

DESENVOLVIMENTO DE GENOSENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO EM ELETRODOS IMPRESSOS DE CARBONO E POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO EM DIAGNÓSTICO DO HPV-18

Eloisa Neves Almeida Pimentel¹; Rosa Amalia Fireman Dutra²

¹Estudante do Curso de Biomedicina-CCB-UFPE; E-mail: eloisa-ap@hotmail.com

²Docente/pesquisador do Depto de Engenharia Biomédica-CTG-UFPE; Email:rfiremandutra@yahoo.com.br

Sumário: O câncer cervical tem sido uma patologia grave no Brasil e no mundo, com cerca de 15.590 novos casos anualmente no Brasil. O Papilomavírus humano tem sido biologicamente relacionado ao desenvolvimento de lesões cervicais e progressão para o câncer de colo de útero. O HPV 18 é responsável, concomitantemente com o HPV 16, por 60-80% dos casos de câncer cervical. Visando uma metodologia que possibilite o diagnóstico rápido e eficaz do HPV-18, neste trabalho foi realizada a construção de um genossensor eletroquímico, baseado na tecnologia do eletrodo impresso. Os eletrodos impressos foram fabricados associando à tinta de carbono ao polímero condutor polipirrol, e posteriormente sobre esta superfície foi criada uma plataforma nanoestruturada para permitir a imobilização da sonda molecular (oligonucleotídeo, com 20 bases, contendo sequência conservada do HPV-18). Foram utilizadas técnicas analíticas, tais como, voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial para obtenção dos principais resultados. O genossensor proposto representa um método simples de obtenção de filmes nanoestruturados e sensível para o diagnóstico do HPV-18.

Palavras-chave: câncer de colo de útero; genossensor; HPV-18; Nanotubos de carbono; polipirrol;

INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns no mundo. Dados epidemiológicos sugerem que todos os indivíduos, sexualmente ativos, já entraram em contato com algum subtipo de HPV, e mais que isso, sugerem que cerca de quinhentos mil a um milhão de pessoas estejam infectadas pelo vírus. O HPV 18 é responsável, concomitantemente com o HPV 16, por 60-80% dos casos de câncer cervical. O diagnóstico do HPV é realizado através de técnicas moleculares que são capazes de reconhecer a presença do DNA viral em amostras de raspagem do colo uterino. Uma alternativa para a detecção do DNA viral é a utilização de biossensores de DNA (genossensores).

De acordo com a definição proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, biossensor constitui um tipo de sensor, composto por um elemento biológico e um transdutor, capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas. O elemento biológico é fixado (ou imobilizado) na superfície sensora do transdutor, que converte o sinal da reação biológica ou bioquímica em um sinal elétrico passível de ser quantificado e amplificado (PEREIRA; SANTOS; KUBOTA, 2002). Biossensores de DNA ou simplesmente genossensores, são dispositivos resultantes da interação entre uma sonda (sequência específica), usualmente um oligonucleotídeo sintético curto, e um transdutor. A sonda molecular funciona como o elemento de bioreconhecimento e é capaz de detectar a sequência de DNA complementar, ocorrendo assim na superfície sensora um processo de hibridização.

Uma das dificuldades de detecções moleculares envolvendo interações com poucas bases é a alta sensibilidade requerida, sobretudo em amostras complexas. O uso de nanomateriais associados a polímeros condutores na construção de matrizes de imobilização de sondas moleculares em eletrodos impressos, nos últimos anos, tem conferido aos genossensores uma maior sensibilidade analítica.

Neste projeto foi desenvolvido um genossensor composto por um *tip* sensor obtido pela incorporação de polipirrol à tinta de carbono impressa em um suporte de politereftalato de etileno (PET) para a detecção do HPV-18. A produção do *tip* foi possível a partir da miniaturização da plataforma sensora. A miniaturização destes dispositivos tem como objetivo aumentar o rendimento e automação dos ensaios, reduzindo o custo do diagnóstico, consequentemente fornecendo uma economia expressiva aos ensaios repetitivos realizados laboratorialmente (TSOUTI, *et al.*, 2011).

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Confecção dos eletrodos impressos

Os eletrodos impressos foram construídos em um suporte de politereftalato de etila (PET), previamente moldado com uma fita adesiva. A tinta de carbono foi misturada a 5% de PPY e 5% de grafite. Antes de realizar a aplicação da mistura no suporte de PET, é realizado no mesmo um protocolo de limpeza, no qual se utiliza álcool 70% para retirar quaisquer impurezas presentes no PET. Após essa etapa, a tinta é impressa sobre a superfície do PET e os eletrodos são levados para secagem na estufa, a 60°C por 20 minutos. Posteriormente, os eletrodos são submetidos a um processo de limpeza eletroquímica, utilizando uma solução de KCl 0,1M durante 40 varreduras cíclicas a 0,1V/s, na faixa de potencial de -2 a 2 V.

2. Dispersão dos nanotubos carboxilados (NTC-COOH) e adsorção na superfície sensora

Inicialmente, foi preparada uma solução de NTC-COOH dispersa em DMF (dimetilformamida), numa solução de 1:1 (1mg de NTC-COOH e 1mL de DMF). Após a dispersão, os NTC-COOH foram aplicados na superfície eletródica em três camadas, e então os eletrodos foram submetidos à secagem na estufa a 60° por 15 minutos. Os NTC-COOH foram utilizados para possibilitar a ancoragem da sonda de DNA na superfície do eletrodo.

3. Imobilização da sonda de DNA e hibridização da fita complementar à sonda

A sonda utilizada para o desenvolvimento do genossensor é uma fita de DNA sintética e aminada. Uma alíquota de 4µL da sonda de DNA (100µmol) foi depositada na superfície do eletrodo e incubada por 1 hora. A imobilização da sonda na superfície sensora foi possível através da ligação do seu grupamento amina com o grupo carboxílico do NTC (que foi ancorado no sensor na etapa anterior).

A resposta do genossensor foi analisada através da hibridização da sonda com sua molécula alvo. Nesta etapa, uma alíquota de 4µL da fita complementar de DNA (100µmol) foi depositada na superfície do eletrodo e incubado por 40 minutos (Figura 6).

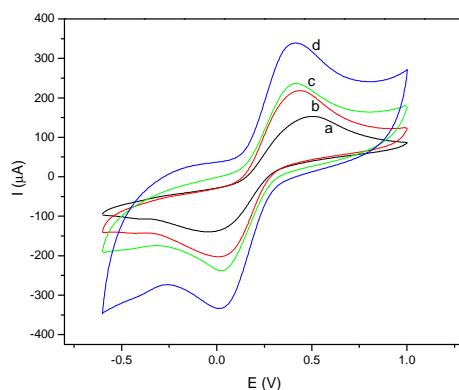
4. Caracterização eletroquímica do genossensor

A caracterização eletroquímica de todas as etapas da construção do genossensor foi realizada por meio das técnicas de voltametria cíclica e de pulso diferencial. Todos os voltamogramas do ensaio eletroquímico foram realizados em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (5mM) preparado em KCl (100mM), na faixa de potencial de -0,6 a +1,0 V, sob velocidade de varredura de 50mV/s, na voltametria cíclica; já na voltametria de pulso diferencial a faixa de potencial utilizada foi 0 a 0,6 V, sob velocidade de varredura de 50mV/s, com uma amplitude de pulso de 100mV e tempo de pulso de 50 ms.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No desenvolvimento do genossensor, a primeira etapa foi a construção do eletrodo impresso. A metodologia utilizada para tal confecção envolve a utilização da tinta de carbono misturada ao PPy. Para obter a concentração ideal do PPy na tinta, foi realizado um estudo variando as concentrações do mesmo utilizando: 95% de tinta e 5% de PPy, 97,5% de tinta e 2,5% de PPy, 99% de tinta e 1% de PPy e só a tinta de carbono (sem o PPy). Comparando com o eletrodo confeccionado apenas com tinta de carbono (sem o PPy), a melhor condutividade elétrica do eletrodo foi obtida na mistura da tinta de carbono com PPy 5%.

Figura 1: Voltamogramas cíclicos dos eletrodos impressos confeccionados com diferentes proporções de PPy: (a) Só tinta de carbono; (b) Tinta de carbono + 1% PPy; Tinta de carbono + 2,5% PPy; (d) Tinta de carbono + 5% PPy.



A curva analítica para o genossensor proposto para as diferentes concentrações do cDNA foi realizada empregando a técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD). Todos os ensaios foram realizados sob as condições experimentais otimizadas. As análises por DPV foram obtidas na faixa de potencial de 0 a 0,6V em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ (ferricianeto de potássio/ferrocianeto de potássio) (0,005 M). Para tal experimento, diferentes concentrações de cDNA foram pipetadas sobre a superfície sensora EIC-PPi/NTC-COOH/sonda e mantidas durante 40 minutos. A resposta do genossensor, para a curva realizada por VPD, foi linearmente proporcional na faixa de concentração de 5 a 100 μ M de cDNA ($r=0,98$; $p<0,0001$) (Figura 2).

Para avaliar a especificidade do genossensor, o mesmo foi incubado, diante das mesmas condições nas quais era incubado com o cDNA, com um DNA não complementar, o Calf Thymus DNA. Após um período de 40 minutos, os EICs foram submetidos a análises por VC na faixa de potencial de -0,6 0 a 1 V em $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ 0,005 M. Os resultados obtidos pela técnica eletroquímica demonstraram que não houve variação significativa no sistema após a incubação do genossensor com o Calf Thymus DNA (Figura3).

Figura 2: Curva de calibração do genossensor obtida através de VPD para diferentes concentrações do cDNA de HPV 18 (5, 10; 25; 50; 75 e 100 μ M). Varreduras realizadas em solução de 0,005 M de $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ preparada em 0,1 M de KCl.

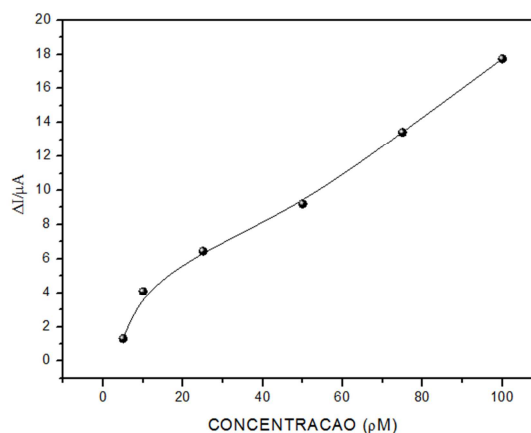
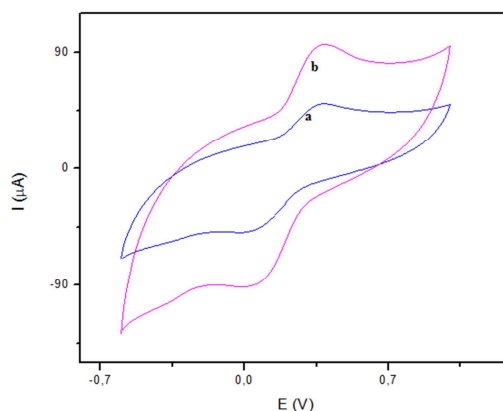


Figura 3: VC representando a variação no sistema eletroquímico após a incubação da sonda molecular com o Calf Thymus DNA. Em (a) VC após a imobilização da sonda molecular e em (b) VC após a incubação do genossensor com o Calf Thymus DNA.



CONCLUSÃO

O genossensor desenvolvido apresentou boa sensibilidade e linearidade na detecção do HPV-18, além disso os resultados obtidos mostraram ser essa plataforma específica para o DNA-HPV e a metodologia desenvolvida apresentou-se reproduzível. Dessa forma, o genossensor desenvolvido mostrou ser um método passível de ser utilizado para auxiliar o diagnóstico clínico do HPV-18.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à PROPESQ, à UFPE. À minha professora orientadora Rosa Dutra e à Ana Carolina Dias por toda a sua dedicação e paciência.

REFERÊNCIAS

PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T., 2002. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. Química Nova, v. 25, p. 1012-1021.

TSOUTI, V.; BOUTOPOULOS, C.; ZERGIOTI, I.; CHATZANDROULIS, S., 2011. Capacitive microsystems for biological sensing. Biosensor and Bioelectronics, v. 27, p. 1-11.