

## NANOIMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA HEPATITE B

E. K. G. Trindade\*, E. C. L. Soares\*, P. M. S. Silva\*, D. G. A. Cabral\*, E. Fontana\*\*, R. F. Dutra\*

\*Laboratório de Eng. Biomédica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

\*\*Departamento de Eletrônica e Sistemas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil  
e-mail: rosa.dutra@ufpe.br

**Resumo:** A infecção com vírus da hepatite B (HBV) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, estimando-se que 350 milhões de pessoas em todo o mundo têm infecção crônica por HBV, o que representa cerca de 5% da população mundial. Diante do alto custo e da necessidade de equipe especializada no diagnóstico, busca-se o desenvolvimento de um nanoimunossensor para detecção de anticorpos contra o vírus da Hepatite B. Sobre um eletrodo de ouro, foi montada uma matriz de imobilização para antígenos do core da Hepatite B (HBcAg) usando um polímero aminado (politiramina) com nanotubos de carbono (NTC) carboxilados na superfície sensora. Os NTCs promovem aumento da transferência de elétrons, servem como âncoras de biomoléculas e aumentam a superfície de imobilização. A técnica de Voltametria Cíclica (VC) foi utilizada para comprovar todo o processo. A matriz Tyr/NTC-COOH se encontra aderida de forma estável na superfície do eletrodo e pode servir como uma plataforma ideal para o ancoramento dos HBcAg.

**Palavras-chave:** Nanoimunossensor, nanotubos de carbono, politiramina, Voltametria Cíclica, HBcAg.

**Abstract:** *Infection with Hepatitis B Virus (HBV) is a major cause of morbidity and mortality, it is estimated that 350 million people worldwide have chronic HBV infection, which represents about 5% of world population. Given the high cost and the need for specialized staff in the diagnosis, we seek to develop a nanoimmunossensor for antibodies against Hepatitis B. Over a gold electrode was assembled an immobilization matrix for core antigens of Hepatitis B (HBcAg) using an amine polymer (polytyramine) and carboxylated carbon nanotubes (NTC) in the sensor surface. The CNTs promote increased transfer of electrons, serve as anchors of biomolecules and increase immobilization surface. The technique of Cyclic Voltammetry (CV) was used to confirm the process. The Tyr/NTC-COOH matrix remained stable in the electrode surface and can be used as an ideal platform for HBcAg anchoring.*

**Keywords:** *Nanoimmunossensor, carbon nanotubes, polytyramine, Cyclic Voltammetry, HBcAg.*

### Introdução

A infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV) representa uma importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente nos países em

desenvolvimento. Estima-se que 350 milhões de pessoas no mundo tenham infecção crônica pelo HBV, representando aproximadamente 5% do total da população. A transmissão do HBV se faz fundamentalmente através das vias parenteral e sexual. Estima-se que pelo menos um terço da população mundial já esteve em contato com o vírus [1,2].

Por se tratar de uma doença infectocontagiosa de grande morbimortalidade, é grande a preocupação dos serviços de saúde pública na contenção e prevenção da doença. Neste sentido, os serviços de hemoterapia realizam a investigação de marcadores sorológicos que possam denunciar o contágio ou a infecção pelo HBV nas bolsas de sangue coletadas. No entanto, esses testes apenas são feitos após a coleta do sangue, o que proporciona uma grande taxa de descarte de bolsas nesses serviços. Embora diminuindo, essa taxa ainda continua alta no Brasil quando comparado com países desenvolvidos. Por isso, a infecção pelo HBV é uma das principais causas dos descartes das bolsas de sangue [3]. Neste sentido, o desenvolvimento de um imunossensor para detecção do anti-HBc para uso na pré-triagem de doadores sanguíneos é de fundamental importância na redução dos custos com bolsas de sangue dos hemocentros.

Os imunossensores são baseados em reações imunológicas específicas, tendo antígeno ou anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. Atualmente, os anticorpos que são produzidos contra o antígeno do core do vírus da Hepatite B (anti-HBc) foram reportados como os mais importantes marcadores na triagem de pacientes que tiveram contato com o vírus da Hepatite B. Todos os anti-HBc indicam infecção, sendo que a IgG anti-HBc persiste por toda a vida e indica infecção passada, sendo por isso a mais usada [4,5].

Diferentes tipos de transdutores são utilizados para imunossensores, tais como eletroquímico, óptico e piezoelétrico. Nanomateriais têm sido relatados como uma melhora na sensibilidade destes transdutores. Os nanotubos de carbono (CNT) têm atraído grande interesse devido ao aumento da transferência de elétrons, ancoragem de biomoléculas após a sua funcionalização e também para ampliar a superfície ativa. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um imunossensor para detecção do anti-HBc através da imobilização do antígeno (HBcAg) em um eletrodo de ouro nanoestruturado formado por nanotubos de carbono carboxilados [6,7].

## Materiais e métodos

**Materiais** – Tyramine (Tyr), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida adquiridos na Sigma-Aldrich; Nanotubos de carbono multicamadas funcionalizados com grupos carboxílicos (NTC-COOH) adquiridos da DropSens. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

**Aparelhos e Medições**– A técnica usada para os estudos eletroquímicos foi a de Voltametria Cíclica (VC), num sistema composto por três eletrodos, eletrodo de trabalho de ouro, eletrodo auxiliar helicoidal de platina e um eletrodo de referência de Ag/AgCl, que se encontravam em uma célula de vidro fechada. As medições foram acompanhadas por um potenciostato/galvanostato Ivium CompactStat (Netherlands) acoplado a um microcomputador e controlado pelo software IviumSoft. As medições de voltametria foram efetuadas em solução de KCl (100 mmol/L) contendo 5 mmol/L de  $K_3Fe(CN)_6$  e 5 mmol/L de  $K_4Fe(CN)_6$  como sonda redox.

**Dispersão e ativação de NTC-COOH** – Uma solução de 1 mg de NTC-COOH em 1 ml de Dimetilformamida foi preparada e sonicada em banho ultrassônico durante 2 h para formação de uma suspensão homogênea. Os nanotubos foram então ativados em solução de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida e N-hidroxisuccinimida (20 mmol/L de EDC e 50 mmol/L NHS) preparada no momento do uso e deixada em temperatura ambiente por 30 min, na proporção de 1:1.

**Pré-tratamento e modificação do eletrodo de trabalho** – Após o polimento mecânico do eletrodo de trabalho em alumina 0.3  $\mu$ m para remoção de impurezas presentes na superfície (pré-tratamento), seguida de lavagem com água destilada, foi confirmada a limpeza por VC. Em seguida, foi realizada a eletropolimerização da Tyr (2,5 mM) em  $H_2SO_4$  a 0,1 M. Foram efetuados 10 ciclos de VC para obtenção do filme polimérico. Em seguida, 10  $\mu$ L da suspensão de NTC-COOH ativado com EDC/NHS foram gotejados na superfície modificada do eletrodo e deixados na estufa a 40 °C até total evaporação do solvente.

## Resultados

**Otimização da Concentração de Politiramina (Tyr)** – Primeiramente, foi realizado um estudo com diferentes concentrações de Tyr (1; 1,5; 2,5; 3,5 e 5 mM), obtendo-se a curva de concentração vs corrente. (Fig. 1), a qual mostra a variação de corrente de cada concentração com relação ao eletrodo em seu estado limpo, observando-se a concentração ótima de 2,5 mM.

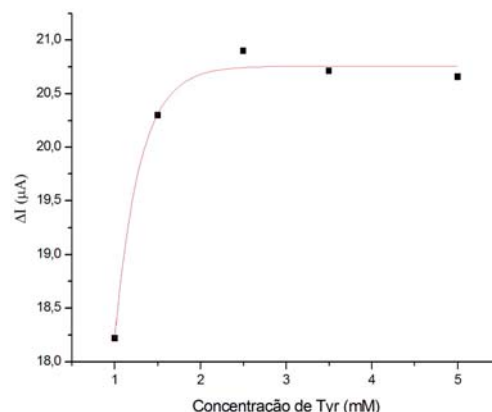


Figura 1: Curva de concentração da politiramina com valores de 1; 1,5; 2,5; 3,5 e 5 mM.

**Modificação com NTC-COOH** – Depois da polimerização do filme foram adicionados os NTC-COOH ativados, os quais proporcionaram o aumento da amplitude dos picos de oxidação e redução conforme perfil voltamétrico (Fig. 2).

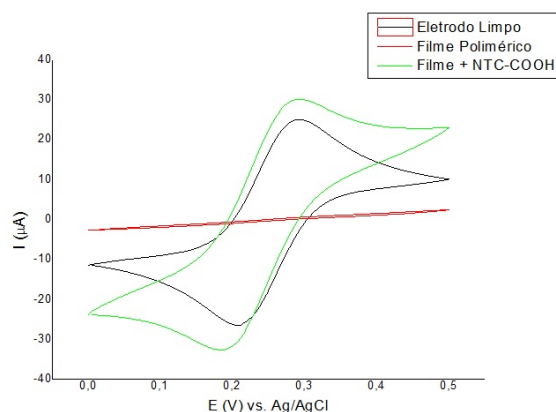


Figura 2: Aumento amplitude dos picos de oxidação e redução mediado por NTC-COOH.

**Estudos mecanísticos** – Este estudo consiste de diversos VCs em diferentes velocidades de varredura (10 a 120 mV/s) (Fig. 3 (a)). Nestes VCs foi observada a variação dos picos de oxidação e redução de acordo com a velocidade de varredura. Ambos os picos de corrente aumentaram linear e proporcionalmente com o aumento da velocidade de varredura, demonstrando que o processo é reversível e controlado por difusão (Fig. 3 (b)).

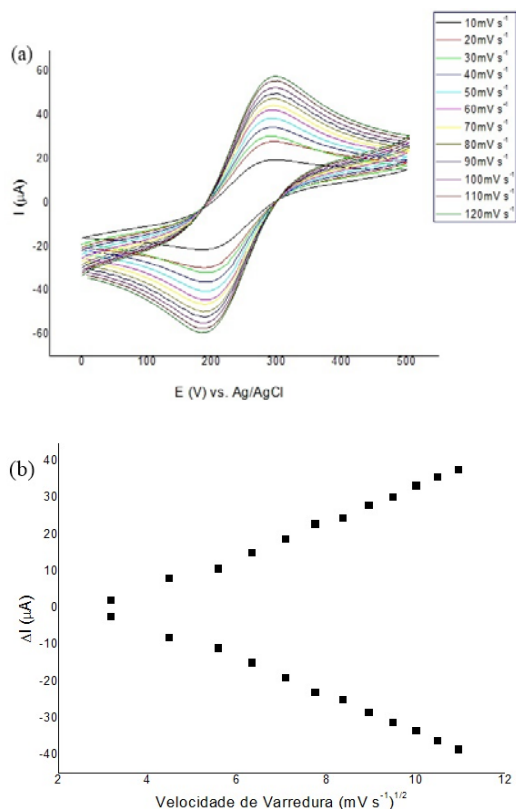


Figura 3: (a) Voltamogramas cíclicos nas velocidades de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120  $\text{mV s}^{-1}$  (de dentro para fora); (b) Variação os picos de corrente com relação à velocidade de varredura.

**Estudo de Estabilidade da Matriz Sensora** – Foi realizado mantendo-se a velocidade em  $50 \text{ mV s}^{-1}$  durante 20 ciclos de VC (Fig. 4). Não houve alterações significativas nos VCs, demonstrando, assim, a estabilidade da matriz Tyr/NTC-COOH.

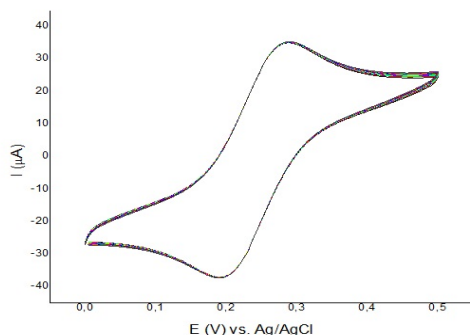


Figura 4: Estudo de estabilidade da matriz Tyr/ NTC-COOH.

## Discussão

A politiramina, por ser um polímero aminado, proporciona uma melhor imobilização dos NTC-COOH através da formação de ligações amida. O polímero se mostrou isolante neste aspecto, visto que à medida que a concentração da Tyr aumenta, a diferença entre os picos

de oxidação do eletrodo limpo e do eletrodo com filme ( $\Delta I$ ) também aumenta, o que foi observado pela diminuição da transferência de carga na superfície do eletrodo. Após a adição dos NTCs foi observado o aumento da amplitude dos picos de oxidação e redução, o que confirma o seu ancoramento sobre o filme e sua capacidade de aumentar a transferência de cargas na superfície do eletrodo. Os estudos de estabilidade e velocidade mostraram que a matriz Tyr/NTC-COOH se encontra aderida de forma estável na superfície do eletrodo e pode servir como uma plataforma ideal para o ancoramento dos HBCAg.

## Conclusão

O imunossensor em desenvolvimento apresenta elevado potencial para triagem de doadores de sangue, podendo diminuir o desperdício de bolsas de sangue nos bancos de hemoderivados. A matriz de imobilização se mostrou estável e pode ainda ser usada para portabilização do sensor para uso point-of-care.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao financiamento da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Referências

- [1] Ferreira MF. Diagnóstico E Tratamento Da Hepatite B. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 33(4):389-400, jul-ago, 2000.
- [2] Alvariz RC. Hepatite Crônica Pelo Vírus B (HBV). Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ; Ano 5, Janeiro / Junho de 2006.
- [3] Salles NA, Sabino EC, Barreto CC, Barreto AME, Otani MM, Chamone DF. Descarte De Bolsas De Sangue E Prevalência De Doenças Infecciosas Em Doadores De Sangue Da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro De São Paulo. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health 13(2/3), 2003
- [4] Castelo A, Pessoa MG, Barreto TCBB, Alves MRD, Araújo DV. Estimativas De Custo Da Hepatite Crônica B No Sistema Único De Saúde Brasileiro Em 2005. Revista da Associação Medicina Brasileira, 53(6): 486-91, 2007.
- [5] Kwon SY, Lee CH. Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection The Korean Journal of Hepatology 2011;17:87-95
- [6] Herbst MH, Macêdo MIF, Rocco AM. Tecnologia Dos Nanotubos De Carbono: Tendências E Perspectivas De Uma Área Multidisciplinar. Quim. Nova, Vol. 27, No. 6, 986-992, 2004
- [7] Gomes-Filho SLR, Dias ACMS, Silva MMS, Silva BVM, Dutra RAF. Carbon Nanotube-Based Electrochemical Immunosensor For Cardiac

Troponin T. Microchemical Journal (Print), v. 01, p.  
13-010, 2012.