biosensors And Bioelectronics,** India, v. 24, n., p.2313-2322, out. 2009.

4- YAMANAKA, Hideko; COSTA, Paulo Inácio da; RICCARDI, Carla dos Santos. IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO. **Química Nova,** Araraquara-sp, v. 25, n. 2, p.316-320, out. 2002.

5- CRESPILHO, Frank N.; IOST, Rodrigo M. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors And Bioelectronics,** São Paulo, v. 31, n. 1, p.1-10, out. 2012.