

PLATAFORMA BIOSSENSORABASEADA EM NANOCOMPÓSITO PARA DETECÇÃO DE TROPONINA CARDÍACA T (cTnT).

H. R. Sá¹, C. E. L. Menezes¹, T. A. Freitas¹, J. Saade¹, R.F. Dutra¹

¹Laboratório de Pesquisa em Diagnóstico (LAPED), Departamento de Engenharia Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

e-mail: huende@gmail.com

Resumo: Enfrentar o grave problema das doenças cardiovasculares constitui hoje um grande problema de saúde pública mundial e o desenvolvimento de tecnologias práticas, sensíveis e de baixo custo para monitoramento dos biomarcadores cardíacos é alvo de interesse na pesquisa biomédica. Desenvolvemos neste trabalho uma plataforma sensora baseada em nanocompósito de nanotubos de carbono (NTC), polietilenoimina (PEI) e líquido iônico (LI) de Tetrafluorborato de 1-butil-3-metilimidazólio ([Bmim]BF₄) para detecção *in vitro* da Troponina cardíaca T (cTnT) através de transdução eletroquímica. As etapas de construção do filme de nanocompósito foram caracterizadas por Voltametria Cíclica que confirmou a imobilização adequada da anti-troponina-HRP (*Horse Radish Peroxidase*) através da redução dos picos redox e a estabilidade física e química diante de sucessivos ciclos de varredura. As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) revelaram uma estrutura morfológica relativamente organizada dos NTC dispersos em PEI e LI sobre a superfície dos eletrodos de carbono vítreo (CV). Os resultados apresentados apontam viabilidade técnica para detecção de cTnT em baixas concentrações (0,03 a 0,12 ng/ml).

Palavras-chave: Biossensor, Nanotubos de Carbono, Troponina Cardíaca T (cTnT), PEI.

Abstract: Facing serious problem of cardiovascular disease is now a major public health problem worldwide and the development of sensitive, practices and low cost technologies for monitoring of cardiac biomarkers is the target of great interest in biomedical research. In this work we have developed a sensor platform based on Carbon Nanotubes-Polyethyleneimine-Ionic Liquid nanocomposites (CN-PEI-IL) for *in vitro* detection and quantification of Cardiac Troponin T (cTnT) through electrochemical transduction. The steps of constructing nanocomposites film was characterized by Cyclic Voltammetry which confirmed the proper immobilization of anti-Troponin HRP by reducing the redox peaks and physical and chemical stability on successive scan cycles. The Scanning Electronic Microscopy images revealed a relatively organized morphological structure of Carbon Nanotubes dispersed into the PEI and LI over the electrodes surface. The results suggest technical feasibility to detect cTnT at low concentrations (0.03 to

0,12 ng/mlTnT).

Keywords: Biosensor, Carbon Nanotubes, Cardiac Troponin T (cTnT), PEI.

Introdução

As Doenças cardiovasculares (DCV) estão entre os maiores problemas de saúde pública mundial tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 30% dos óbitos registrados em todo o globo atualmente estão associados às DCV [1]. O protocolo para detecção de infarto do miocárdio envolve análise sanguínea para monitoração dos biomarcadores cardíacos (Mioglobina, Creatinoquinase, Proteína C reativa, Peptídeo Natriurético e Troponina cardíaca) sendo as troponinas consideradas mais cardioespecífica para o diagnóstico do infarto [2, 3].

A Troponina é um complexo de três proteínas – as Troponinas T (cTnT) e I (cTnI) são as mais utilizadas nos testes – que participa do processo de contração do músculo cardíaco. Devido sua alta sensibilidade e especificidade, a dosagem deste marcador pode revelar lesões miocárdicas muito pequenas, não detectáveis por nenhum exame ambulatorial complementar. Hoje, a detecção da cTnT é um exame de primeira escolha [2, 3]. Atualmente, testes ambulatoriais para quantificação de Troponina cardíaca envolvem tecnologias de medida da densidade óptica da emissão quimioluminescente baseada na relação antígeno-anticorpo (ECLIA). Embora bem estabelecidos, tais métodos são ainda onerosos e relativamente lentos, devido, sobretudo ao baixo nível de concentração fisiológica normal das troponinas que se encontra abaixo de 0,03ng/mL, o que frequentemente induz erros em sua quantificação [4]. Portanto, alternativas diagnósticas que possibilitem quantificação rápida, precisa, portátil e de baixo custo deste biomarcador são altamente desejáveis.

Biossensores baseados em transdução eletroquímica são alternativas promissoras que vêm se estabelecendo de modo confiável na detecção e quantificação de diversas moléculas de interesse biomédico tais como proteínas, enzimas e anticorpos [5, 6]. A associação coma nanotecnologia, através de nanotubos de carbono (NTC), pode promover amplificação do sinal elétrico na interface nanoestruturada, resultando em maior

estabilização de corrente e aumento significativo do limite de detecção [5, 6].

Neste trabalho, foi desenvolvida uma plataforma biosensora para detecção de Troponina T baseada na interação de nanotubos de carbono com o polímero condutor PEI e LI utilizando transdução a eletroquímica. A plataforma foi caracterizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial.

Materiais e métodos

Reagentes: PEI, NTC, LI, Etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida) (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, USA. Anticorpo anti-cTnT e anti-cTnT conjugado à peroxidase (anti-cTnT) e cTnT foram comprados na Abcam, USA. Todos os demais reagentes usados no preparo de soluções tampões foram de grau analítico.

Metodologia:

(1) Preparação da Solução de PEI e dispersão de nanotubos de carbono carboxilados (NTC-COOH)

Dissolveu-se 0,1 g de PEI em 1,8 ml de etanol sob leve agitação por 30 segundos. Em uma solução de EDC/NHS (1:1 v/v) adicionou-se 0,0015 g de nanotubos de carbono carboxilados em banho ultrasônico por 4 horas.

(2) Montagem da plataforma biosensora sobre o eletrodo de carbono vítreo(CV)

Cinco microlitros (5 μL) da solução de PEI (1) foram depositados sobre a superfície do eletrodo, que permaneceu na estufa (50 $^{\circ}\text{C}$) por 15 minutos. Em seguida, 5 μL da solução de NTC-COOH previamente ativados com EDC/NHS foram depositados sobre a superfície do eletrodo e incubados por 20 minutos na estufa (50 $^{\circ}\text{C}$). Em seguida, 10 μL de líquido iônico foram depositados sobre a superfície do eletrodo e permaneceu por 24 horas à temperatura ambiente. O excesso foi lavado em água deionizada e, por fim, uma solução de anticorpo anti-cTnT conjugado à peroxidase (anti-cTnT-HRP) foi incubada por 2 horas, as concentrações utilizadas variaram de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Voltametria Cíclica:

As voltametrias foram realizadas em $([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-})$ 1 mmol L^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} de 0 até 0,5Volts em diferentes velocidades de varredura (10 a 250mV/s), tendo como padrão 5 ciclos.

Voltametria de Pulso Diferencial

Para avaliar as respostas analíticas às concentrações de cTnT, foram realizados ensaios de voltametria de pulso diferencial aplicando-se amplitude de pico de 0,1Volts, velocidade de varredura 125mV/s e largura de pulso de 25mV em solução de $([\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-})$ (1 mmol L^{-1}) em 0,1KCl mol L^{-1} numa janela de potencial de 0,3Volts a 0. As amplitudes de corrente

foram medidas no potencial de pico catódico.

Microscopia Eletrônica de Varredura:

As micrografias foram registradas em um microscópio eletrônico de varredura Philips XL30 FEG FE-SEM a um potencial de 10 kV.

Resultados

A técnica de voltametria cíclica foi usada para caracterizar a etapa de montagem da interface sensora (Figura 1).

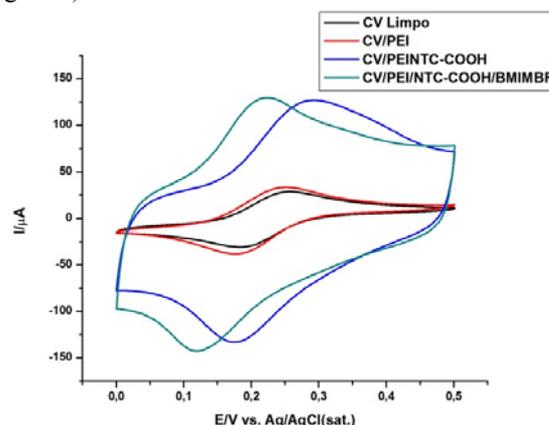


Figura 1: Voltametria cíclica no eletrodo de carbono vítreo, analisando as etapas de construção do biossensor.

Para caracterização da estabilidade físico-química da plataforma na sua construção, diante de numerosos processos de oxi-redução sequenciais, executou-se trinta ciclos voltamétricos (Figura 2). O teste permitiu a verificação da susceptibilidade do filme diante dos processos de transferência de carga.

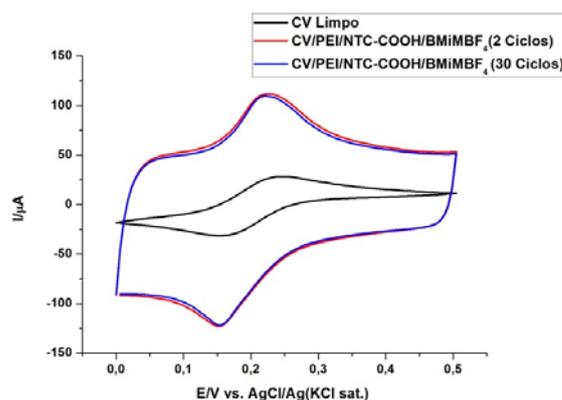


Figura 2: Voltamogramas exibindo boa estabilidade e reprodutibilidade dos ciclos voltamétricos após 30 varreduras consecutivas.

Figura 3(a) exhibe os resultados de intensidade da corrente nos picos anódico e catódico em função da velocidade de varredura. Observou-se um discreto afastamento dos picos à medida que se aumenta a taxa de varredura sugere processos quase-reversíveis (ou aproximadamente reversíveis), de modo que a dependência da intensidade das correntes com a raiz

quadrada da velocidade de varredura é aproximadamente linear (Figura 3(b)).

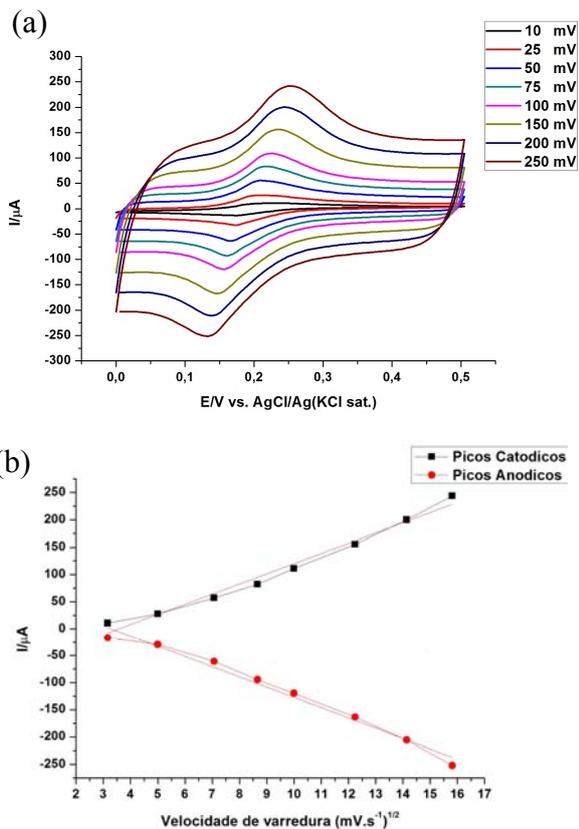


Figura 3: Eletrodo de CV em diferentes velocidades de varredura (a) e análise dos picos das correntes anódicas (I_{pa}) e catódicas (I_{pc}) em função da variação da raiz quadrada das velocidades de varreduras(b).

A imobilização do anticorpo anti-troponina-HRP foi confirmada pela redução dos picos redox, devido a sua natureza isolante pela redução dos picos de correntes obtidas pelo par redox.

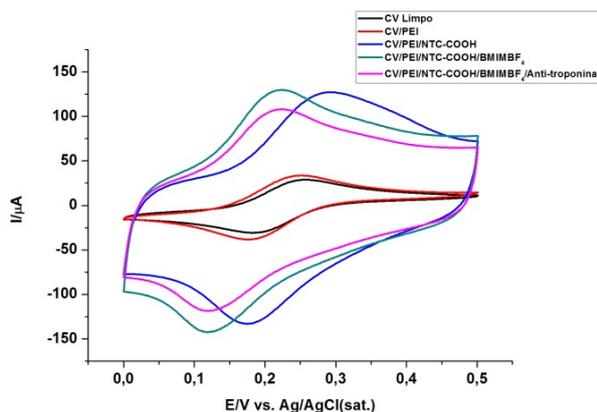


Figura 4: Redução do perfil da voltametria cíclica em eletrodo de CV com o filme de PEI/NTC-COOH/BMIMF₄/Anti-troponina-HRP (lilais).

O anticorpo anti-troponina marcado foi submetida à voltametria cíclica em uma solução de peróxido de hidrogênio, já que o marcador HRP reage nesta solução. Diferentes concentrações do anticorpo

marcado foram testadas para avaliar o comportamento da corrente. Na figura 5, observou-se um aumento da corrente em virtude da reação de oxidação da peroxidase pela ação do peróxido de hidrogênio. Em concentração máxima, o pico de redução foi largamente aumentado, corroborando com a hipótese de que o anticorpo conjugado à peroxidase foi imobilizado.

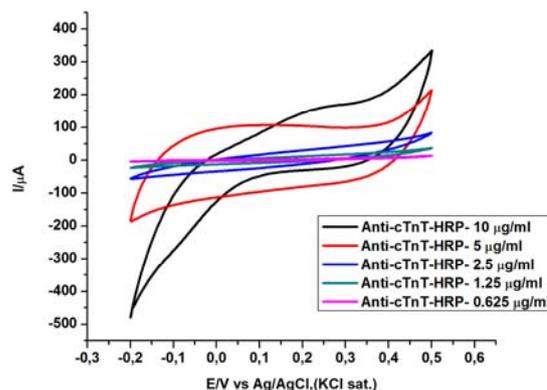
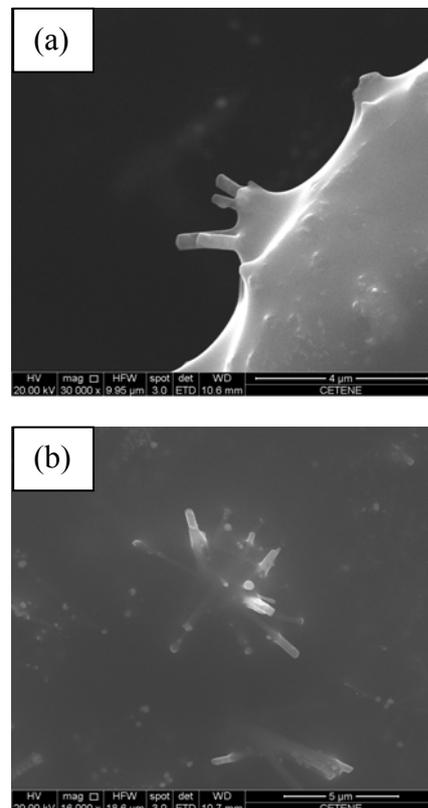


Figura 5: Voltametria cíclica em um eletrodo de CV com o filme de PEI/NTC-COOH/BMIMF₄/Anti-troponina em H₂O₂ utilizando diferentes concentrações do marcador.

Na Figura 6 pode ser vista micrografia eletrônica de varredura do eletrodo de CV coberto com o nanocompósito de PEI + LI + NTC-COOH (a e b) e sem o LI (c). As interações do LI com o PEI e os NTC permitiram mudanças morfológicas na orientação dos NTC dispersos na superfície do eletrodo.



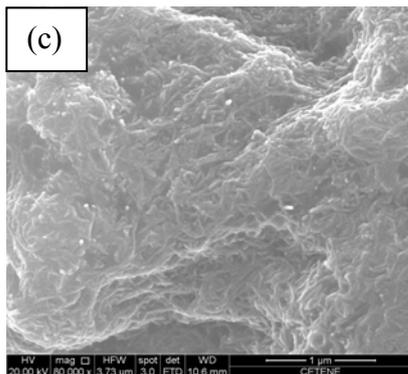


Figura 6: Nanocompósito de PEI + LI + NTC-COOH (a e b) e sem o LI (c).

A Figura 7 mostra a resposta às concentrações cTnT do imunossensor. As amplitudes de correntes de potencial de pico catódico medidas em função da concentração da cTnT. O imunossensor mostrou-se ter uma resposta linear a uma faixa de concentração de 0.03 a 0.12 ng/ml, com o limite de detecção aproximado de 0.01 ng/ml.

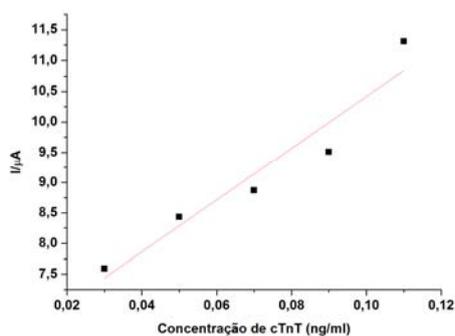


Figura 7: Curva analítica de resposta a concentração de cTnT. Ensaio realizado por pulso diferencial em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (1 mmol L^{-1}) em $0,1 \text{ KCl mol L}^{-1}$.

Discussão

Nos voltamogramas da Figura 1, observa-se um ganho significativo de corrente a partir da deposição dos NTC-COOH e uma redução dos potenciais de oxidação-redução quando da adição do líquido iônico. Este último efeito pode ser atribuído às propriedades do líquido iônico que atua como mediador de elétrons promovendo uma maior atividade eletrocatalítica. O comportamento do eletrodo quando submetido a diferentes velocidades de varredura sugere que a maior parte dos processos de transferência de carga na interface são quase-reversíveis e controlados por difusão. A imobilização da anti-cTnT sobre a plataforma sugerida foi confirmada pelos resultados da figura 5. As respostas analíticas a variação da concentração de cTnT como demonstrado na figura 7, mostra-se comparáveis aos métodos por quimioluminescência, com a vantagem de ser mais rápido e prático. As imagens de MEV confirmam a presença dos NTC-COOH incorporados aos LI através das micrografias da figura 6.

Conclusão

Os resultados apresentados neste trabalho apontam viabilidade técnica para detecção de cTnT em baixas concentrações (0,03 a 0,12 ng/ml). O desenvolvimento de tecnologias alternativas para monitoramento prático, preciso e de baixo custo dos biomarcadores cardíacos é considerado altamente estratégico em políticas de saúde pública e são de grande interesse na pesquisa biomédica. Além de novas aplicações poderem ser desenvolvidas pela substituição do anticorpo, demonstrando a versatilidade deste tipo de sistema para a detecção e quantificação de uma variedade de moléculas de interesse biomédico.

Agradecimentos

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (FACEPE) e CNPQ.

Referências

- [1] WHO. Cardiovascular Disease. http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/
- [2] Importância da troponina I no diagnóstico do infarto do miocárdio no pós-operatório de cirurgia de revascularização. *RevBrasCirCardiovasc* vol.24 no.1 São José do Rio Preto Jan./Mar. 2009.
- [3] A Troponina como Marcador de Injúria Celular Miocárdica. *Arq. Bras. Cardiol.* vol.71 n.4 São Paulo Oct. 1998.
- [4] Adams JE 3rd, Bodor GS, Davila-Romain VG, et al: Cardiac troponin I: A marker for cardiac injury, v. 88, p. 101-106, 1993.
- [5] A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. *Talanta (Oxford)*, v. 01, p. 001, 2013.
- [6] A sensor tip based on carbon nanotube-ink printed electrode for the dengue virus NS1 protein. *Biosensors & Bioelectronics*, v. 12, p. 266-275, 2013.