

Fabricação de imunossensor eletroquímico baseado em nanobastões de óxido de cério (CeO₂ NRs) para detecção do biomarcador para doença cardiovascular Proteína C-reativa

Bolsista Noemí Angelica Vieira Roza (CTI) noemi.roza@cti.gov.br

Resumo

A necessidade de rastreamento de doenças com a possibilidade de intervenção rápida ficou muito evidente com a pandemia de Covid-19. Ainda assim, a principal causa de morte tanto no Brasil, quanto no mundo são as doenças cardiovasculares (CDVs). O uso de dispositivos POC (point-of-care) baseados em biossensores eletroquímicos poderá reduzir o tempo de análise para minutos, sem necessidade de infraestrutura laboratorial e recurso humano especializado. A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína plasmática de fase aguda cujas concentrações podem aumentar rapidamente após infecções/inflamações, além de se apresentar como marcador sistêmico de doenças cardiovasculares. Aqui, relatamos o desenvolvimento de um imunossensor eletroquímico flexível baseado em nanobastões de CeO₂ (NRs) imobilizados com anticorpo de PCR. A condição de deposição foi avaliada para funcionalização do eletrodo e imobilização com anticorpo-antígeno PCR. Foi feita a funcionalização do sensor e a imobilização foi verificada por técnicas espectroscópicas e eletroquímicas e demonstraram eficácia e reprodutibilidade. O imunossensor desenvolvido apresentou reprodutibilidade aceitável (coeficiente de variação = 4,5%) e permitiu detecção na faixa de 0,3 a 7,0 mg L⁻¹ de PCR com limite de detecção de 0,18 mg L⁻¹, com aplicações imediatamente detectáveis, fácil de manusear, de baixo custo e ideal para servir como dispositivo POC.

Palavras-chave: Biossensor; Proteína C-reativa; CeO₂; Nanopartículas.

1. Introdução

A necessidade de rastreamento de doenças com a possibilidade de intervenção rápida ficou muito evidente com a pandemia de Covid-19. O uso de dispositivos point-of-care (POC) baseados em biossensores eletroquímicos poderá reduzir o tempo de análise para minutos, sem necessidade de infraestrutura laboratorial e recurso humano especializado e representa uma das áreas mais dinâmicas dentro do diagnóstico in vitro (CARVAJAL, 2018; HEMMIG, 2020). Recentemente, vários estudos mostraram que o desenvolvimento de nanomateriais tem diversas aplicações, inclusive para detecção do novo coronavírus o SARS-CoV-2 (SEO, 2020; KUMAR, 2021; SRIVASTAVA, 2021).

O uso da proteína C-reativa (PCR) tem sido amplamente aceito como biomarcador diagnóstico de eventos adversos para monitoramento de risco cardiovascular e inflamação (VILIAN, 2019). A inflamação representa um mecanismo fisiopatológico chave na síndromes coronarianas agudas (EGGERS, 2021). A PCR, o fator inflamatório universal, é geralmente elevada tanto no IAM (infarto agudo do miocárdio) quanto na miopericardite (MEISEL 2021) e é conhecida como proteína de fase-aguda e sintetizada pelo fígado (VILIAN, 2019; HOLZKNECHT, 2021). Apresenta concentração normal no plasma abaixo de 1.0 mg L⁻¹, no entanto pode aumentar

rapidamente para mais de 1000 vezes o normal após lesão tecidual, infecção ou inflamação (GABBAY, 1999; HIRSCHFIELD, 2003). A elevação da PCR está diretamente relacionada a uma maior extensão do dano do tecido miocárdico ((ØRN, 2009; REINDL, 2017) com subsequente eventos cardíacos adversos maiores (MACE) (THÉROUX, 2005; YIP, 2005; HOLZKNECHT, 2021). Portanto, o desenvolvimento contínuo de métodos analíticos precisos e rápidos para a detecção de PCR é imperativo.

2. Materiais e métodos

2.1 Fabricação de imunossensor eletroquímico baseado em nanobastões de óxido de cério (CeO₂ NRs) para detecção do biomarcador para doença cardiovascular Proteína C-reativa

Para o desenvolvimento do imunossensor para proteína C-reativa foram adquiridos eletrodos flexíveis de ouro fabricados em polimida (PCBWAY Company, China). No eletrodo de referência foi depositada a tinta de prata/cloreto de prata (ALS, Japão) juntamente com tratamento térmico a 60°C. Para a fabricação do imunossensor duas condições de deposição dos CeO₂ NRs foram testadas a fim de verificar a melhor dispersão dos nanobastões e resposta eletroquímica. Na primeira condição, a emulsão foi feita de CeO₂ NRs com glutaraldeído 50% (Electron Microscopy Sciences), e na segunda com dimetilformamida (DMF). Após o preparo dessas emulsões, elas foram adicionadas ao WE na quantidade de 10 µL de emulsão em cada eletrodo. Os eletrodos foram então deixados por 12 horas em uma estufa a vácuo a 120°C. Foi feita a caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

2.2 Imobilização com anticorpo anti-Proteína C-reativa e caracterização estrutural e eletroquímica dos sensores produzidos

As nanoestruturas foram funcionalizadas com cistamina 20mM (Alfa Aesar) para fornecer grupos amino na superfície e posteriormente, foram ligados com glutaraldeído 2,5%, fornecendo grupos carbonílicos na superfície, para que, então, os amino grupos dos anticorpos (NH₂-Y) fossem facilmente ligados. Em seguida foram aplicadas na superfície dos eletrodos de trabalho (WE) diferentes concentrações da solução de anticorpo diluídas em tampão fosfato (PBS 0.1M pH 7,4), e feita incubação por 12h a 4°C em câmara úmida com posterior lavagem com tampão PBS para remoção do excesso.

Os estudos eletroquímicos foram realizados com medidas eletroquímicas utilizando um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 204 (EcoChemie, Holanda) controlado por computador. Adicionalmente foram feitas medidas utilizando um potenciostato portátil Sensity PalmSens acoplado a um aparelho de celular usando o aplicativo PStouch – PalmSens. Com finalidade de identificar variações nos potenciais do pico catódico (E_{pc}) e anódico (E_{pa}) e nas intensidades de corrente do pico catódico (I_{pc}) do pico anódico (I_{pa}) dos voltamogramas cíclicos durante as análises por voltametria cíclica (VC), o potencial foi de -0.2 a 0.5V com taxa de escaneamento de 100 mV s⁻¹ em 10 mmol L⁻¹ K₄ [Fe(CN)₆] e 0.5 mol L⁻¹ com solução de NaNO₃ como mediador. A estabilidade foi verificada através de sucessivos voltamogramas. A caracterização dos imunossensores prontos foi realizada pela avaliação da reprodutibilidade dos sensores via VC.

O grau de especificidade da ligação anticorpo-antígeno do imunossensor foi avaliado incubando diferentes antígenos à base sensora e avaliando sua resposta por VC e pela técnica de Dot Blot. Foram utilizadas diversas proteínas recombinantes (Troponina I cardíaca recombinante, Troponina T cardíaca recombinante, Proteína C-Reativa recombinante, Mioglobina recombinante). As amostras (2µl) foram adicionadas às membranas de nitrocelulose em concentrações variadas (0,15µg; 0,015µg, 0,0015µg). As membranas foram deixadas para secar

por 30 min e incubadas overnight a 4°C com a solução de anticorpo. Em seguida as membranas foram lavadas com solução salina tamponada com tris com Tween e incubadas com anticorpo secundário conjugado com HRP. As bandas imunorreativas foram visualizadas com o método de quimioluminescência utilizando o kit Super Signal West Pico Plus (Thermo Fisher Scientific).

A sensibilidade e especificidade do anticorpo também foram avaliadas pela técnica de Western Blot com a separação das proteína por eletroforese, sendo possível a identificação na banda correspondente de 26 kDa (massa molecular ~25kDa) utilizando-se um controle positivo. Adicionalmente, foram iniciados testes com soro fetal bovino (SFB) para verificação da seletividade dos imunossensores. As amostras de soro foram enriquecidas com proteína C-reativa) em duas diferentes concentrações e incubadas por 60 min com caracterização por VC.

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização estrutural e eletroquímica do eletrodo e dos CeO₂ NRs

Os CeO₂ NRs usados para fabricação do biossensor têm uma estrutura cristalina cúbica (padrão ICSD n° 239412) e morfologia bastonete. Os eletrodos utilizados neste trabalho são do tipo flexível produzidos em folha de polimiida. As melhores condições de deposição dos CeO₂ NRs, como dispersão, porosidade e aderência à base do WE foram testadas através da dispersão de CeO₂ NRs em gluta (CeO₂-Gluta) e DMF (CeO₂-DMF). Ambas as metodologias de deposição mostraram boa adesão de deposição. Após a caracterização observou-se que o eletrodo de CeO₂-DMF apresenta superfície mais homogênea com seu agente dispersante (DMF) apresentando características hidrofílicas. Porém a superfície do eletrodo estava altamente hidrofóbica nos testes eletroquímicos. Isso se deve à qualidade hidrofóbica das superfícies mais estáveis do CeO₂. Foi realizada então a hidroxilação da superfície do eletrodo CeO₂-DMF com uma solução aquosa de ácido acético a 10%. Este eletrodo foi então chamado de CDH. A Figura 1 mostra imagens dos CeO₂ NRs nas diferentes condições testadas.

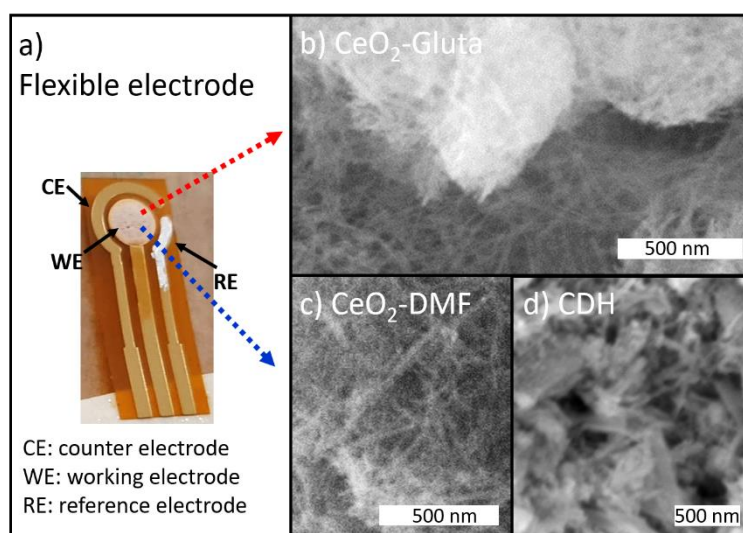


Figura 1- Diferentes métodos de deposição utilizados na preparação de sensor. Em (a) é mostrado o eletrodo flexível utilizado; imagens MEV para os eletrodos CeO₂-Gluta (b), CeO₂-DMF (c), e CeO₂-DMF hidroxilado, CDH (d).

Com relação às análises eletroquímicas, tanto a base sensora, quanto os eletrodos CeO₂-Gluta e CeO₂-DMF apresentam picos anódicos localizados na região de 0,2V, o que é esperado na

presença do $K_4[Fe(CN)_6]$. Quanto aos valores de densidade de corrente anódica, I_{pa} , há uma diminuição apresentada pelos eletrodos (base sensora > CeO_2 -Gluta > CeO_2 -DMF) (Figura 2). Os resultados mostraram que o eletrodo CDH tem uma área de superfície ativa 35% maior em comparação com antes da hidroxilação (CeO_2 -DMF). Indicando maior transferência de elétrons e porosidade no material. A Figura 2b mostra as curvas VC para o eletrodo CDH submetido a diferentes taxas de varredura. Os VCs apresentam um aumento proporcional nos picos anódicos e catódicos, de acordo com a taxa de varredura. O I_{pa} e I_{pc} são diretamente proporcionais à raiz quadrada da taxa de varredura (inserção da Figura 2b), sugerindo um processo controlado por difusão.

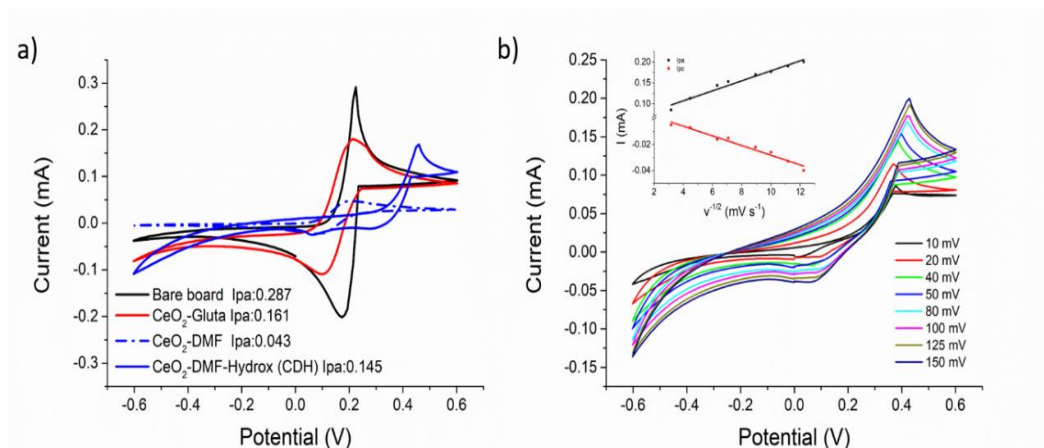


Figura 2- Curvas de VC da base sensora e diferentes condições de deposição de CeO_2 NRs (a) e diferentes taxas de escaneamento par o sensor CDH (b). Todas as medidas foram realizadas na presença de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (10 mM) em $NaNO_3$ (0.5 mol L⁻¹), com taxa de escaneamento de 100 mV s⁻¹.

A avaliação da estabilidade do imunossensor foi verificada por VCs sucessivos realizados na presença de $K_4[Fe(CN)_6]$ (10 mM). Observou-se uma boa repetibilidade em dez curvas de voltamogramas sucessivas (Figura 3).

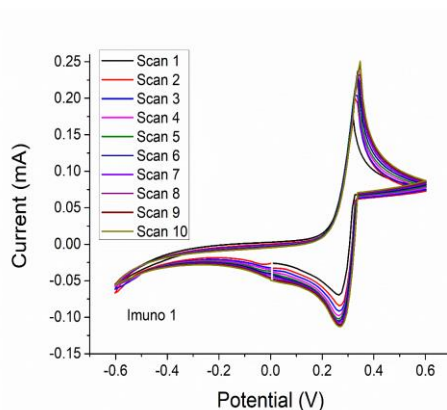


Figura 3- Curvas de VC para imunossensor com 10 scans sucessivos

3.2 Ensaios de seletividade e especificidade

Utilizando um controle positivo para PCR foi possível comprovar a especificidade do imunossensor desenvolvido (Figura 4a). O teste de Dot Blot usando antígenos de diferentes proteínas incubados com anticorpo anti-PCR (Figura 4b) indicou a pureza da proteína PCR utilizada e a alta seletividade do anticorpo. Houve redução do I_{pa} à medida que há adição de PCR tornando mais resistivo (Figura 5).

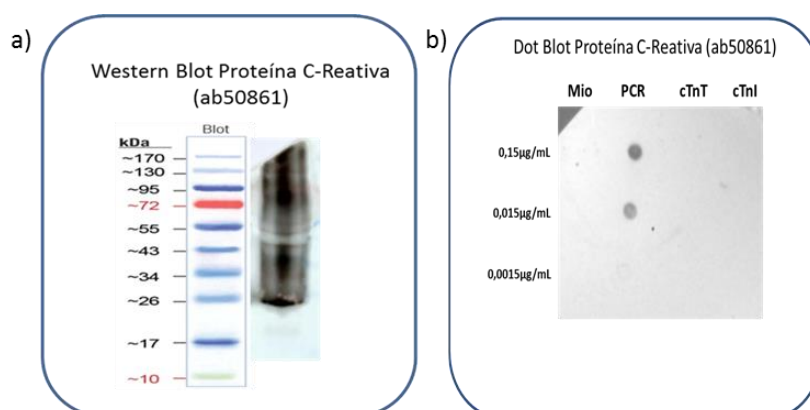


Figura 4 – Técnica de Western Blot com banda em ~26 kDa (a); e teste de Dot blot para PCR com comprovação da especificidade do anticorpo (b)

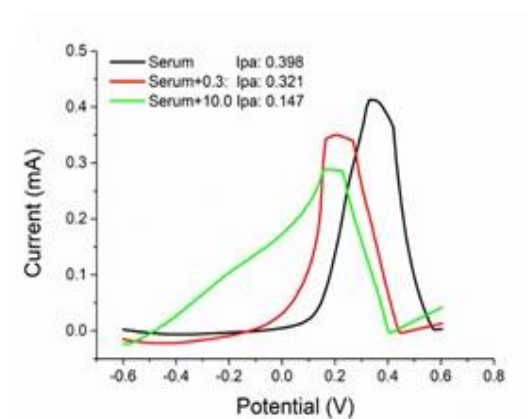


Figura 5 – DPVs obtidos para soro fetal bovino puro e na presença de 0.3 e 10.0 mg L⁻¹ de PCR

4. Conclusões

Apresentamos um biossensor produzido em um eletrodo flexível, fácil de usar e de baixo custo o que potencializa sua aplicação como dispositivo POC. Os resultados obtidos mostram que o imunossensor desenvolvido apresentou boa estabilidade e especificidade, sem reação cruzada com outras proteínas com excelente seletividade.

Referências

- CARVAJAL, S.; FEA, S. N.; JONES, A.; BALDO, T.A.; MOSA IM, RUSLING J.F, E KRAUSE CE. *Disposable InkJet-Printed Electrochemical Platform for Detection of Clinically Relevant HER-2 Breast Cancer Biomarker*. Biosens Bioelectron. 2018 May 01; 104: 158–162. doi:10.1016/j.bios.2018.01.003
- EGGERS, K.M.; BARON, T.; HJORT, M.; NORDENSKJÖLD, A.M.; TORNVALL, P. & LINDAHL, B. *Clinical and prognostic implications of C-reactive protein levels in myocardial infarction with nonobstructive coronary arteries*. Clin Cardiol. 2021 Jul;44(7):1019-1027. doi: 10.1002/clc.23651. Epub 2021 May 25. PMID: 34032303; PMCID: PMC8259160.

GABAY, C. & KUSHNER, I. *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*, *N. Engl. J. Med.* 340 (1999) 448–454.

HEMMIG E., TEMIZ Y., GOKCE O., LOVCHIK R. D., E DELAMARCHE E. *Anal. Chem.* 2020, 92, 1, 940-946. <https://doi-org.ez106.periodicos.capes.gov.br/10.1021/acs.analchem.9b03792>

HIRSCHFIELD, G.M. & PEPYS, M.B. *C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule*, *Qjm.* 96 (2003) 793–807.

HOLZKNECHT, M.; TILLER, C.; REINDL, M.; LECHNER, I.; TROGER, F.; HOSP, M.; MAYR, A.; BRENNER, C.; KLUG, G.; BAUER, A.; METZLER, B. & REINSTADLER, S.J. *C-reactive protein velocity predicts microvascular pathology after acute ST-elevation myocardial infarction*. *Int J Cardiol.* 2021 Sep 1;338:30-36. doi: 10.1016/j.ijcard.2021.06.023. Epub 2021 Jun 18. PMID: 34147553.

KUMAR, M.S.; RUCHIRA, N.; SHAIK, B. L.; KIRTI, M.; MAHESHWAR, M.; et al. *Electrochemical sensing of SARS-CoV-2 amplicons with PCB electrodes*. *Sensors and Actuators: B. Chemical* 343 (2021) 130169. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130169>

MEISEL, S.R.; NASHED, H.; NATOUR, R.; ABU FANNE, R.; SAADA, M.; AMSALEM, N.; LEVIN, C.; KOBO, O.; FRIMMERMAN, A.; LEVI, Y.; MOHSEN, J.; SHOTAN, A.; ROGUIN, A. & KLEINER-SHOCHAT, M. *Differentiation between myopericarditis and acute myocardial infarction on presentation in the emergency department using the admission C-reactive protein to troponin ratio*. *PLoS One.* 2021 Apr 22;16(4):e0248365. doi: 10.1371/journal.pone.0248365. PMID: 33886564; PMCID: PMC8062049

ØRN, S.; CORD MANHENKE, THOR UELAND, JAN K. DAMÁS, TOM EIRIK MOLLNES, THOR EDVARSEN, PÅL AUKRUST, KENNETH DICKSTEIN, *C-reactive protein, infarct size, microvascular obstruction, and left-ventricular remodelling following acute myocardial infarction*, *European Heart Journal*, Volume 30, Issue 10, May 2009, Pages 1180–1186, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp070>

REINDL, M.; REINSTADLER, S.J.; FEISTRITZER, H-J.; KLUG, G.; TILLER, C.; MAIR, J.; MAYR, A.; JASCHKE, W. & METZLER, B. *Relation of inflammatory markers with myocardial and microvascular injury in patients with reperfused ST-elevation myocardial infarction*. *European Heart Journal. Acute Cardiovascular Care*, Volume 6, Issue 7, 1 October 2017, Pages 640–649, <https://doi.org/10.1177/2048872616661691>.

SEO, G.; LEE, G.; JEONG KIM, M.; BAEK, S.; CHOI, M.; KU, K.B.; LEE, C.S.; JUN, S.; PARK, D.; KIM, H.G.; KIM, S.J.; LEE, J.O.; KIM, B.T.; PARK, E.C. & KIM, S.I. *Rapid Detection of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2) in Human Nasopharyngeal Swab Specimens Using Field-Effect Transistor Based Biosensor*. *ACS Nano.* 2020 Apr 28;14(4):5135-5142. doi: 10.1021/acsnano.0c02823. Epub 2020 Apr 20. Erratum in: *ACS Nano.* 2020 Sep 22;14(9):12257-12258. PMID: 32293168; PMCID: PMC7172500

SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, N.; MISHRA, P.K. & MALHOTRA, B.D. *Prospects of nanomaterials-enabled biosensors for COVID-19 detection*. *Science of the Total Environment* 754 (2021) 142363. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142363>

THÉROUX, P.; ARMSTRONG, P.W.; MAHAFFEY, K.W.; HOCHMAN, J.S.; MALLOY, K.J.; ROLLINS, S.; NICOLAU, J.C.; LAVOIE, J.; LUONG, T.M.; BURCHENAL, J. & GRANGER, C.B. *Prognostic significance of blood markers of inflammation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty and effects of pexelizumab, a C5 inhibitor: a substudy of the COMMA trial*, *European Heart Journal*, Volume 26, Issue 19, October 2005, Pages 1964–1970, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi292>

VILIAN, A.T.E.; KIM, W.; PARK, B.; OH, S.Y.; KIM, T.; HUH, Y.S.; HWANGBO, C.K. & HAN, Y.-K. *Efficient electron-mediated electrochemical biosensor of gold wire for the rapid detection of C-reactive protein: A predictive strategy for heart failure*. *Biosens. Bioelectron.* 142 (2019) 111549.

YIP, H-K.; HANG, C-L.; FANG, C-Y.; HSIEH, Y-K.; YANG, C-H.; HUNG, W-C. & WU, C-J. *Level of High-Sensitivity C-Reactive Protein Is Predictive of 30-Day Outcomes in Patients With Acute Myocardial Infarction Undergoing Primary Coronary Intervention*. *Chest*, Volume 127, Issue 3, 2005, Pages 803-808, ISSN 0012-3692, <https://doi.org/10.1378/chest.127.3.803>