

PLATAFORMA SENSORA PARA DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR DE FIBRA DE CARBONO EM FORMA DE SWAB

Ana Karolina de Almeida Lucas ¹
Victor Macedo Bezerra ²
Renata Miranda Gomes ³
Ricardo Ataíde de Lima ⁴

INTRODUÇÃO

Como o diagnóstico de algumas doenças de cunho maligno ocorre de modo tardio, e a acessibilidade dos exames é limitada ao custo, a proposta da utilização e aplicação de biossensores têm sido bastante estudada, com o desenvolvimento de dispositivos que utilizam um sistema de identificação do analito-alvo, que dispensa a preparação de amostras e métodos laboratoriais de provas bioquímicas tradicionais, através de um reconhecimento biológico (sensor) e um eletrônico (transdutor). Havendo, de modo quantitativo e/ou qualitativo, um acoplamento íntimo entre estes dois componentes (BHALLA *et al.*, 2016).

Há três componentes principais no corpo do biossensor, por meio dos quais o processo de reconhecimento das espécies químicas ou biológicas ocorre em tempo real, com o mínimo de intervenção humana, de forma sinérgica, rápida e eficaz (KAVITA, 2017). Assim, composto pelo receptor que podem ser anticorpos, ácidos nucleicos, enzimas ou células inteiras integradas ao transdutor, por intermédio de imobilização por adsorção, ligação covalente ou reticulação. O transdutor se comporta como uma interface, que perfaz a leitura do sinal biológico de acordo com o parâmetro de medição, ou seja, afere a mudança química ou física durante a resposta com o biorreceptor, convertendo o sinal em elétrico (eletroquímico) ou em um sinal de outra natureza, como os do tipo piezoelétrico, amperométrico, térmico ou óptico.

¹ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Sistemas da Escola Politécnica de Pernambuco/Universidade de Pernambuco – Poli/UPE, akal@poli.br;

² Mestrando do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Sistemas da Escola Politécnica de Pernambuco/Universidade de Pernambuco – Poli/UPE, vmb@poli.br;

³ Mestranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Sistemas da Escola Politécnica de Pernambuco/Universidade de Pernambuco – Poli/UPE, renata_mg12@yahoo.com.br;

⁴ Professor orientador: Doutor em Engenharia Elétrica pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica – PPGEE/UFPE, ricardo.lima@poli.br.

Já o processador ou unidade processadora, filtra, expande e analisa o sinal transduzido, transferindo-o para um monitor ou outro dispositivo (CALIL *et al.*, 2011).

Um tipo de biossensor muito estudado, o imunossensor, funciona de modo que o sinal elétrico gerado por meio da imobilização de anticorpos na superfície transdutora, derive da interação e acoplamento antígeno-anticorpo no início do processo (AZAM *et al.*, 2014), assim o anticorpo se liga as toxinas ou especificamente ao patógeno causador da doença, devido a sua alta afinidade pelo antígeno correspondente (MEHROTRA, 2016).

Atualmente, o emprego de biossensores no âmbito da saúde se mostra necessário, com resultados estáveis no que diz respeito à aplicação de tecnologias de uso mais eficaz, menos invasivas, com tempo de trabalho otimizado em comparação as utilizadas tradicionalmente, visto que possuem maior sensibilidade e afinidade, bem como sua construção a base de nanomateriais e polímeros mais sofisticados, com o intuito de se obter melhor feedback sensor.

O objetivo deste trabalho é construir e caracterizar uma plataforma sensora de feltro de fibra de carbono (FC) modificada com quitosana e nanotubos de carbono para desenvolvimento de um imunossensor na forma de *swab*, baseado na reação antígeno-anticorpo e transdução eletroquímica. Os materiais foram escolhidos e testados com o propósito de aumentar o desempenho da condução do sinal elétrico, de modo a tornar a plataforma viável para o auxílio no diagnóstico de doenças como o câncer.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Para a construção dos eletrodos de fibra de carbono (CFE) *swab*, utiliza-se os seguintes materiais: feltro de fibras de carbono; haste de plástico; conector elétrico Níquel-Cromo; fio de aço; resina composta microhíbrida 3M ESPE Z100® e fotopolimerizador Biolux Standard BIOART®. Os nanotubos de carbono (NTC) funcionalizados com grupos aminados (NTC-NH₂) foram adquiridos da (1/DropSens®). A Quitosana (CHIT) foi adquirida da Sigma-Aldrich®. Já o Dimetilsufóxido (DMSO) foi obtido da ISO FAR®. As soluções de ácido acético (CH₃COOH_(s)) foram preparadas em laboratório.

Métodos

Os testes eletroquímicos foram realizados em um sistema trieletródico contendo um eletrodo auxiliar (EA) helicoidal de platina, um eletrodo de referência (ER) de Ag/AgCl (sat. KCl) e um eletrodo de trabalho de feltro de fibra de carbono (CF), em uma célula de vidro fechada, conectados a um potenciostato/galvanostato μ AUTOLABIII® (*Compact Design*) acoplado a um microcomputador e controlado pelo *software Autolab NOVA 2.0*. Testes de Voltametria Cíclica (VC) foram aplicados, com os potenciais de -0,6 a 1 V, para acompanhar cada etapa de modificação da superfície do eletrodo de trabalho. As medições de voltametria são efetuadas em duas concentrações de solução: uma de KCl (1 mmol L^{-1} e 5 mmol L^{-1}) e 5 mmol L^{-1} de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) como sonda redox.

DESENVOLVIMENTO

Os CFE's foram construídos como eletrodos de trabalho com o feltro de fibra de carbono, no formato de *swab*, com função similar ao empregado em coletas de amostras clínicas, a fim de suportar e contribuir para a formação de filme polimérico e imobilização da proteína estudada.

O ácido acético foi utilizado para a limpeza e tratamento do feltro de fibras de carbono, de maneira que, em um Becker, ferveu-se 100 ml do ácido e logo após o início da fervura, colocou-se o feltro de fibras de carbono, deixando-o durante 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida imergiu-se a CF em 50 ml de acetona em temperatura ambiente, durante 20 segundos. Retirou-se, então, o material deixando-o descansar por 24 horas, em temperatura ambiente, em uma placa Petri. No passo seguinte, foi utilizado 0,002g de CHIT diluído em 1ml de solução de ácido acético (2%), solução de a.a. composta por 20 ml de ácido acético (a.a.) + 80 ml H_2O de uma solução previamente preparada (20%). Colocou-se no agitador, durante 30 minutos e após, diluiu-se a concentração de 0,002g de NTC-NH₂ em 1ml de DMSO e 0,002g de NTC-NH₂ em a.a. (1%), permanecendo no sonicador durante 2 horas, obtendo-se então duas soluções de nanotubos.

Sobre a superfície do CFE previamente limpo, utilizou-se por meio da técnica de *dip coating*, método o qual foi efetuada a imersão de 300 μ L de 0,001 g NTC-NH₂ e 300 μ L 0,001g de CHIT em ácido acético. O eletrodo permaneceu na estufa a 50°C, durante 1 hora, deixando-o esfriar à temperatura ambiente. Este processo foi executado em cada etapa de imersão de CHIT e NTC-NH₂ em a.a., para cada triplicata de eletrodos.

Procedeu-se a VC para cada etapa de imersão citada anteriormente, o que mostra diferentes voltamogramas, de acordo com os testes realizados no *software*, ou seja, testes de velocidade padrão, velocidade de varredura e estabilidade.

A escolha da CHIT, apesar de sua resistividade, foi baseada em sua biocompatibilidade e propriedades como biopolímero que dispõe de hidrofília, estabilidade e capacidade de modificação química, além de sua solubilidade, viscosidade, multiadesividade e porosidade do material que aumenta a área de superfície dos sensores, amplificando o grau de resposta do sinal (JIANG *et al.*, 2019). Os grupos amino permitem ligações químicas covalentes em biomoléculas (KOEV *et al.*, 2010), bem como uma alta permeabilidade e força mecânica, que facilitam a formação do filme e por conseguinte, a etapa de imobilização (CAVALCANTI *et al.*, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Posteriormente a todas as etapas de imersão, por meio do uso de CHIT e NTC's, foi formado um filme polimérico de cor esbranquiçada, o qual após voltametria cíclica, análise e interpretação dos dados, percebeu-se evolução e aumento nas diferenças de medida de corrente, durante a leitura do eletrodo “limpo” e “modificado”, submetidos aos mesmos parâmetros no *software* empregado. As leituras variaram em uma área de aproximadamente 5,80 V/mA (limpo) para 90,45 V/mA (modificado), sem picos perceptíveis, em KCl, e área de 735,12 V/mA (limpo) para 1334,82 (modificado) em sonda redox.

Com o intuito de observar a diferença da porcentagem de adsorção e difusão das moléculas no filme de CHIT em KCl, no estudo de velocidade de varredura de 10mV/s a 150mV/s, com imersão de 0,02 mg NTC-NH₂ em 1mg/ml de a.a., o eletrodo modificado foi submetido a ciclos de velocidade crescente com área de aproximadamente 51,02 V/mA e

variação em torno de 33% no pico anódico e 16% no pico catódico. Já na leitura em sonda redox, com área de 548,71 V/mA, houve uma diferença de 20% no processo de oxidação e 19% na redução, ou seja, o filme demonstrou estar adsorvendo em maior quantidade, talvez devido a ação da CHIT ou bolhas de ar que porventura possam ter surgido.

Acerca do teste de estabilidade, o qual aplicou-se 30 ciclos sucessivos com velocidade invariável, foi possível verificar o quanto o sinal elétrico variou na superfície sensora. A diferença no eletrodo limpo de 130,61 V/mA para 2800,70 V/mA no modificado, com variação obtida de 0,54%, para este, confirma o aumento da corrente gerada.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Observou-se no trabalho aumento da resposta analítica da superfície sensora do eletrodo, devido ao arranjo das fibras de carbono de forma cilíndrica e ranhuras que colaboram para a formação do filme polimérico, assim como a composição da quitosana, com seus grupos amino, e a estrutura multilaminada dos nanotubos de carbono aminados.

O eletrodo mostrou-se eficiente e promissor, com relação ao *design* e estrutura de *swab*, com intenção de aplicação como imunossensor. Pretende-se, corrigir a questão da adsorção do filme nas próximas etapas e proceder a imobilização do componente biológico de escolha, para fins de reconhecimento.

Palavras-chave: Biossensor, Imunossensor, Fibra de carbono, Quitosana, Nanomateriais.

REFERÊNCIAS

AZAM, S.; RAHMAN, R. T.; LOU, Z. et al. Review: Advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants. **Nusantara Bioscience**, v. 6, n. 2, p. 186–195, 2014.

BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N. et al. Introduction to biosensors, **Essays in Biochemistry**, v. 60, p. 1–8, 2016.

CALIL, S. S.; SILVA, P. R. Q. DA Biossensores : estrutura, funcionamento e aplicabilidade. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, p. 1–20, 2011.

CAVALCANTI, I. T.; SILVA, B. V. M.; PERESA, N. G. et al. A disposable chitosan-modified carbon fiber electrode for dengue virus envelope protein detection. **Talanta**, v. 91, p. 41–46, 2012.

JIANG, Y.; WU, J. Recent development in chitosan nanocomposites for surface-based biosensor applications. **Electrophoresis**, p. 1–21, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/15222683>>. Acesso em: 17/06/19.

KAVITA, V. DNA Biosensors-A Review, **Journal of Bioengineering & Biomedical Science**, v. 7, p. 2, 2017.

KOEV, S. T; DYKSTRA, P. H.; LUO, X. et al. Chitosan: an integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices. **The Royal Society of Chemistry**, v. 10, p. 3026–3042, 2010. Disponível em: <www.rsc.org/loc> Acesso em: 17/06/19.

MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, 2016.