

PLATAFORMA BIOSSENSORA ELETROQUÍMICA BASEADA EM ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO POR PONTOS QUÂNTICOS

Jéssika F. F. Ribeiro^{1*}, José Rodrigo S. Melo², Karla B. O. Silva², Beate S. Santos³, Giovannia A. L. Pereira², Rosa F. Dutra⁴, Rogério T. Ribeiro³, Lêda C. da Silva⁵, Adriana Fontes¹

¹Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE; ²Departamento de Química Fundamental, UFPE; ³Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE; ⁴Departamento Engenharia Biomédica, UFPE; ⁵Campus Mata Norte, UPE, Nazaré da Mata.
*jessikafernandaferreira@gmail.com

INTRODUÇÃO

Com os recentes avanços da nanotecnologia, as nanopartículas metálicas e semicondutoras têm despertado um grande interesse na área de biossensores, dispositivos capazes de fornecer uma resposta analítica (tal como a concentração de um analito) utilizando um elemento biológico de reconhecimento. Para tal, é usado um biorreceptor acoplado a um transdutor, que permite a detecção quantitativa e específica de analitos biológicos. Os transdutores, por sua vez, podem ser classificados em ópticos, piezelétricos, calorimétricos ou eletroquímicos. Os biossensores eletroquímicos, em especial, medem alterações de corrente, potencial, condutividade, resistência elétrica, entre outros (WANG e HU, 2009; MOREIRA et al., 2011). Dessa forma, para que o sinal de interesse seja captado e convertido em um sinal elétrico, imobiliza-se o biorreceptor sobre uma superfície condutora, denominada eletrodo. Antes da imobilização dos biorreceptores, os eletrodos podem ser modificados com polímeros, ou monocamadas automontadas, que em associação com nanopartículas podem proporcionar um aumento da área superficial do sensor e promover uma maior quantidade de biorreceptores imobilizados, podendo assim gerar respostas analíticas com maior sensibilidade e reprodutibilidade (LU et al., 2014). Dentre as nanopartículas que vêm ganhando interesse nessa área estão os pontos quânticos (PQs) que são nanocristais fluorescentes de semicondutores com tamanhos de 2 a 10 nm. Os PQs exibem propriedades físico-químicas que são significativamente diferentes, quando comparadas aos mesmos cristais em escala macroscópica (SANTOS, FARIAS e FONTES, 2008), podendo ser aplicados no desenvolvimento de plataformas biossensoras ópticas e/ou eletroquímicas. No contexto dos biossensores eletroquímicos, os PQs podem ser utilizados como intermediários entre o biorreceptor e a superfície do eletrodo, uma vez que possuem grupos funcionais para conjugação (LI Y et al., 2012). Entretanto, a compreensão do seu papel nesses dispositivos ainda está em estudo... Os PQs possuem ainda uma estrutura isotrópica o que permite serem dispostos de maneira ordenada na superfície do eletrodo. Dentro

deste contexto, esse trabalho teve como objetivo empregar e avaliar a utilização de PQs de CdTe carboxilados em uma plataforma biossensora eletroquímica baseada em eletrodo de carbono vítreo modificado por polipirrol aminado. A plataforma biossensora foi então testada para a detecção do anti-IgG após a imobilização do anticorpo IgG, como modelos de biomoléculas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Análises eletroquímicas: Utilizou-se uma célula eletroquímica convencional de três eletrodos: um de trabalho (carbono vítreo), um auxiliar e um de referência, sendo as medidas realizadas em potenciostato/galvanostato Metrohn Autolab PGSTAT128N acoplado a um microcomputador e controlado pelo software de aquisição de dados NOVA versão 1.11. As caracterizações eletroquímicas foram realizadas por voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) em solução 0,1 mol L⁻¹ de KCl contendo 1 mmol L⁻¹ de K₄Fe(CN)₆/K₃Fe(CN)₆ temperatura de 25 °C e desareada com gás inerte (N₂) por no mínimo 10 min.

Caracterização dos PQs: Os nanocristais de CdTe, estabilizados com ácido mercaptosuccínico (AMS), utilizados nesse trabalho foram sintetizados segundo Cabral Filho e co-autores (2016) e apresentaram um primeiro máximo em absorção em 530 nm, sendo o tamanho do PQ de aproximadamente 3,0 nm. Estimou-se que a concentração das suspensões é de aproximadamente 7 x 10¹⁴ partículas mL⁻¹. Já o espectro de emissão indicou um máximo em 589 nm com FWHM = 46 nm.

Imobilização dos PQs sobre a superfície polimerizada: Inicialmente o eletrodo de carbono vítreo (ECV) foi eletropolimerizado com PPy_{Am} [2-(1H-Pirrol-1yl)etanoamina, Sigma Aldrich] pela técnica de cronoamperometria em uma solução de 10 mmol L⁻¹ de PPy_{Am} em HNO₃ 0,1 mol L⁻¹ para a formação do filme polimérico. Para tanto, foi aplicado um potencial de 1,3 V por um intervalo de tempo de 120 s. O eletrodo polimerizado foi caracterizado por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os PQs (pH 5,5) foram imobilizados sobre a superfície, por meio de

ligação covalente. Para tanto, o eletrodo polimerizado foi imerso em uma solução contendo 2 mmol L⁻¹ de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e de 5 mmol L⁻¹ de sal de sódio N-hidroxisuccinimida (Sulfo-NHS), juntamente com os PQs, por um período de 24 horas.

Imobilização do IgG e detecção do anti-IgG: Inicialmente, antes da imobilização do IgG (Sigma Aldrich) no eletrodo, foram realizados em paralelo estudos de bioconjugação em meio homogêneo utilizando a metodologia de ensaio fluorescente em microplaca (EFM), que se baseia na afinidade da proteína pela microplaca de poliestireno (CARVALHO et al, 2014). Para isso, os PQs, o IgG e os conjugados PQs-IgG foram adicionados na microplaca, a qual foi incubada em banho-maria a 37 °C por 2 horas. Após a incubação, os poços foram lavados e a leitura foi realizada num equipamento Victor 2 (PerkinElmer). A intensidade do sinal é proporcional à eficiência da conjugação. Assim, quanto mais alto for o sinal da fluorescência medido, mais eficiente foi a imobilização dos PQs na microplaca, através das biomoléculas, e, portanto melhor a conjugação. O cálculo é feito pela diferença relativa das médias da fluorescência (FL) do bioconjugado (PQs-IgG) em relação à média de FL dos controles (PQs e IgGs).

$$FL \text{ Relativa (\%)} = \frac{(FL \text{ Bioconjugado} - FL \text{ Controles})}{FL \text{ Controles}} \times 100$$

Para ter ocorrido conjugação, os valores da FL relativa devem ser maiores que 100% (CARVALHO et al, 2014). Como forma de otimizar o sistema, foram utilizadas variações nas quantidades de EDC, Sulfo-NHS e IgG, segundo a Tabela 1.

Tabela 1. Variações de EDC, Sulfo-NHS e anticorpo para conjugação homogênea do sistema.

EDC e Sulfo-NHS	IgG
2 mmol L ⁻¹ e 5 mmol L ⁻¹	4 µg mL ⁻¹ e 91 µg mL ⁻¹
10 mmol L ⁻¹ e 25 mmol L ⁻¹	46 µg mL ⁻¹
20 mmol L ⁻¹ e 50 mmol L ⁻¹	46 µg mL ⁻¹ e 91 µg mL ⁻¹

Para todos os ensaios foram utilizados 1 mL de PQs na diluição de 1:7. As incubações dos PQs com os IgGs foram realizadas por 24 horas a 4 °C. Posteriormente a melhor condição encontrada foi aplicada no meio heterogêneo. O método da microplaca foi aplicado a fim de auxiliar e otimizar, com maior rapidez, a plataforma biossensora. Após essa etapa, a superfície do eletrodo modificada foi então imersa em soluções contendo a maior concentração de EDC e Sulfo-NHS, e 46 µg mL⁻¹ do IgG (Tabela 1), diluídos em solução de PBS por um período de 24 horas. Após a imobilização do IgG e bloqueio com TRIS base (8,2 mM), a plataforma biossensora foi testada através de sucessivas incubações com anti-IgG (Fragmento, F_{ab}, Sigma Aldrich), sendo gotejados 10 µL dessa biomolécula (1 ng mL⁻¹), diluída em PBS sobre a superfície do eletrodo a cada 30 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Imobilização dos PQs-AMS sobre a interface superfície/PPy_{Am}: A partir da VC (Figura 1) foi possível determinar a região em que ocorre o processo de polimerização (0,90 - 1,50 V), apresentando o valor de potencial fixo de E_{p,a} de c.a. 1,3 V, que posteriormente foi aplicado na técnica de cronoamperometria para a formação do filme.

Em complemento, apresentamos uma imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV, Figura 2) do sistema ECV/PPy_{Am}, preparado nas condições anteriores. A presença do filme sobre a superfície fica visualmente clara quando realizado um corte no polímero depositado sobre o eletrodo.

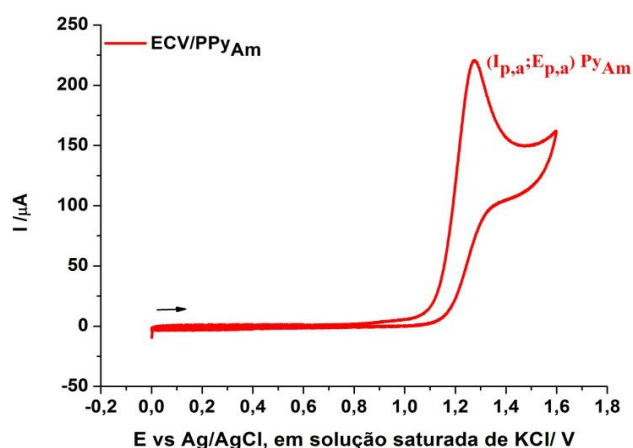


Figura 1. VC da superfície de carbono vítreo em solução de 10 mmol L⁻¹ de PPy_{Am} em HNO₃ 0,1 mol L⁻¹.

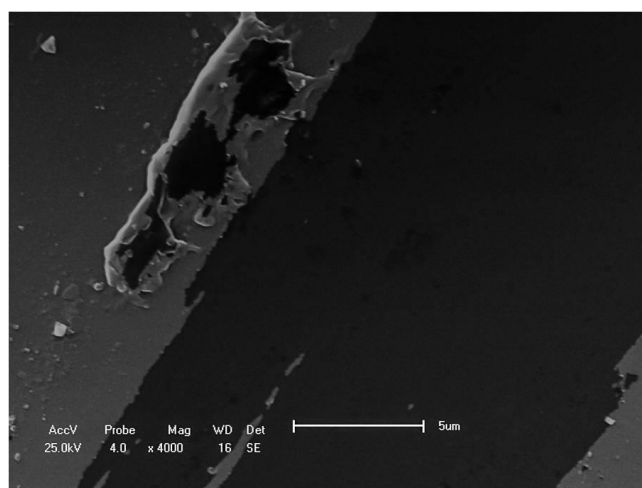


Figura 2. Imagens de MEV da superfície do eletrodo após a polimerização por cronoamperometria, em que é possível observar o filme rompido, sendo a região mais clara o filme polimérico e a mais escura o ECV. Barra de escala = 5 µm.

Após a polimerização, foi realizada a imobilização dos PQs carboxilados sobre a superfície modificada por pirrol aminado por meio de ligação covalente. Na Figura 3 é possível observar, a voltametria da superfície polimerizada (vermelho), que não apresentou grandes variações em relação à superfície de carbono vítreo (preto). Entretanto, após a imobilização dos PQs (azul), o voltamograma apresentou um comportamento distinto, observado a partir da diferença nos potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p) de -0,150 V, que representa um aumento de ca. 88% em relação aos sistemas anteriores (os quais apresentaram diferença de -0,079 V). As correntes também tendem a diminuir ($I_{p,a} \sim 18,0 \mu A$ e $I_{p,c} \sim -17,7 \mu A$) em torno de 20%, sendo essa grandeza menos expressiva. As observações anteriores podem ser reforçadas pelos dados obtidos pela EIE (Figura 4), apresentados segundo a representação de Nyquist, que traz a impedância imaginária (Z'') versus a impedância real (Z'). Tal representação permite obter valores de resistências associados ao processo de transferência de carga, que podem ser relacionados à presença de semicírculos. No gráfico é possível observar que o sistema tem seu processo de transferência de carga dificultado pela presença do PQ, uma vez que apresenta um aumento da resistência de transferência de carga $R = 1303 \Omega$, entretanto o mesmo não é observado para os dois outros sistemas.

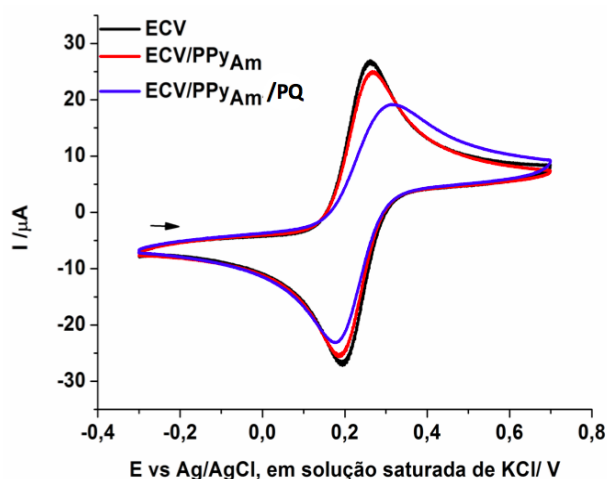


Figura 3. VCs para as diferentes superfícies em solução de 1 mmol L⁻¹ de FeK₄(CN)₆/FeK₃(CN)₆ em KCl 0,1 mol L⁻¹, $v = 0,1$ V s⁻¹.

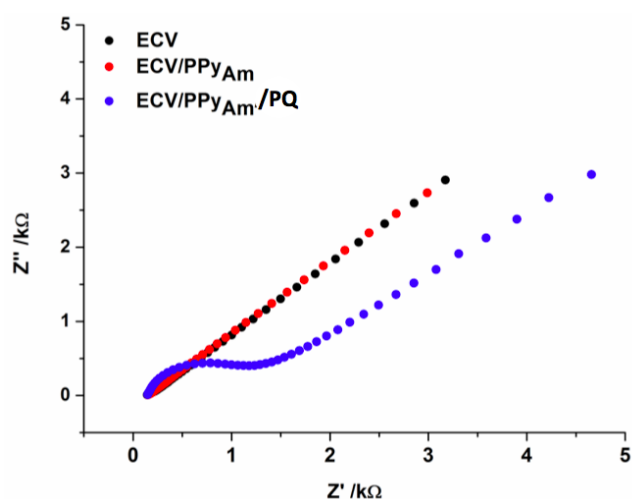


Figura 4. EIE para as diferentes superfícies em solução de 1 mmol L⁻¹ de FeK₄(CN)₆/FeK₃(CN)₆ em KCl 0,1 mol L⁻¹.

Imobilização do IgG e detecção do anti-IgG: Na EFM, os resultados dos controles mostraram um sinal médio de *ca.* 232 ua. Comparando com o sinal dos conjugados PQs-IgG, o sistema com maior quantidade de agentes de acoplamento, e 46 μg mL⁻¹ de IgG, apresentou uma FL relativa de 960% indicando que houve conjugação. Enquanto que com a menor quantidade dos mediadores a FL relativa foi de apenas 80%. Além disso, os conjugados com maior quantidade de proteína (91 μg mL⁻¹), não apresentaram um aumento tão diferenciado em relação a condição com 46 μg mL⁻¹ e maior quantidade de agentes de acoplamento. Dessa forma o uso da menor quantidade de biomolécula já se mostrou eficiente para conjugação. Após confirmada a conjugação na microplaca, foi realizada a imobilização dos anticorpos (IgG) na superfície eletródica, utilizando a configuração que apresentou o aumento significativo de 960% da fluorescência. Os voltamogramas (Figura 5) mostraram que houve a imobilização efetiva do anticorpo IgG, para essa configuração, uma vez que o sistema apresenta uma diferença nos potenciais de pico anódico e catódico (ΔE_p) de -0,366 V, que representa um aumento de *c.a.* 144% em relação aos sistemas anteriores.

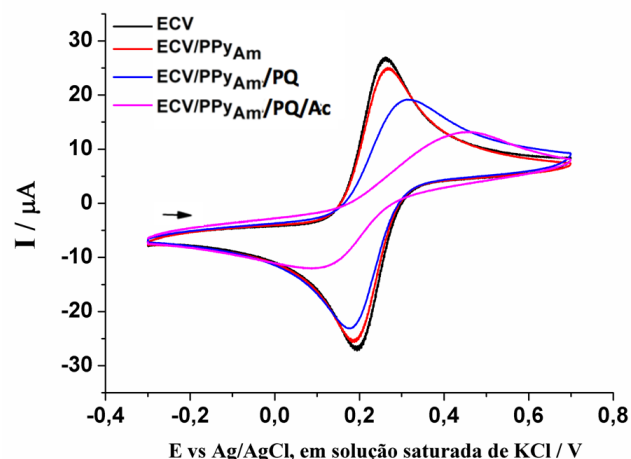


Figura 5. VCs da interface superfície/PPyAm/PQ-AMS/IgG em solução de 1 mmol L⁻¹ de FeK₄(CN)₆/FeK₃(CN)₆ em KCl 0,1 mol L⁻¹ a T = 25 °C.

Para confirmar esse resultado, foi realizada a análise por espectroscopia de impedância eletroquímica, a partir dos dados de Nyquist (Figura 6), para caracterizar o sistema superfície/PPyAm/PQs-AMS/Ac-IgG o que permitiu a obtenção dos parâmetros $R_{ct} = 3040 \Omega$ e $C = 1,1 \mu F$, demonstrando que a presença do anticorpo IgG promove um aumento na resistência em aproximadamente 133% e praticamente não altera a capacitância (C) do sistema, ambos em relação ao sistema superfície/PPyAm/PQs-AMS. Após essa etapa foi possível avaliar a plataforma na detecção do anti-anticorpo IgG.

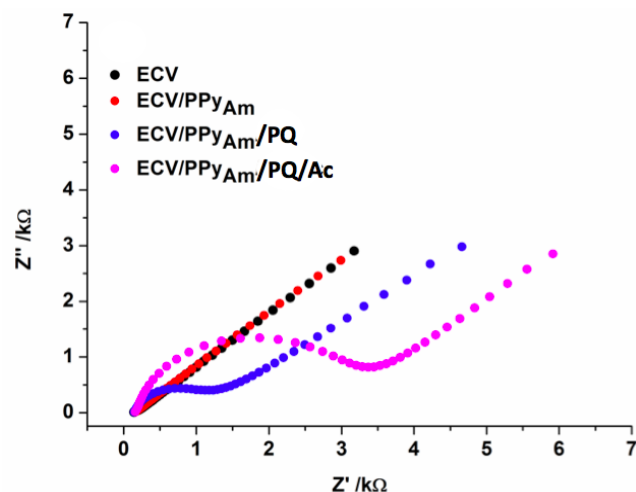


Figura 6. EIE da interface superfície/PPyAm/PQ-AMS/IgG em solução de 1 mmol L⁻¹ de FeK₄(CN)₆/FeK₃(CN)₆ em KCl 0,1 mol L⁻¹ a T = 25 °C.

A fim de testar a plataforma, o sistema (ECV/PPyAm/PQs/Ac-IgG) foi incubado com o anti-IgG. A partir dos diagramas de Nyquist (Figura 7), é possível observar que após cada incubação o sistema tem seu processo de transferência de carga gradativamente dificultado (aumento da região de semicírculo) dada a interação anticorpo-antígeno, evidenciando que essa interação altera os parâmetros associados ao processo de transferência de carga. Esse resultado mostra que é possível se detectar antígenos na ordem de ng mL⁻¹ com essa plataforma biosensora indicando ter sensibilidade (CABRAL et al., 2016).

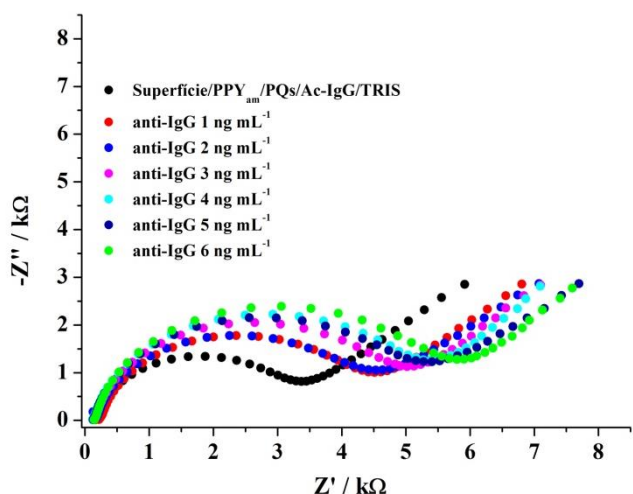


Figura 7. EIE da interface superfície/PPY_{ami}/PQs/IgG/anti-IgG (diferentes concentrações) em solução de 1 mmol L⁻¹ de FeK₄(CN)₆/FeK₃(CN)₆ em KCl 0,1 mol L⁻¹ a T = 25 °C.

CONCLUSÕES

A formação do filme polimérico a base de PPY_{ami} contribuiu para a imobilização covalente efetiva dos PQs. A utilização dos PQs sobre a superfície polimerizada permitiu a sua interação covalente com a IgG, proporcionando uma imobilização eficiente da biomolécula. Foi observado também que o método de EFM, ajudou para uma triagem mais rápida de imobilização dessas biomoléculas sobre a superfície eletródica. Os estudos também mostraram que o anti-IgG foi detectado, na ordem de ng mL⁻¹, pela interface ECV/PPY_{ami}/PQs/Ac-IgG após sucessivas incubações, se mostrando como uma potencial plataforma para ser utilizada na detecção de biomarcadores de diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- CABRAL FILHO, P. E.; CARDOSO, A. I. C.; PEREIRA, M. I. A.; RAMOS, A. P. M.; HALLWAS, F. CASTRO.; CASTRO, M. M. C. A.; GERALDES, C. F. G. C.; SANTOS, B. S.; PEDROSO DE LIMA, M. C.; PEREIRA, G. A. L.; FONTES, A. CdTe Quantum Dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1860, p. 28-35, 2016.
- CABRAL, D. G. A.; LIMA, E. C. S.; MOURA, P.; DUTRA, R. A. F. Label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid-carbon nanotube hybrid film. *Talanta*, v. 148, p. 209-215, 2016.
- CARVALHO, K. H. C.; FILHO, P. E.; BRASIL, A. G.; SANTOS, B. S. Fluorescence Plate Reader for Quantum Dot-Protein Bioconjugation Analysis. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, p. 3320 - 3327, 2014.
- LI Y; LIU, L.; FANG, X.; BAO, J.; HAN, M. Electrochemiluminescence biosensor based on CdSe Quantum Dots for the detection of thrombin. *Electrochimica Acta*, v. 65, p. 1-6, 2012.
- LU, X.; WANG, X.; JIN, J.; ZHANG, Q.; CHEN, J. Electrochemical biosensing platform based on amino acid ionic liquid functionalized graphene for ultrasensitive biosensing applications, *Biosens. Bioelectron*, v. 62, p. 134 - 139, 2014.
- MOREIRA, F. T.; DUTRA, R. A. F.; NORONHA, J. P.; CUNHA, A. L.; SALES, M. G. Artificial antibodies for Troponin T by its imprinting on the surface of Multiwalled Carbon Nanotubes: its use as sensory surfaces. *Biosens. Bioelectron*, v. 15, p. 243 - 250, 2011.
- SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor Quantum Dots for Biological Applications in *Handbook of Self Assembled Semiconductor Nanostructures Novel Devices in Photonics and Electronics*, p. 773-798, 2008.
- WANG, F.; HU, S. Electrochemical sensors based on metal and semiconductor nanoparticles. *Microchim*, v. 165, p. 1-22, 2009.