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

Karla Mayara Correa Arias (PIBIC/CNPq), Karen Wohnrath (Orientador), e-mail: karlamayaracorrea@gmail.com e-mail do orientador: Karen.wohn@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Ciências Exatas e Humanas.

Química, Eletroquímica
Palavras-chave: Nanopartícula de Ouro, Azul da Prússia, Imunossensor, Anti-T cruzi.

Resumo
Os imunossensores vem se apresentando como uma ferramenta promissora na detecção de doenças infecciosas humanas, tal como a doença de chagas. Neste presente trabalho obteve-se um filme layer-by-layer (LbL) sobre ITO modificado com deposições alternadas de nanopartículas de ouro estabilizadas em silano (SiAuNPs) e azul da prússia (PB). Sobre esta plataforma fez-se a incubação dos antígenos do *Tripanossoma cruzi* (*T cruzi*), responsável pela doença de chagas. Sobre este sensor foi incubada amostra de controle positivo constituída do anticorpo Anti-T cruzi ou em amostra de controle negativo, que não contem o Anti-T cruzi. Todas as etapas de modificação foram monitoradas e caracterizadas por meio da técnica de voltametria de onda quadrada.

Introdução
Os biossensores são amplamente utilizados como ferramentas no campo de diagnósticos de doenças humanas, pois são baseados em instrumentação simples, de análises rápidas e precisas, sendo dispositivos portáteis e de fácil uso.[1-2] O transdutor, um constituinte do biossensor, é um material elétrico que “percebe” uma interação biológica entre a substância a ser determinada, produzindo assim uma resposta de uma forma que pode ser exibida eletronicamente. Quando há um antígeno ou um anticorpo imobilizado na superfície do transdutor, tem-se um imunossensor.[2] As nanopartículas de ouro (AuNPs) são materiais que se destacam no desenvolvimento de imunossensores, pois apresentam boa compatibilidade com as biomoléculas.[1,3] Várias são as técnicas para a obtenção de biossensores formados com AuNps, dentre estas tem-se a técnica de automontagem Layer-by-Layer (LbL), que basicamente consiste na imersão alternada de um substrato em soluções catiônicas e aniônicas.[4]

O emprego de complexos inorgânicos em dispositivos como mediadores eletroquímicos como o hexacianoferrato férrico, conhecido como Azul da Prússia (*Prussian Blue,* PB) é explorado como um mediador de transferência de elétrons para aplicações analíticas em biossensores.[5] Neste contexto, este projeto tem como objetivo desenvolver um imunossensor eletroquímico para a detecção de anticorpos do *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzy*) para o diagnóstico precoce da Doença de Chagas, utilizando o PB como mediador de transferência de elétrons.

Materiais e Métodos
Síntese de nanopartícula de ouro estabilizadas em silsesquioxano (SiAuNPs)

A obtenção da nanopartícula de ouro (AuNPs) suspensa no polímero inorgânico cloreto de 3-n-propilpiridínio silsesquioxano (Si) se deu pela redução química do sal de ouro, com o borohidreto de sódio (NaBH4) como agente redutor. A síntese foi mantida sob agitação e banho de gelo por 3 h, realizada como descrito na literatura[6].

Síntese de nanopartícula de Azul da Prússia

As nanopartículas PB também foram realizadasobtidas como descrito na literatura[6], onde foi sintetizada pela mistura de 5 mL de solução aquosa de potássio ferricianeto (5 mmol/L) e 5 mL de cloreto férrico (1mmol/L) sob agitação e a 22ºC.

Construção e caracterização de filmes finos obtidos pela técnica LBL

Utilizou-se o nanohíbrido SiAuNPs como polieletrólito catiônico e as nanopartículas PB como polieletrólito aniônico a fim de obter uma plataforma de sequência (SiAuNPs/PB)n, onde n= número de camadas dos polieletrólitos. Essa plataforma já empregada na literatura para a detecção de H_2O_2[6]. Utilizou-se como substrato o ITO (vidro recoberto de óxido de estanho dopado com índio), onde o mesmo foi imerso na solução catiônica de SiAuNPs por 5 min, posteriormente em água destilada, por 30 s, esse processo ocorre para retirar as moléculas indesejadas presentes no filme, então o mesmo foi submetido a um soprador térmico para secá-los. Após imergiu-se este substrato na solução aniônica de PB por 5 min, e em água por 30 segundos, e finalmente seco. Esse processo foi repetido por n vezes. Como foi observado que houve lixiviação do material na plataforma $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$ adicionou-se uma camada de 5µL de Nafion® 5% e levado a estufa com temperatura de 50 ºC para secar, obtendo-se então a plataforma $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$Nafion®. Os filmes $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$ e $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$Nafion® foram caracterizados pela técnica de voltametria de onda quadrada (VOQ) em uma solução contendo [Fe(CN)6] 3-/4- 5 mM, como uma molécula sonda, em PBS pH 7,0.

Preparação do Imunoensaio sobre $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$Nafion®

O filme LbL $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$ foi incubado em uma suspensão de hemácias sensibilizadas com componentes antigênicos do *T.cruzi* (AG) durante 30 min formando a conformação ITO/$(SiAuNPs\text{-}PB)_4$/AG. Posteriormente esse filme foi imerso em solução tampão PBS com pH 7,0, por 10 s para retirar as biomoléculas em excesso no filme. Após, foi incubado em uma solução de albumina de soro bovino (BSA) 1% por 10 min. Esta etapa é necessária para que a BSA bloquei as ligações que não são referentes ao antígeno, formando então o filme ITO/$(SiAuNPs\text{-}PB)_4$/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 o AB do Anti-T cruzi) por 30 min. Repetiu-se esse estudo também para a plataforma $(SiAuNPS\text{-}PB)_4$Nafion®. Todas as etapas de modificação foram monitoradas e caracterizadas por meio da técnica VOQ em uma solução contendo [Fe(CN)6] 3-/4- 5 mM, como uma molécula sonda, em PBS pH 7,0

Resultados e Discussão

A caracterização dos filmes ITO/(SiAuNPs-PB)n por VOQ indicou que o aumento no número de bicamadas acarretou no aumento na corrente de pico (R=50,7µA), devido ao processo de redução eletroquímica do PB imobilizado na superfície do eletrodo (figura 1(a)). Desta forma, é dispensado o uso da sonda eletroquímica nas medidas eletroquímicas. Este resultado indica que a cada bicamada há uma maior quantidade de PB, e consequentemente de SiPyAu imobilizado na superfície de ITO.

Nos imunoensaios realizados com os filmes ITO/(SiPyAu-PB)n (n= 4 e 6 bicamadas), observou-se que a incorporação do antígeno sob o filme LbL acarretou

numa diminuição de -30,9% e -73,21% nos valores de corrente de pico, respectivamente (Figura 1(b) e (c). Isto ocorre, pois, a molécula de AG não é eletroativa a atua como uma barreira na superfície do eletrodo impedindo a transferência de carga entre o eletrodo e o eletrólito, diminuindo assim os valores de corrente de pico. Embora a diminuição fosse mais acentuada no filme com 6 bicamadas, escolheu-se o filme com n = 4, ITO/(SiAuNPs-PB)$_4$, porque esse apresentou melhores respostas frente as amostras de controle positivo e negativo. Ou seja, a diminuição foi de 70,4 e -15,67% para o CP e CN, respectivamente. A incorporação do BSA na superfície do eletrodo, acarretou em uma diminuição da corrente de pico em -58,30%.

Na etapa seguinte foi analisada a estabilidade do filme ITO/(SiAuNPs-PB)$_4$ em solução tampão PBS para averiguar se há lixiviação de SiPyAuNps e PB da superfície do filme durante a incubação das biomoléculas. Para isso, um filme ITO/(SiAuNPs-PB)$_4$ foi incubado em AG e outro em PBS, e observou-se uma variação da corrente de -70% e -51.85%, respectivamente. Mesmo levando em conta a lixiviação dos polieletrólitos nesse filme, realizou-se o estudo com o controle positivo AB, *T. cruzy*, e negativo. Observou-se pouca variação da corrente de pico (-15,67%) para o controle negativo e maior variação no controle positivo (-70,4%). Esses resultados indicam que o sensor ITO/(SiPyAu-PB)$_4$/AG foi capaz de responder apenas para as amostras de controle positivo da doença, indicando uma possível seletividade para o sensor proposto. Foram realizados ensaios em triplicata para o filme com 4 bicamadas, a fim de constatar a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Nota-se, a incubação nos controles negativos acarreta em menores valores de ΔI (-3,52%), e em controle positivo em maiores (-51,36%), porém o erro relativo ainda é grande, impedindo a diferenciação destas etapas Figura 1(d) e (e). Neste sentido, maiores esforços devem ser empregados para a otimização desta plataforma, minimizando interações secundárias e a lixiviação do PB da superfície do eletrodo.

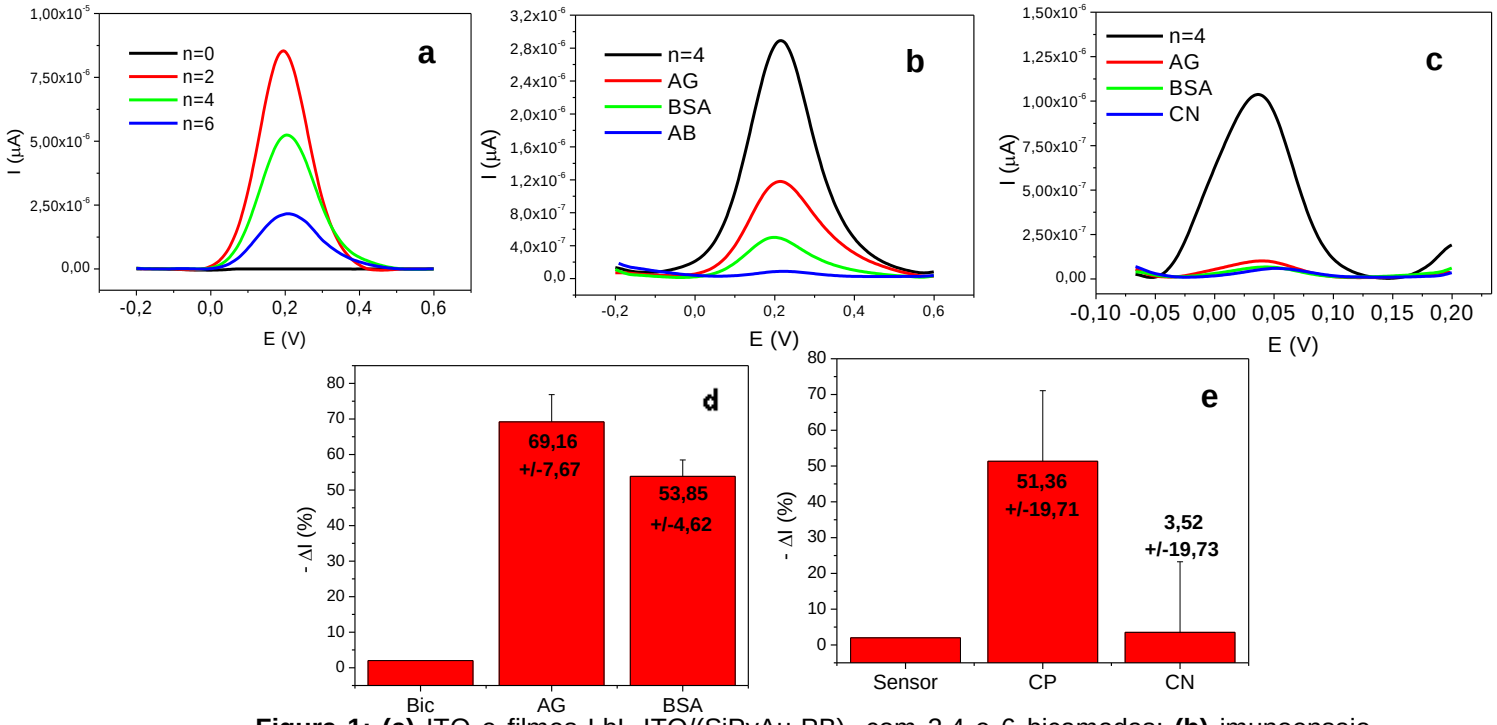


Figura 1: (a) ITO e filmes LbL ITO/(SiPyAu-PB)$_n$ com 2,4 e 6 bicamadas; **(b)** imunoensaio com filmes LbL ITO/(SiPyAu-PB)$_4$ na presença de AG, BSA e no controle positivo (AB *T. cruzy*); **(c)** imunoensaio com filmes ITO/(SiPyAu-PB)$_4$ na presença de AG, BSA e no controle negativo (sem AB

T. cruzy); **(d)** Histograma de ΔI para as etapas do sensor; **(e)** Histograma de ΔI para o imunoensaio para plataformas de filmes LbL $(SiAuNPs\text{-}PB)_4$

Como foi observado a lixiviação do PB no filme LbL ITO/$(SiAuNPs\text{-}PB)_4$ durante o processo, procurou-se minimizá-la com a adição de Nafion® sobre a superfície do filme. Notou-se que o valor da corrente de pico entre o controle positivo e negativo, é de ΔI para o CP (-35,17%) e para o CN (-24,1%). No entanto há um alto erro relativo, estes que podem ser minimizados com estudos de otimização das etapas de preparação e imunoensaios.

Conclusões

Conclui-se que nos estudos da variação do número de bicamadas houve uma relação linear entre o aumento da corrente de pico com n. Esse aumento ocorreu devido ao processo de redução eletroquímica do PB, dispensado assim o uso de par redox no eletrodo. Nos estudos de imunoensaios realizados com os filmes de 4 e 6 bicamadas, observou-se que há uma diminuição nos valores de corrente de pico após a incubação das moléculas de AG, pois esta biomolécula atua como uma barreira na superfície do eletrodo impedindo a transferência de carga entre o eletrodo e o eletrólito, diminuindo assim os valores de corrente de pico. O filme com 4 bicamadas apresentou melhores respostas frente as amostras de controle positivo e negativo. Esse imunossensor proposto foi capaz de responder para as amostras de controle positivo da Doença de Chagas e o mesmo não respondeu para as amostras de controle negativo, indicando uma possível seletividade para o sensor proposto. No entanto é uma plataforma pouco estável, uma vez que apresentou perda de material durante os ensaios. Com a incorporação do Nafion® na superfície do filme LbL, houve novamente uma diminuição intensa nos valores de ΔI para o CP mas novas etapas experimentais serão necessárias para a otimização da preparação dos imunoensaios.

Agradecimentos

Ao CNPQ pela bolsa, ao grupo GDEM e ao CLAMU-UEPG.

Referências

1-ERDMANN, C.A. Desenvolvimento de sensores bioeletroquimicos para o diagnostico de doenças infecciosas humanas. 2013. 76 f. Dissertação- Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2013.

2- YAMANAKA, H.; COSTA, P.I.; RICCARDI, C.S. Imunossensor Amperométrico. Química Nova, 25, p.316-320, 2002

3- OU C. YUAN R.; CHAI Y.; TANG M.; CHAI R.; HE X. A novel amperometric immunosensor based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles-multi-wallad carbon nanotubes-tionine multilayer films on polyelectrolyte surface. Analytica Chimica Acta, 603, p.205-213, 2007.

4- POPIOLSKI, T.M. Avaliação da Incorporação de Nanopartículas de Ouro em Filmes Automontados de Polieletrólitos Fracos. 2011. 88 f. Tese - Universidade Federal de Caxias do Sul, p. 4-23, 2011.

5- CHEN, S. et al. A new antibody immobilization technique based on organic polymers protected Prussian blue nanoparticles and gold colloidal nanoparticles for amperometric immunosensors. Sensors And Actuators B: Chemical, China, v. 135, n. , p.236-244, ago. 2008

6- CALAÇA, G.N. et al. Layer-by-Layer AuNPs-SiPy+ /Prussian blue nanoparticles modified electrodes: characterization and electrocatalytic effects. Electrochimica Acta, v. 249, p.104-112, 2017.