Ana Beatriz Ferreira Vitoreti

***“DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR
ELETROQUÍMICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE TOXINAS DE
SERPENTES”***

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título em mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Luiz Henrique Mazo

São Carlos
2014

Observe com otimismo as dificuldades que apareçam, interpretando-as por lições necessárias. (André Luiz)

Onde há amor e sabedoria não tem temor e nem ignorância. (São Francisco de Assis)

Dedico este trabalho

Acima de tudo a Deus por me dar forças e me mostrar do que sou capaz em todos os momentos.

Ao meu pai Luiz Rafael Vitoreti que sempre me apoiou em todas as circunstâncias.

À Dirce pelo apoio e sábios conselhos.

À tia Elci pelo carinho, orações e apoio.

Aos demais familiares e amigos que acompanharam a minha trajetória.

Ao meu abençoado filho Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo pela oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho, pela orientação e ensinamentos cruciais que contribuíram para meu crescimento acadêmico. Agradeço também pela ajuda e paciência que sempre demonstrou durante todos os momentos do meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Robson Soares de Oliveira Júnior, que desde a graduação, sempre me ajudou e que me proporcionou desenvolver este trabalho em conjunto. Agradeço pelas horas de discussão e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Sérgio Antônio Spínola Machado sempre disposto a ajudar.

Aos técnicos do laboratório GMEME pela ajuda prestada.

Aos colaboradores do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da UFTM em Uberaba por todo auxílio prestado.

Aos amigos pela paciência e compreensão.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
CAPÍTULO 1.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Considerações Gerais	8
1.1.1 Sensores	9
1.1.2 Serpentes.....	13
1.2 Teoria do Método	19
1.2.1 Técnicas Voltamétricas	19
1.2.2 Microscopia de Força Atômica.....	23
1.3 Objetivos.....	26
1.4 Justificativa.....	26
CAPÍTULO 2.....	29
2 MATERIAIS E MÉTODOS	29
2.1 Parte Experimental.....	29
2.1.1 Reagentes e Materiais Utilizados.....	29
2.1.2 Soluções.....	30
2.1.3 Eletrodos.....	30
2.1.4 Células Eletroquímicas.....	31
2.2 Equipamentos.....	32
2.3 Imobilização dos Anticorpos.....	32
CAPÍTULO 3.....	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
CAPÍTULO 4.....	46
4 CONCLUSÃO.....	46
CAPÍTULO 5.....	47
5 TRABALHOS FUTUROS.....	47
CAPÍTULO 6.....	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

RESUMO

O desenvolvimento de biossensores é um tema de pesquisa bastante promissor, uma vez que permite monitorar diversas classes de substâncias, que muitas vezes apresentam grande interesse nas mais diversas áreas da ciência. Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado na reação com o analito-alvo. Podem ser utilizados diversos elementos, sendo os principais, atualmente, aqueles baseados em aptâmeros e nanomateriais, por sua alta especificidade e sensibilidade. Seu potencial de utilização varia desde a detecção e tratamento de doenças ou a medição de componentes nos fluidos biológicos, até o monitoramento ambiental e prevenção de contaminação e bioterrorismo. Neste projeto foi desenvolvido um biossensor eletroquímico cujo objetivo é identificar toxinas inoculadas em pacientes que sofreram acidentes com animais peçonhentos.

Foram utilizados os anticorpos/imunoglobulinas comerciais e a peçonha bruta de jararaca (*Bothrops*) para fazer o estudo/desenvolvimento do biossensor.

Neste trabalho foram apresentados os resultados da imobilização dos anticorpos (imunoglobulinas) sobre o eletrodo de trabalho, bem como sua resposta eletroquímica utilizando voltametria cíclica.

As soluções utilizadas foram de NaCl 0,9% e tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) com pH=7,4 por ser bem próximo ao pH fisiológico, pois, posteriormente quer se investigar em plasma sanguíneo.

Os voltamogramas cíclicos e a microscopia eletrônica de varredura mostraram a diferença do eletrodo com e sem a imobilização das imunoglobulinas, evidenciando que o biossensor é eficaz para o sistema analisado, sendo promissor aos estudos.

Com o biossensor construído, foi investigada a resposta eletroquímica relativa à interação antígeno-anticorpo (veneno-soro) para analisar a interação específica entre eles, sendo o resultado positivamente o esperado.

ABSTRACT

The development of biosensors is a research topic very promising, since it allows you to monitor various classes of substances, which often exhibit great interest in several areas of science. Biosensors are small devices that use biological recognition elements and components, bound to a self-detecting system, transduction and amplification of the signal generated in the reaction with the target analyte it. Various elements, the main currently those based on aptamers and nanomaterials for their high specificity and sensitivity can be used. Their potential use varies from the detection and treatment of diseases or measurement of components in biological fluids to the environmental monitoring and contamination prevention and bioterrorism. In this project we developed an electrochemical biosensor whose objective is to identify toxins in patients who have suffered accidents with poisonous animals.

Antibodies / commercial immunoglobulins and the crude venom of pit viper (Bothrops) were used to study / development of the biosensor.

In this work the results of immobilization of antibodies (immunoglobulins) on the working electrode and its electrochemical response using cyclic voltammetry were presented.

The solutions used were 0.9% NaCl and phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹) of pH = 7.4 to be close to physiological pH and therefore further investigated whether in blood plasma.

Cyclic voltammetry and scanning electron microscopy showed the difference of the electrode with and without immobilization of immunoglobulins, indicating that the biosensor is effective for the system analyzed, and promising to studies.

With the biosensor constructed, we investigated the electrochemical response on the antigen-antibody (venom antiserum) interaction to analyze the specific interaction between them, the result being positively expected.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

Existe grande empenho do meio científico para desenvolvimento de novos métodos para determinação de substâncias prejudiciais à saúde humana. Diante disso, diversos grupos de pesquisas em todo mundo tem se empenhado em temas de pesquisas como determinações de pesticidas [1 - 6] e metais pesados [7, 8] em diferentes matrizes. Porém, ainda não se tem falado muito sobre a identificação de toxinas de animais peçonhentos, tais como cobras, escorpiões e aranhas.

Esse assunto é de grande relevância, pois no Brasil existem muitos acidentes com estes tipos de animais, onde a rapidez no atendimento aos pacientes é de extrema importância, para que não leve a amputações do membro acometido pelo acidente ou até mesmo a morte [9]. Neste sentido, o desenvolvimento de biossensores que possam fornecer diagnósticos rápidos e precisos sobre o gênero da serpente que levou ao acidente é de grande valia, pois possibilita ministrar o tratamento correto rapidamente.

1.1.1 Sensores

Biossensores são pequenos dispositivos que utilizam reações biológicas para detecção de analitos-alvo [10]. Tais dispositivos combinam um componente biológico, que interage com um substrato-alvo, a um transdutor físico, que converte os processos de biorreconhecimento em sinais mensuráveis [10, 11].

Conforme apresentado na Figura 1.1, os biossensores são construídos a partir de um componente que introduz a amostra, um sistema de reconhecimento molecular, um transdutor e uma unidade processadora de sinal [12].

Figura 1.1 - Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais. A detecção do analito-alvo é feita por um componente biológico que gera um sinal (A), o qual é convertido (B) e processado (C).

Fonte: Calil e da Silva, **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade**, p. 3.

Os principais sistemas de introdução de amostra são os canais microfluídicos e o sistema de análise por injeção em fluxo (FIA—*flow injection analysis*) [13, 14].

No sistema de reconhecimento está a parte que entra em contato com o analito de interesse e produz um sinal [15]. Pode ser um receptor, enzima, anticorpo, ácido nucléico, aptâmero, entre outros [11]. As técnicas mais comuns de imobilização são adsorção física (interações do tipo iônica e polar e ligação de hidrogênio), ligação cruzada (reticulação), oclusão ou aprisionamento, ligação

covalente e covalente cruzada, encapsulamento e microencapsulamento. A estabilidade das técnicas de imobilização determina a sensibilidade e confiabilidade do sinal do biossensor, devido à preservação dos sítios ativos da molécula [14, 16].

Os biossensores trazem uma série de vantagens, pois são altamente sensíveis e seletivos, relativamente fáceis em termos de desenvolvimento, além de acessíveis e prontos para uso. Entretanto, há certas limitações, como interferências eletroquimicamente ativas na amostra, pouca estabilidade em longo prazo e problemas de transferência de elétrons [16, 17].

Os biossensores podem ser de detecção direta (sensor de detecção direta ou sistema não reticulado), nos quais a interação biológica é medida diretamente, havendo uso de um ligante não-catalítico, como receptores celulares e anticorpos, ou de detecção indireta (sensor marcado ou sistema reticulado), em que há o uso de anticorpos fluorescentemente marcados ou elementos catalíticos, como enzimas. O sistema reticulado tem uma maior estabilidade e é mais simples para usar, mas o sistema não reticulado tem melhor sensibilidade, tempo de operação mais curto e custos mais baixos [11, 16, 18]. Há dois tipos de biossensores, dependendo da natureza do evento de reconhecimento. Dispositivos de bioafinidade, que dependem da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso à superfície (por exemplo, anticorpo ou sonda oligonucleotídica) e dispositivos bioanalíticos, nos quais uma enzima imobilizada é usada para o reconhecimento do substrato-alvo [10]. A seletividade do reconhecimento do analito, pelo componente biológico ativo, aliada a sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos [19 - 23]. No entanto, na química clínica a determinação de níveis de concentrações aceitáveis, como por exemplo, de drogas ou hormônios devem ser da ordem de 10^{-9} mol L⁻¹. Deste modo, há a necessidade do desenvolvimento de metodologias confiáveis com detecções nessa faixa de concentração. Neste caso, a tecnologia imunológica, que é baseada na habilidade do anticorpo formar complexo com o antígeno correspondente é essencial, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade.

Anticorpos são glicoproteínas de formato globular secretadas por linfócitos B que conferem a característica de especificidade da resposta imune adquirida humoral.

É formado por duas cadeias polipeptídicas: duas cadeias idênticas entre si denominadas cadeias pesadas e duas cadeias idênticas entre si chamadas de cadeias leves. As cadeias leves se ligam as cadeias pesadas por ligações de dissulfeto. Distribuídos pelas cadeias encontram-se estruturas denominadas domínios, sequências repetitivas de aminoácidos que assumem conformações particulares, podendo ser constantes ou variáveis. Os anticorpos são classificados de acordo com o tipo de cadeia pesada que apresentem [isotipos gama (γ), mu (μ), épsilon (ϵ), delta (δ) e alfa (α)]: γ -IgG (subclasses IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4), δ -IgD, ϵ -IgE, μ -IgM e IgG α -IgA (subclasses IgA1 e IgA2). As cadeias pesadas de uma molécula de IgG interagem até o fim e, então se ramificam separadamente com as duas cadeias leves formando uma molécula na forma de Y.

Nas separações, as imunoglobulinas podem sofrer clivagem por meio de proteases. A clivagem com papaína libera um fragmento basal chamado Fc devido à sua cristalização imediata e as duas ramificações, chamadas Fab, fragmentos de ligação dos antígenos. Cada uma das ramificações apresenta um sítio de ligação com antígenos. A Figura 1.2 apresenta a estrutura de um anticorpo.

Figura 1. 2 – Estrutura da Imunoglobulina IgG

Fonte: Sem autor mencionado, **Estrutura, Função e Diversidade das Imunoglobulinas** [54].

Um antígeno é qualquer molécula ou patógeno capaz de provocar uma resposta imunológica. Pode ser um vírus, uma parede celular bacteriana ou uma proteína individual ou outra macromolécula. Um antígeno complexo pode ser ligado a diferentes anticorpos. Um anticorpo individual ou receptor de uma célula T se liga apenas a estrutura molecular particular dentro do antígeno, chamado de determinante antigênico ou epítopo. Moléculas menores do que 5.000 unidades de massa atômica não são consideradas antigênicas. Contudo, pequenas moléculas podem se ligar covalentemente a proteínas grandes e induzir uma resposta imunológica. Essas pequenas moléculas são chamadas de haptenos. Anticorpos produzidos em resposta aos haptenos ligados a proteínas se ligarão às mesmas moléculas pequenas quando elas estiverem livres. Esse tipo de situação é realizado para produzir anticorpos para o desenvolvimento de novos testes analíticos. A ligação entre o anticorpo e o antígeno é o resultado de ligações químicas entre ambas as moléculas, podendo ocorrer diferentes tipos de interações e diferentes números de ligações. São forças químicas não covalentes reversíveis que regem essa interação juntamente com as conformações do antígeno e do Fab do anticorpo.

A ligação entre o anticorpo e o antígeno pode ser vista na Figura 1.3.

Figura 1. 3 – Ligação do anticorpo IgG ao antígeno

Fonte: Sem autor mencionado, **Imunoglobulina-Wikipedia. [55]**

A construção de biossensores baseados nas interações antígeno e anticorpos se tornaram importantes, principalmente na área médica, onde está fundamentado o estudo do sistema imunológico.

A imunointeração entre proteínas em solução com suas proteínas complementares, imobilizadas sobre uma superfície, pode ser avaliada por meio de mudanças no índice de refração, espessura e constante dielétrica da camada de proteínas imobilizadas. Também se podem avaliar essas imunointerações por meio de medidas eletroquímicas e piezoelétricas [24 - 27].

Devido à possibilidade de ambos, antígeno e anticorpo, não apresentarem respostas eletroquímicas, isto é, variações de corrente e carga, os primeiros imunossensores utilizaram-se de técnicas ópticas e condutimétricas.

Até o presente momento, não foram relatados trabalhos na literatura sobre biossensores eletroquímicos e piezoelétricos para identificação de toxinas de serpentes peçonhentas. O desenvolvimeto de biossensores para esse fim permitirá ministrar rapidamente o tratamento correto, reduzindo a possibilidade de danos aos pacientes.

1.1.2 Serpentes

No Brasil existem mais de 370 espécies de serpentes, distribuídas em dez famílias: *Anomalepididae*, *Leptotyphlopidae*, *Typhlopidae*, *Aniliidae*, *Tropidophiidae*, *Boidae*, *Viperidae*, *Elapidae*, *Colubridae* e *Dipsadidae*. Destas 370 espécies, 60 são de cobras venenosas, mas só as pertencentes às famílias *Viperidae* e *Elapidae* são as peçonhentas. As jararacas são as responsáveis pelo maior número de ataques – cerca de 85% do total, já as cascavéis e as surucucus causam pouco mais de 10%

dos acidentes. As corais, apesar da fama de perigosas, precisam ser muito provocadas para darem o bote. Elas respondem por menos de 1% das ocorrências.

O veneno de todas essas serpentes pode matar uma pessoa em pouco tempo, ou em muitos casos, causar grande dor, inflamação, gangrena entre outros problemas. A reação à picada depende de variáveis, tais como a parte do corpo que foi atingida, a quantidade de veneno injetada, o peso da vítima e principalmente o tipo de cobra. Para evitar danos mais sérios às vítimas desses acidentes, especialistas do Butantan recomendam às vítimas que recebam o soro antiofídico o mais rápido possível, de preferência nas três primeiras horas após o ataque. Além das cobras, existem outros animais peçonhentos comuns no Brasil, como aranhas, escorpiões e taturanas, cada um com várias espécies, mas poucas oferecem riscos sérios à saúde humana [9].

Ofidismo é o nome dado a acidentes envolvendo serpentes. No Brasil, a ocorrência anual destes tipos de acidentes é de cerca de 15 casos para cada 100.000 habitantes, sendo mais frequentes nos meses mais chuvosos e quentes. Em caso de acidentes, a vítima não deve sugar o veneno, deve-se apenas lavar com água e sabão o local atingido, manter o mais imóvel possível e procurar auxílio médico, a fim de receber o soro antiofídico [28].

No período de 1990 a 1995 os acidentes por animais peçonhentos ocupava o 5º lugar na listagem de Agravos de Notificação, tendo como média 32.000 casos. Já no período de 2001 a 2006 média subiu muito, sendo de 70.082 casos, e ocupando assim a 3ª colocação [28]. Em 2009, as regiões sul e sudeste foram as que apresentaram maior número de casos de acidentes (Tabela 1.1).

Com o aumento do número de casos registrados e a periculosidade dos venenos inoculados pelas serpentes, vê-se a necessidade da rapidez do atendimento médico e identificação da mesma, a fim de dar o soro antiofídico correto.

Tabela 1. 1 - Casos de Intoxicação por Serpentes por Unidade Federada, Segundo Evolução Registrada em 2009.

Agente	Evolução							Total	
	Cura	Cura não	Seqüela	Óbito	Óbito outra	Outra	Ignorada	nº	%
	nº	Confirmada nº	nº	nº	Circunstância nº	nº	nº		
NORTE	65	19	1	-	-	1	3	89	1,81
Amazonas	5	-	-	-	-	-	-	5	0,10
Pará	60	19	1	-	-	1	3	84	1,71
NORDESTE	833	5	-	8	-	4	30	880	17,94
Ceará	68	1	-	1	-	1	2	73	1,49
Rio Grande do Norte	139	-	-	-	-	-	-	139	2,83
Paraíba	437	3	-	5	-	2	27	474	9,66
Piauí	-	1	-	-	-	1	1	3	0,06
Pernambuco	71	-	-	1	-	-	-	72	1,47
Bahia	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Sergipe	118	-	-	1	-	-	-	119	2,43
SUDESTE	1197	23	1	-	1	22	80	1324	26,99
Minas Gerais	95	-	-	-	-	19	19	133	2,71
Espírito Santo	969	20	1	-	1	-	23	1014	20,67
Rio de Janeiro	28	3	-	-	-	3	6	40	0,82
São Paulo	105	-	-	-	-	-	32	137	2,79
SUL	711	597	31	1	-	1	42	1383	28,20
Paraná	232	8	-	1	-	1	5	247	5,04
Santa Catarina	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Rio Grande do Sul	479	589	31	-	-	-	37	1136	23,16
CENTRO - OESTE	1055	164	-	3	-	3	4	1229	25,06
Mato Grosso do Sul	133	7	-	1	-	-	3	144	2,94
Mato Grosso	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Goiás	868	139	-	2	-	-	1	1010	20,59
Distrito Federal	54	18	-	-	-	3	-	75	1,53
Total	3861	808	33	12	1	31	159	4905	100
%	78,72	16,47	0,67	0,24	0,02	0,63	3,24	100	

Fonte: MS/FIOCRUZ/SINITOX

As manifestações clínicas após os acidentes são relatadas em função do gênero da serpente:

- Acidente botrópico Gênero *Bothrops* – causado por serpentes do grupo das jararacas (Figura 1.4a): dor e inchaço no local da picada, às vezes com manchas arroxeadas e sangramento pelos orifícios da picada; sangramentos em gengivas, pele e urina. Pode evoluir com complicações como infecção e necrose na região da picada e insuficiência renal.

- Acidente laquéutico Gênero *Lachesis* – causado por surucucu (Figura 1.4b): quadro semelhante ao acidente botrópico, acompanhado de vômitos, diarreia e queda da pressão arterial.
- Acidente crotálico Gênero *Crotalus* – causado por cascavel (Figura 1.4c): no local sensação de formigamento, sem lesão evidente; dificuldade de manter os olhos abertos, com aspecto sonolento, visão turva ou dupla, dores musculares generalizadas e urina escura.
- Acidente elapídico Gênero *Micrurus* – causado por coral verdadeira (Figura 1.4d): no local da picada não se observa alteração importante; as manifestações do envenenamento caracterizam-se por visão borrada ou dupla, pálpebras caídas e aspecto sonolento [9].

Figura 1. 4 – Tipos de cobras mais comumente encontradas e responsáveis por acidentes no Brasil

Fonte: Sem autor mencionado, **Serpentes**, Zoologia Comunidades. [56]

Convém lembrar que serpentes não peçonhentas também podem causar acidentes e que nem sempre as serpentes peçonhentas conseguem inocular veneno por ocasião do acidente. Grande parte dos acidentes ofídicos (aproximadamente 46%) é causada por serpentes consideradas não peçonhentas ou por serpentes peçonhentas que não chegaram a causar envenenamento [29]. Essas serpentes pertencem a duas famílias: *Colubrídeos* e *Boídeos*. As cobras da família *Boídae* possuem dentição tipo áglifa e a mordida deixa vários sinais, porém elas não contêm veneno. Nessa família, englobam as jiboias, sursoris, entre outras. Já as serpentes cobra-verde, parelheira e muçurana, pertencem à família *Colubridae*, que possuem dentes inoculadores do tipo opistóglifa e tem-se relatos de acidentes com manifestações clínicas. O veneno destas cobras tem ação hemolítica, proteolítica e coagulante, podendo causar edema local [30].

Algumas pessoas que são picadas por cobras e que não tenham a identificação no ato da mordida podem desenvolver sintomas, mesmo quando nenhum veneno tenha sido inoculado. Pessoas ansiosas podem ter hiperventilação, síncope ou desmaiar e desacelerar o coração, causando assim vários sintomas enganosos.

Quando realmente há inoculação do veneno, ocorre aumento da dor e inchaço local, que gradualmente se estende. Os sinais e sintomas variam de acordo com a espécie responsável pela picada e a quantidade de veneno inoculado.

A peçonha (proteína altamente complexa que é inoculada na corrente sanguínea através de dispositivos que o próprio animal tem para esta finalidade através de dentes ou ferrões) das cobras tem ação do suco digestivo, e por isso causam reações diferentes, dependendo da cobra. As peçonhas podem apresentar ações proteolíticas (levando a necrose), coagulantes, neurotóxicas e até mesmo hemolíticas [30].

- Ação Proteolítica ou Necrosante – decorre da ação citotóxica direta nos tecidos por frações proteolíticas do veneno. Pode haver liponecrose, mionecrose e lise (quebra) das paredes vasculares. Caracteriza-se pela distribuição das proteínas do organismo. Provoca, no local da picada, intensa reação, que gera dor, edema firme, manchas, rubor, bolhas hemorrágicas,

que pode seguir para uma necrose que atinge pele, músculos e tendões. As enzimas proteolíticas podem induzir a liberação de substâncias vasoativas, como bradicinina e histamina, que em envenenamentos graves, podem levar ao choque.

- Ação Coagulante – substâncias que penetram na circulação sanguínea, coagulando o fibrinogênio, que deposita em microcoágulos principalmente nos pulmões, fazendo com que o restante do sangue fique incoagulável, sem que haja, necessariamente, uma hemorragia.
- Ação Neurotóxica – de difícil interpretação fisiopatológica, sendo ainda estudada. A insuficiência respiratória é causa de óbito nas vítimas.
- Ação Hemolítica – a atividade hemolítica (destruição das células vermelhas do sangue) se expressa sob a forma de hemoglobinúria (urinar sangue). Este quadro evolui, quando não convenientemente tratado, para insuficiência renal aguda, causa principal de óbito nos pacientes. As alterações urinárias devido à hemólise não aparecem nas primeiras horas, surgindo entre 12 e 24 horas após o acidente.

De maneira geral, cobras do gênero *Bothrops* tem ação proteolítica e coagulante; do gênero *Lachesis* tem ação proteolítica, coagulante e neurotóxica; do gênero *Crotalus* tem ação hemolítica e neurotóxica; e do gênero *Micrurus* tem somente ação neurotóxica.

O diagnóstico de certeza do acidente ofídico deve ser feito pela identificação da serpente, normalmente isso quase nunca é possível de ser feito de modo confiável. Muitas vezes a administração do soro correto é feita pelo quadro clínico apresentado pela vítima, porém a apresentação de alguns sintomas característicos pode demorar a aparecer, o que pode ser prejudicial à saúde da vítima, podendo assim piorar o seu estado. A conduta nos casos de acidentes com serpentes não peçonhentas exige uma avaliação clínica mais cuidadosa da vítima, procurando-se sinais e sintomas característicos para que possa ajudar no diagnóstico. O tempo de coagulação normal, ausência de sintomas ligados a toxinas neurotóxicas e/ou miogloblinúria sugere o diagnóstico de acidentes por serpentes não peçonhentas. Apesar de ter sido relatado o emprego de soro antibotrópico, essa prática gera controvérsias.

Diante da importância do tema em questão, a construção de biossensores poderá auxiliar no diagnóstico fornecendo o gênero da serpente, agilizando a administração do soro antiofídico correto, minimizando possíveis danos a saúde do acidentado. É importante salientar que o diagnóstico, em casos de crianças acometidas por acidentes ofídicos, deve ser o mais breve possível devido seu baixo peso corpóreo. Em 2003, foi desenvolvido um método novo de diagnóstico que identifica tipo e quantidade de soro necessário para salvar vidas de pacientes acometidos por acidentes com serpentes peçonhentas [31]. O método se baseia em um exame laboratorial: uma amostra do sangue da vítima é centrifugada para que se identifique em seu plasma o tipo de veneno inoculado. Anticorpos equinos específicos são então misturados à amostra do plasma humano numa reação em que é acrescentada uma enzima corante. Quanto maior for a quantidade de veneno inoculada na vítima, mais intensa será sua reação com o anticorpo e mais escura ficará a mistura. A identificação do tipo e da quantidade de veneno leva cerca de 1h30. Entretanto, devido o elevado tempo para se identificar o tipo e quantidade de veneno previsto por esse método, as técnicas eletroanalíticas se mostram como potenciais candidatas para obtenção de análises rápidas e seguras para essa aplicação. Neste contexto, o desenvolvimento de biossensores se justifica, pois é possível se obter resultados confiáveis e poucos minutos.

1.2 Teoria do Método

1.2.1 Técnicas Voltamétricas

A voltametria cíclica é uma técnica cujo princípio básico consiste na medida da corrente gerada em um eletrodo em solução, em função do potencial aplicado neste eletrodo. O eletrodo no qual o potencial é varrido é chamado de eletrodo de

trabalho. Muitos materiais tem sido utilizados como eletrodos de trabalho, mas os mais importantes são mercúrio (Hg), platina (Pt), ouro (Au) e grafite.

Desta forma, a voltametria cíclica é definida como medida (*metria*) da interdependência do potencial do eletrodo (em *Volts por segundo*) com a corrente que circula pelo sistema eletródico da célula eletroquímica (em *Amperes*), portanto a voltametria cíclica é uma função $f\{E,I,T\}=0$.

A técnica consiste em, a partir de um potencial aplicado inicial (E_1), variar o potencial do eletrodo até um potencial final (E_2), e então retornar à mesma velocidade ou não, ao valor inicial ou outro valor qualquer de potencial [32]. Esta programação imposta ao eletrodo de trabalho pode ser observada na Figura 1.5. Na prática utilizam-se velocidades de varreduras entre 10 mV.s^{-1} e 10 KV.s^{-1} , sendo mais comum trabalhar entre 20 e 200 mV.s^{-1} . Assim as equações que descrevem as programações de potenciais nas varreduras direta e reversa são:

$$E = E_1 + v t \text{ (varredura direta)} \quad \text{(Equação 1)}$$

$$E = E_1 - v t \text{ (varredura reversa)} \quad \text{(Equação 2)}$$

O formato do voltamograma cíclico teórico (I versus $(E - E_0)$) é apresentado na Figura 1.6, e ilustra os processos ocorridos na reação:

O pico catódico de corrente pode ser associado com a redução de O para R , enquanto que o pico da varredura reversa refere-se à oxidação de R formado na etapa anterior retornando a O .

Figura 1.5 – Representação esquemática do perfil da varredura voltamétrica potencial-tempo

Fonte: Adaptação do autor a partir de BARD, A., FAULKNER, L., **Electrochemical Methods: fundamentals and applications**, United States of American, John Wiley, 2nd ed., p. 227, 1980.

Figura 1.6 – Representação esquemática de voltamograma cíclico para sistema reversível.

Fonte: BRETT, C. M. A., BRETT, A. M. O., **Electrochemistry: principles, methods, and applications**, United States, Oxford University Press Inc., New York, p. 180, 1993.

Na Figura 1.6, observa-se que:

$E_{p,a}$ = Potencial de pico anódico

$E_{p,c}$ = Potencial de pico catódico

$I_{p,a}$ = Corrente de pico anódico

$I_{p,c}$ = corrente de pico catódico

Com a voltametria cíclica podemos determinar parâmetros para avaliar a reversibilidade dos sistemas eletroquímicos.

De acordo com o voltamograma da Figura 1.7 pode-se notar a diferença entre um processo reversível e irreversível. Este efeito na reversibilidade é observado de acordo com a posição dos picos anódicos e catódicos, com relação aos critérios de diagnóstico já explicitados anteriormente.

Figura 1.7 – Representação esquemática do efeito da irreversibilidade na forma dos voltamogramas cíclicos.

Fonte: BRETT, C. M. A., BRETT, A. M. O., **Electrochemistry: principles, methods, and applications**, United States, Oxford University Press Inc., New York, p. 184 1993.

A voltametria cíclica permite também uma relação linear entre corrente de pico versus concentração da espécie eletroativa no seio da solução [33], isto é evidenciado pela equação de *Randles-Sevcik* (para sistemas reversíveis);

$$I_p = - (2.69 \times 10^{-5}) n^{3/2} C_{\infty} D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{(Equação 4)}$$

onde, I_p é a densidade de corrente de pico em $A \text{ cm}^{-2}$, D é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, v é a velocidade de varredura em $V \text{ s}^{-1}$ e C_{∞} é a concentração da espécie eletroativa no seio da solução. A voltametria cíclica foi empregada nesta dissertação com objetivo de se realizar a detecção eletroquímica do antígeno investigado (veneno de jararaca).

1.2.2 Microscopia de Força Atômica

A invenção do microscópio de força atômica vem dando uma contribuição significativa para a nanotecnologia [36]. Sua operação é baseada em leis elementares da Física e conta com a moderna tecnologia de semicondutores. O princípio de funcionamento de um microscópio de força atômica é na verdade muito simples e pode ser visualizado através da Figura 1.8.

A ponta de prova é montada numa haste que pode se movimentar livremente. Na parte superior da haste é colocado um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, a luz do laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector. A incidência do feixe de laser no fotodetector provoca o aparecimento de uma diferença de potencial (ddp) em suas extremidades. Esta ddp depende da área iluminada pelo feixe de laser que por sua vez depende da altura da ponta de prova. A posição da ponta de prova varia conforme o relevo da superfície em estudo e com isso a ddp gerada pelo fotodetector traduz os deslocamentos da ponta durante a varredura. Estes deslocamentos são medidos com a amplificação da ddp gerada no fotodetector.

Figura 1.8 – Representação esquemática do princípio de funcionamento de um microscópio de força atômica.

Fonte: SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A., **Princípios de Análisis Instrumental**, 5ª Ed., Editora Concepción Fernández Madrid, p. 601, 1992.

Um microscópio de força atômica é capaz de medir deslocamentos menores que 1nm e também realizar medidas de forças provenientes da interação dos átomos da ponta exploratória com os átomos da superfície da amostra [37], como mostra a Figura 1.9.

Com esse tipo de microscopia pode-se estudar a topografia e as propriedades mecânicas de superfícies tais como atrito, rugosidade, dureza, rigidez, elasticidade e resistência. O conhecimento dessas propriedades é importante para o desenvolvimento tecnológico atual. A Figura 1.10 ilustra a disposição geométrica de átomos de silício.

Os diferentes contrastes de cores representam diferentes alturas, onde os pontos mais escuros denotam vales e os mais claros delineiam o contorno dos átomos. O microscópio permite não só o mapeamento de uma superfície em escala atômica, mas também a manipulação de átomos ou moléculas que estejam nessa superfície. Nesta dissertação, o microscópio de força atômica foi utilizado para comparar as superfícies dos eletrodos com e sem modificações pelos anticorpos empregados (imunoglobulinas).

Figura 1.9 – Representação esquemática da interação entre a ponteira do um microscópio de força atômica com os átomos de uma superfície.

Fonte: Sem autor mencionado, **Entenda a Microscopia de Força Atômica (AFM)**, Olhar Nano. [57]

Figura 1.10 – Microscopia de força atômica mostrando a disposição de átomos de silício.

Fonte: Sem autor mencionado, **Resolução espacial em Microscopia de contato.** [58]

1.3 Objetivos

O objetivo geral deste projeto é o desenvolvimento de um imunossensor usando metodologia eletroanalítica para detectar peçonhas das serpentes mais comumente encontradas no Brasil e responsáveis pelo maior número de acidentes (Bothrops). Inicialmente, foram investigadas as metodologias para imobilização dos anticorpos (soros) sobre a superfície do eletrodo de ouro (Au). Neste caso, foram investigadas as respostas eletroquímicas destes eletrodos com os anticorpos imobilizados. Posteriormente, foi avaliada a eletroatividade das toxinas sobre esses eletrodos contendo ou não os anticorpos imobilizados. Uma vez determinada a eletroatividade das toxinas (antígenos), usando (ou não) os respectivos anticorpos imobilizados sobre os eletrodos propostos, foi realizada a escolha do eletrodo e da técnica analítica mais adequada para a detecção do analito de interesse. É importante salientar que a dissertação focará a detecção, não a quantificação do antígeno, uma vez que foi empregado no trabalho peçonhas brutas de Bothrops.

1.4 Justificativa

Existe grande empenho do meio científico para desenvolvimento de novos métodos para determinação de substâncias prejudiciais à saúde humana. Pesquisas em determinações de pesticidas e agrotóxicos em alimentos, e metais pesados em água e solo, tem ganhado grande destaque, devido à sua importância à saúde

humana. Porém, ainda não se tem falado muito sobre acidente com animais peçonhentos, tais como cobras e escorpiões.

Esse assunto é de grande relevância, pois no Brasil existem muitos acidentes com estes tipos de animais, e o socorro/tratamento rápido é de extrema importância, para que o caso não leve a amputações dos membros acometidos por acidentes ou até mesmo a morte [9]. Neste sentido, o desenvolvimento de biossensores que possam fornecer o diagnóstico rápido e preciso sobre a espécie de serpente que levou ao acidente é de grande valia, pois possibilita ministrar o tratamento correto rapidamente.

Nos casos de acidentes ofídicos (com cobras venenosas), não há métodos rápidos e precisos no diagnóstico de certeza no que diz respeito à espécie de cobra envolvida no acidente.

A identificação do animal peçonhento é vital para a decisão do soro a ser aplicado. A sobrevivência do paciente depende muito das medidas iniciais adotadas. Quanto antes for feita a identificação, mais rápido será administrado o soro correto. Identificar o animal causador do acidente é procedimento importante na medida em que:

- A identificação do animal é de vital importância para a decisão do soro a ser aplicado.
- O soro antiofídico é um antiveneno específico para um gênero de serpente, não tendo efeito nas outras espécies de serpentes e de preferência deve ser administrado nas primeiras 2 horas.
- A sobrevivência ou agravamento da saúde da vítima de animais peçonhentos dependerá muito das medidas iniciais adotadas, daí a importância de uma boa fonte de informações para a sua identificação.
- Acidentes provocados por picadas de serpentes são um sério problema médico-hospitalar e social pela frequência com que ocorrem e pela morbimortalidade que ocasionam. O acidente ofídico pode ter efeitos fisiológicos devastadores no corpo humano, porque as toxinas do veneno de serpentes evoluíram para atingir quase todo o tipo de função do corpo ou parte do corpo.

Apesar da importância do diagnóstico clínico, que orienta a conduta na grande maioria dos acidentes, o animal causador deve, na medida do possível, ser encaminhado para identificação por técnico treinado [38].

CAPÍTULO 2

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os reagentes, equipamentos assim como a metodologia empregada para a realização dos experimentos.

2.1 Parte Experimental

2.1.1 Reagentes e Materiais Utilizados

- H_2SO_4 98% Merck P.A;
- Na_3PO_4 anidro Merck P.A;
- NaCl Synth P.A;
- Hexano Merck;
- Água ultra pura preparada pelo sistema de purificação Milli-Q;
- Imunoglobulinas (Vencofarma[®]);
- Etanol (Merck P.A);
- Pipetas automáticas de 2,5, 100 e 1000 μL Gilson e pipetas de 10 mL Boeco;
- Ponteiros descartáveis de polietileno;
- Balões volumétricos, espátulas, béqueres e funis de separação.
- Peçonha bruta de jararaca (*Bothrops*).

2.1.2 Soluções

Foram utilizadas nos experimentos soluções aquosas de H_2SO_4 (0,1M), que foram empregadas nos experimentos voltamétricos para limpeza das superfícies eletródicas.

Também foi preparada soluções Na_3PO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) cujo pH foi ajustado para próximo do valor fisiológico, 7,4. As soluções de imunoglobulinas foram preparadas pesando-se a quantidade adequada a fim de alcançar a concentração de $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$.

2.1.3 Eletrodos

Como eletrodos de trabalho foram utilizados:

- Eletrodo de Au em forma de folha com área geométrica de $0,3 \text{ cm}^2$.
- Eletrodos impressos de ouro (Sensores BVT[®]).

O eletrodo de referência empregado para as medidas foi o $\text{Ag/AgCl}_{(s)}$, o qual foi construído com um fio de prata anodizado imerso em uma solução de $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$ saturada com AgCl .

O contra eletrodo (eletrodo auxiliar) utilizado foi de Pt (Degusa[®]) na forma de placa com área geométrica de 1 cm^2 .

2.1.4 Células Eletroquímicas

Nos experimentos, para análise inicial dos processos de imobilização dos anticorpos, interações antígenos-anticorpos e limpeza dos foi utilizada uma célula eletroquímica feita de vidro Pirex[®], com capacidade para 10mL de solução. A tampa foi fabricada em Teflon[®], fazendo-se furos adequados para o encaixe de três eletrodos.

Figura 2. 1- Célula eletroquímica utilizada nos experimentos de imobilização e investigação das interações antígenos-anticorpos: (1) eletrodo de trabalho (folha de ouro); (2) eletrodo de referência (Ag/AgCl_(s)); (3) eletrodo auxiliar; (4) eletrólito suporte.

Fonte: Esquema do autor.

No caso da produção do sensor para identificação do antígeno, foi empregado um cabo, onde os sensores foram acoplados. Os sensores em questão foram eletrodos impressos (Figura 2.2) aos quais tiveram suas superfícies modificadas com os anticorpos (imunoglobulinas).

Figura 2. 2– Eletrodo de Au utilizado (dimensões: 25.4 x 7.26 x 0.63 mm) nos experimentos de imobilização e investigação das interações antígenos-anticorpos.

Fonte: Foto real do eletrodo.

2.2 Equipamentos

Para a realização dos experimentos eletroquímicos foi utilizado um potenciostato/galvanostato EG&G PARC modelo 273, acoplado a um microcomputador e um do Potenciostato Autolab PGSTAT 128N. Também foi empregado um potencistato portátil EMSTAT, para a investigação dos eletrodos impressos modificados ou não com as imunoglobulinas. A análise da rugosidade dos eletrodos impressos, com e sem modificação foi avaliada por meio de medidas de microscopia de força atômica (Digital Instruments (DI)) multimode AFM/STM), realizadas na Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

2.3 Imobilização dos Anticorpos

A etapa fundamental para o desenvolvimento de um biossensor é, sem dúvida, a imobilização da camada de reconhecimento sobre o transdutor. Existe uma

grande variedade de procedimentos nos quais as imobilizações podem ocorrer, como por exemplo, adsorção física, aprisionamento (entrapment), cross-linking e ligação covalente [39 – 41]. Nesta dissertação focaremos a adsorção física dos anticorpos sobre diferentes eletrodos.

A imobilização dos anticorpos foi investigada sobre o eletrodo de Au, sendo esse imerso posteriormente na solução contendo antígeno presente em meio de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) na célula eletroquímica. É importante salientar que os anticorpos foram purificados no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, onde foi investigado seu perfil eletroforético. O perfil mostrou somente uma banda, indicando que os anticorpos (imunoglobulinas G) empregados no trabalho estavam puros. Posteriormente, foram conduzidos estudos da imobilização dos anticorpos sobre os eletrodos impressos de Au, sendo que este não apresentou resultados satisfatórios. Neste sentido, foram adicionadas quantidades variáveis de anticorpos sobre os eletrodos (2, 5 e 10 microlitros).

Também foi avaliado o tempo de interação entre os anticorpos e a superfície eletródica. Após as imobilizações os eletrodos foram lavados com água destilada para avaliar se os anticorpos se ligaram a superfície eletródica ou se ocorreu lixiviação. Após a imobilização a modificação foi avaliada por meio de estudos voltamétricos e por meio de medidas de AFM.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos para a imobilização dos anticorpos e a sua resposta eletroquímica. Também serão apresentados os resultados da interação anticorpo-antígeno.

Primeiramente fez-se a limpeza do eletrodo de ouro em solução ácida (solução de ácido sulfúrico $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), para se obter o perfil voltamétrico do ouro e garantir a reprodutibilidade dos experimento, devendo a superfície do eletrodo estar sempre limpa. Como inicialmente foi utilizado um eletrodo de folha de Au, a limpeza mecânica tornou-se impossível. Após cada experimento refez-se a limpeza ácida do eletrodo.

Após o tratamento eletroquímico, o eletrodo foi lavado com água destilada e deionizada. Em seguida, foi adicionado $10 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), cujo pH foi corrigido para o valor igual a 7,4. Após a adição da solução registrou-se o voltamograma cíclico do eletrodo de Au (Figura 3.1).

Como o resultado está de acordo com a literatura, prosseguiu-se para a imobilização dos anticorpos sobre o eletrodo.

Sobre o eletrodo de ouro foi colocado uma gota da solução de imunoglobulinas de concentração $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e esperou-se secar dentro de um

dessecador, pois temperaturas mais elevadas que a ambiente poderiam degradar os anticorpos na solução e a atmosfera do laboratório poderia contaminá-la.

Figura 3. 1 – Perfil voltamétrico do eletrodo de ouro em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, em velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹. 1º Ciclo.

Após a secagem foram realizadas as medidas em solução tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ de pH=7,4. Sobrepussemos os voltamogramas do eletrodo de ouro com e sem a modificação para melhor observarmos os perfis.

Apesar da pouca diferença no perfil voltamétrico, pode-se observar um pico catódico em um potencial diferente quando o eletrodo está modificado em relação ao eletrodo sem modificação. Esse perfil é pouco conclusivo, porém mostra que a modificação com as imunoglobulinas tem um perfil/comportamento eletroquímico diferente do ouro puro.

Figura 3.2 - Perfil voltamétrico do eletrodo de folha de Au sem modificação (linha preta) e modificado com imunoglobulinas G (linha vermelha) em meio de tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} .

Quando o eletrodo foi submetido a mais de uma varredura, observou-se que o perfil era muito semelhante ao do eletrodo sem nenhuma modificação, o que pode ser explicado por uma possível lixiviação das imunoglobulinas imobilizadas sobre o eletrodo.

Observado esse fato, pensou-se em duas possibilidades para resolver o problema:

- Diminuir o volume da solução;
- Mudar o método de imobilização das imunoglobulinas.

Como trata-se de um imobilizador extremamente sensível, pouco métodos de imobilização poderiam ser utilizados. Por isso, partiu-se primeiramente para diminuir o volume da solução em contato com o eletrodo. Se com essa alteração o problema continuasse, outro método de imobilização seria averiguado.

A melhor maneira de não colocar o eletrodo em solução foi utilizar um eletrodo impresso.

As condições experimentais necessárias para se obter resultados confiáveis dependem da reprodutibilidade dos sistemas. Para isso, os eletrodos impressos de Au foram os que apresentaram respostas reprodutíveis nos experimentos. Neste sentido, para imobilização dos anticorpos nos eletrodos impressos, estes foram submetidos a vários ciclos voltamétricos em solução de ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), visando-se obter o perfil voltamétrico do Au. Após o tratamento eletroquímico, o eletrodo foi lavado com água destilada e deionizada. Em seguida, o mesmo foi mantido com sua superfície voltada para cima, sobre a qual foi adicionado $10 \mu\text{L}$ de uma solução de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), cujo pH foi corrigido para o valor igual a 7,4. Após a adição da solução registrou-se o voltamograma cíclico do eletrodo de Au (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Perfil voltamétrico do eletrodo impresso de Au em meio de tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} . 1º Ciclo.

O comportamento voltamétrico do eletrodo de Au está de acordo com aquele descrito na literatura, e em trabalhos realizados em nosso grupo de pesquisa, envolvendo eletrodeposição de prata e cádmio sobre eletrodos de Au-policristalinos [42, 43]. No sentido anódico, a presença dos picos apresentados no voltamograma cíclico (em meio de ácido sulfúrico pH=2) estão relacionados à formação do AuO e no sentido reverso (varredura catódica), o pico apresentado em aproximadamente 0,55 V está relacionado a redução do doAuO para Au.

Após o registro do voltamograma cíclico do Au em meio ácido, onde se alcançou o perfil voltamétrico de acordo com a literatura, foram iniciados os estudos para imobilização dos anticorpos sobre a superfície eletródica do eletrodo impresso de Au. Neste sentido, foram avaliadas variáveis como: tempo de imobilização, eletrólito de suporte e concentração dos anticorpos.

Desta forma, os melhores resultados foram obtidos empregando-se como eletrólito a solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, onde o pH foi ajustado para o valor igual a 7,4. A concentração da solução de imunoglobulinas foi de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ também em meio de tampão fosfato pH 7.4. Como as dimensões do eletrodo impresso de Au (parte relativa ao eletrodo de trabalho) é muito reduzida, foram realizados estudos com relação aos volumes das soluções de anticorpos. Para isso, foram escolhidos os volumes de 2, 5 e 10 μL . Observou-se que o volume de 2 μL apresentou a melhor resposta eletroquímica. Os volumes de 5 e 10 μL levaram a uma saturação do eletrodo de trabalho, dificultando a reprodutibilidade dos voltamogramas. No tocante à investigação do tempo de imobilização dos anticorpos, foram escolhidos 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Após 20 minutos de imobilização, o perfil voltamétrico do eletrodo modificado não se alterou. Deste modo, os parâmetros escolhidos para a eficiente imobilização das imunoglobulinas estão apresentados na Tabela 3.1:

Tabela 3.1 – Parâmetros empregados para imobilização eficiente das imunoglobulinas sobre a superfície dos eletrodos de Au impressos.

Volume de anticorpos(μL)	Tempo de imobilização(minutos)	Concentração dos anticorpos (mg/mL)	pH do eletrólito de suporte
2	20	0,1	7.4

A Figura 3.4 apresenta os perfis voltamétricos do eletrodo de Au sem modificação e após a modificação com os anticorpos (imunoglobulina G).

Figura 3.4 - Perfil voltamétrico do eletrodo impresso de Au sem modificação (linha vermelha) e modificado com imunoglobulinas G (linha preta) em meio de tampão fosfato pH 7,4. Velocidade de varredura 100 mV/s. 1º Ciclo.

Nota-se uma evidente alteração no perfil voltamétrico do eletrodo de Au após a modificação com as imunoglobulinas. Na varredura anódica pode-se observar dois picos localizados em 0,7 e em 1,1 V (vs. Ag/AgCl), que praticamente coincidem com os picos apresentados pelo eletrodo de Au sem modificação. Na varredura catódica há a presença de um pico em 0,4 V, onde no eletrodo de Au sem modificações o pico de redução do óxido está localizado em aproximadamente 0,6 V.

Os anticorpos imobilizados sobre o eletrodo de Au se mantiveram estáveis sobre a superfície eletródica dentro da região de potencial de interesse, ou seja, entre -0,5 e 1,3 V (vs. Ag/AgCl). Devido à possibilidade de lixiviação, não foram realizados estudos aplicando-se vários ciclos voltamétricos aos anticorpos. Essa escolha se deu visando preservar a estrutura molecular das imunoglobulinas que foram imobilizadas sobre o substrato de Au.

A técnica de microscopia de força atômica é muito útil na identificação estrutural/topográfica de substratos planos, bem como o cálculo da rugosidade média quadrática (RMS), definida como a raiz quadrada média dos quadrados dos desvios de altura em relação à altura média da imagem.

Experimentos visando observar a topografia dos eletrodos de Au com e sem modificação pelas imunoglobulinas G foram conduzidos usando a microscopia de força atômica. Diante disso, o eletrodo de Au foi limpo com etanol, e em seguida, o mesmo foi submetido a um tratamento eletroquímico em H_2SO_4 0,1 mol.L⁻¹ entre 0,05 e 1,4 V (vs. EHMS), até atingir o perfil voltamétrico apresentado na literatura. Posteriormente, o eletrodo foi sonificado por 10 minutos em água destilada e seco para realização das medidas de AFM. Após a medida, o eletrodo de Au foi modificado pelos anticorpos e novamente foram realizadas medidas de AFM.

Analisando a Figura 3.5, nota-se que o eletrodo de Au com e sem modificações pelos anticorpos, mostraram pequenas mudanças na superfície (irregularidades) que refletiu diretamente nos valores de RMS. Os dados obtidos mostram diferenças significativas nos valores de rugosidade como pode ser observado na Tabela 3.2. É importante salientar que cada imagem e, portanto uma

medida de RMS é representativa de cada superfície, e foram obtidos três diferentes imagens sobre os eletrodos em pontos distintos da superfície.

Figura 3.5 – Microscopia de força atômica para o eletrodo impresso de Au (a) modificado pelas imunoglobulinas G; (b) Não modificado.

(a)

(b)

Tabela 3.2– Valores médios de rugosidade para os eletrodos de Au, Au modificados com anticorpos obtidos por meio de AFM.

Medida	RMS (Au) / nm	RMS (Au modificado) / nm
1	9,94	10,90
2	8,78	10,32
3	9,18	9,49
Média	9,3 ± 0,4	10,2 ± 0,6

Os valores de rugosidade, obtidos para o eletrodo de Au com e sem modificação, estão de acordo com os resultados esperados, ou seja, o eletrodo modificado apresentou maior rugosidade em função da interação das imunoglobulinas com a superfície limpa de Au.

Uma vez consolidada a metodologia de imobilização, partiu-se para a etapa de investigação da detecção do antígeno. Neste caso, não foi realizada a quantificação de proteínas totais na peçonha bruta em virtude da pequena quantidade que dispúnhamos. Outro fator importante a ser salientado é grande dificuldade em se conseguir a peçonha bruta, que além de ser um material caro não é encontrado com facilidade. A maioria dos serpentários vende esse material na forma liofilizada, que chega a custar aproximadamente R\$1.000,00 o grama.

Após a imobilização dos anticorpos, foi adicionado sobre o eletrodo de trabalho (centro do eletrodo impresso) 5 µL de peçonha bruta de Bothrops (jararaca). Em seguida, adicionou-se 10 µL de tampão fosfato pH 7,4. Neste caso, foi avaliada a resposta voltamétrica após 20 minutos de interação antígeno anticorpos (Figura 3.6).

Figura 3.6 - Perfis voltamétricos dos anticorpos imobilizados sobre o eletrodo de Au em meio de tampão fosfato pH 7,4, na ausência e presença de 5 e 10 μL de peçonha bruta. Velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} . 1º Ciclo.

Na Figura 3.6 pode-se observar um pico bem definido em $0,45 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl), quando se adiciona a peçonha bruta. Ao aumentar a quantidade de peçonha de 5 para $10 \mu\text{L}$, nota-se um aumento da corrente de pico. É importante salientar que o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um sensor para realizar estudos clínicos, onde se espera positivo ou negativo como resultados e não a quantificação da toxina. Entretanto, a metodologia desenvolvida apresenta-se promissora para a quantificação da toxina de Bothrops. Ao adicionarmos mais 15 e $20 \mu\text{L}$ começou a ser observada a saturação da curva de I_p vs. Volume de peçonha, como pode ser observado na Figura 3.7.

Figura 3.7 - Dependência de I_p vs. Volume de peçonha obtidos por meio da técnica de voltametria linear. $E_i = -0,2$; $E_f = 0,7$ V (vs. Ag/AgCl); $v = 100$ mV.s⁻¹.

É importante salientar que a contribuição de corrente do branco (anticorpos) foi descontada, para obtenção dos valores de corrente apresentados na Figura 3.7. A saturação da corrente de pico, em função do aumento do volume da peçonha de Bothrops (jararaca) pode ser atribuída à pequena área do eletrodo de modificado de Au, que permite a interação com um número reduzido de imunoglobulinas que irá interagir, conseqüentemente, com um número reduzido de antígenos presentes na peçonha. É importante salientar que antígenos e anticorpos muitas vezes se tratam de macromoléculas.

A análise de I_p vs. tempo de interação antígeno anticorpos foi avaliada empregando-se 10 μL de peçonha bruta ao longo de 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - I_p vs. Tempo de interação antígeno anticorpo para 10 μL ; velocidade de varredura 100 mV.s^{-1} .

<i>Tempo/min</i>	5	10	15	20	30
<i>$I_p / \mu\text{A}$</i>	0,1	0,7	0,15	0,28	0,29

Pode-se observar que o tempo de interação antígeno anticorpo tem papel fundamental na detecção. Nota-se que a partir de 20 minutos não há ganho expressivo corrente. Portanto, o valor de 20 minutos foi considerado como parâmetro ótimo para ser empregado nos demais experimentos. Não foram empregadas técnicas de pulso no presente trabalho devido o longo tempo que foi despendido para alcançarmos resultados reprodutíveis. Isso se deu em função até mesmo da escolha dos anticorpos e eletrodos. Vários testes foram realizados com soro antiofídico empregados em hospitais (uso humano). Nestes casos, as respostas não eram reprodutíveis, muitas vezes em função da pequena quantidade de imunoglobulinas, comparado com aquelas que empregamos que é de uso veterinário. No caso do soro antiofídico, que foi cedido pelo Laboratório de Bioquímica da UFTM, esse era específico para serpentes do Gênero Bothrops. Os que empregamos posteriormente, que são de uso veterinário, também foram fornecidos pela UFTM. Esses anticorpos são utilizados para neutralizar venenos de serpentes do gênero Bothrops, Lachesis e Crotalus. Diante disso, ainda necessitamos investigar em trabalhos futuros a interação das peçonhas de Lachesis e Crotalus, que foram recentemente adquiridas pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da UFTM em Uberaba. É importante salientar que, o projeto que originou a dissertação em questão foi cedido por um docente do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, assim como muitos reagentes e equipamentos. Portanto, qualquer patente ou conhecimentos gerados deverão ser partilhados com o autor do projeto de pesquisa.

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados, nesse estudo, mostraram que é possível imobilizar imunoglobulinas sobre eletrodos de ouro, e obter respostas eletroquímicas reprodutíveis usando voltametria cíclica. Em seguida, avaliou-se a interação antígeno-anticorpos usando técnicas voltamétricas. Neste sentido, foram observados picos voltamétricos referentes às interações mencionadas. Os resultados obtidos nessa dissertação de mestrado, embora preliminares devido à dificuldade em obter as condições ideais, são os primeiros relatos na literatura sobre imunossensores eletroquímicos para detecção de peçonhas de serpentes. Também não há na rede hospitalar métodos para identificar qual serpente levou ao acidente ofídico. Deste modo, pode-se concluir que a descoberta poderá dar origem a um kit de diagnóstico e uma patente, envolvendo o IQSC e a UFTM (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Medicina).

CAPÍTULO 5

5 TRABALHOS FUTUROS

Posteriormente, será investigada uma metodologia analítica para análise dos antígenos na presença de sangue bruto e plasma coletado de cobaias. Esses testes visam avaliar a resposta dos sensores na presença dos interferentes presentes no sangue, que será o meio ao qual estamos interessados em investigar. Nesses casos, serão realizados tratamentos estatísticos comparando os resultados obtidos na presença de sangue bruto, plasma e água. Deste modo, poderemos avaliar a eficiência do imunossensor para aplicações em testes clínicos.

CAPÍTULO 6

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 OLIVEIRA, R. T. S.; MACHADO S. A. S. Quantificação do Pesticida Diclorvos por Voltametria de Onda Quadrada em Águas Puras e Naturais. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 911, 2004.

2 ABRAMOVITCH, R. A.; CAPRACOTTA, M. Remediation of waters contaminated with pentachlorophenol. **Chemosphere**, v. 50, n.7, p. 955, 2003.

3 FUKUSHIMA M.; SAWADA A.; KAWASAKI M.; ICHIKAWA H.; MORIMOTO K.; TATSUMI K. Influence of Humic Substances on the Removal of Pentachlorophenol by a Biomimetic Catalytic System with a Water-Soluble Iron(III)–Porphyrin Complex. **Environmental Science Technology**, v. 37, n. 5, p. 1031, 2003.

4 DU D.; CHEN A.; XIE Y.; ZHANG A.; LIN Y. Nanoparticle-based immunosensor with apoferritin templated metallic phosphate label for quantification of phosphorylated acetylcholinesterase. **Biosensor and Bioelectronics**, v. 26, n. 9, p. 3857, 2011.

5 NOROUZI P.; PIRALI-HAMEDANI M.; GANJALI M. R.; FARIDBOD F. A Novel Acetylcholinesterase Biosensor Based on Chitosan-Gold Nanoparticles Film for Determination of Monocrotophos Using FFT Continuous Cyclic Voltammetry. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, n. 10, p. 1434, 2010.

6 MORAES F. C.; MASCARO L. H.; MACHADO S. A. S.; BRETT C. M. A. Direct electrochemical determination of carbaryl using a multi-walled carbon nanotube/cobalt phthalocyanine modified electrode. **Talanta**, v. 79, n. 5, p. 1406, 2009.

7 ELDAN M.; SHOHAM T.; EREL Y.; MANDLER D. Monitoring Heavy Metals in Seawater by Their Electrochemically Induced Deposition as Hydroxides. **Electroanalysis**, v. 21 n. 3-5, p. 368, 2009.

8 YUE W.; RIEHL B. L.; PANTELIC N.; SCHLUETER K. T.; JOHNSON J. M.; WILSON R. A.; GUO X.; KING E. E.; HEINEMAN W. R. Anodic Stripping Voltammetry of Heavy Metals on a Metal Catalyst Free Carbon Nanotube Electrode **Electroanalysis**, v. 24, n. 5, p. 1039, 2012.

9 INSTITUTO BUTANTAN. <<https://www.butantan.gov.br>>. Último acesso em 10/01/2014.

10 WANG,J. Survey and summary: From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 16, p. 3011, 2000.

11 PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **AZojono - Journal of Nanotechnology Online**, v. 3, 2007.

12 LEE, J.; SO. H. M.; JEON, E. K.; CHANG, H.; WON, K.; KIM, Y. H. Aptamers as molecular recognition elements for electrical nanobiosensors. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 390,n. 4, p. 1023, 2008.

13 ROY, I.; GUPTA, M. N. Smart Polymeric Materials: Emerging Biochemical Applications. **Chemistry&Biology**, v. 10, n. 12, p. 1161, 2003.

14 YANTASEE, W.; LIN, Y.; HONGSIRIKARN, K.; FRYXELL, G. E.; ADDLEMAN, R.; TIMCHALK, C. Electrochemical Sensors for the Detection of Lead and Other Toxic Heavy Metals: The Next Generation of Personal Exposure Biomonitoring. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 12, p. 1683, 2007.

15 HULANICKI, A.; GLAB, S.; INGMAN, F. Chemical sensors: definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 9, p. 1247, 1991.

16 MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1113, 2004.

17 SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433, 2006.

18 LIU, J.; CAO, Z.; LU, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 5, p. 1948, 2009.

19 HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 34, n. 1, p. 12, 2012.

20 IOST R. M.; CRESPILO F. N. Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, n. 1, p. 1, 2012.

21 DHAND C.; DAS M.; DATTA M.; MALHOTRA B. D. Recent advances in polyaniline based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 2811, 2011.

22 WOLFBEIS, O. S. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 12, p. 81, 2000.

23 ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 5-6, p. 273, 2000.

24 KANDIMALLA V. B.; NEETA N. S.; KARANTH N. G.; THAKUR M. S.; ROSHINI K. R.; RANI B. E. A.; PASHA A.; KARANTH N. G. K. Regeneration of ethyl parathion antibodies for repeated use in immunosensor: a study on dissociation of antigens from antibodies. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 4, p. 903, 2004.

25 SHAO Y.; WANG J.; WU H.; LIU J.; AKSAY I.A.; LIN Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. **Electroanalysis**, v. 22 n. 10, p. 1027, 2010.

26 MAKOWER, A.; HALÁMEK, J.; SKLADAL, P.; KERNCHEN, F.; SCHELLER, F. W. New principle of direct real-time monitoring of the interaction of cholinesterase and its inhibitors by piezoelectric biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 18, n. 11, p. 1329, 2003.

27 HALAMEK, J.; TELLER, C.; MAKOWER, A.; FOURNIER, D.; SCHELLER, F. W. EQCN based cholinesterase biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 51, n. 24, p. 5174, 2006.

28 FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, **Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas (SINITOX)**. <<https://www.fiocruz.br/sinitox>>. Último acesso em 20/01/2014.

29 AZEVEDO-MARQUES M. M; CUPO P.; HERING S. E. **Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas** – Capítulo 4 – Acidentes por

animais peçonhentos: Serpentes peçonhentas. Medicina, Ribeirão Preto, 36: 480-489, abr/dez. 2003.

30 PROJETO COBRAS BRASILEIRAS. **Cobras Brasileiras.**
<<https://www.cobrasbrasileira.com.br>>. Último acesso em 30/10/2013.

31 INSTITUTO CIÊNCIA HOJE. **Rapidez e precisão contra picadas de animais venenosos.** Andreia Fanzeres, 11/06/2003, Ciência Hoje Online.
<<http://cienciahoje.uol.com.br/noticias/medicina-e-saude/rapidez-e-precisao-contra-picadas-de-animais/>>. Último acesso em 30/10/2013.

32 BARD, A.; FAULKNER, L. **Electrochemical Methods**, United States of American, John Wiley, p. 227-243, 1980.

33 SAWYER, D.; SOBKOWIAK, A.; ROBERTS, J.L. **Electrochemistry For Chemists**, 2nd ed. John Wiley & Sons, p. 68-78, 1995.

34 SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.,\ **Principios de Análisis Instrumental**, 5^a Ed., Editora Concepción Fernández Madrid, p. 577-606, 1992.

35 DUARTE, F. C. **Microscópio De Tunelamento Com Varredura (STM) E Microscópio De Força Atômica (AFM)**, disponível em
<http://www.dsif.fee.unicamp.br/~furio/IE607A/STM_AFM.pdf>. Último acesso em 20/12/2013.

36 FATIBELLO FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores: Revisão. **Química Nova**, v. 15, n. 1, p. 28, 1992.

37 KARUBE, I. **Handbook of Measurement Science**; Sydenham, P. H.; Thom, R., eds.; Wiley: Chichester, 1992.

38 ANDREESCU, S.; NOGUER, T.; MAGEARU, V.; MARTY, J-L. Screen-printed electrode based on AChE for the detection of pesticides in presence of organic solvents. **Talanta**, v. 57, n. 1, p. 169, 2002.

39 SANTOS, M. C.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A.; MASCARO, L. H. Estudo da eletrodeposição de metais em regime de subtensão. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 392, 2000.

40 SANTOS, M. C.; MIWA, D. W.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Estudos da deposição em subtensão de cádmio sobre ouro policristalino na presença de diferentes ânions co-adsorvidos. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 465, 2001.

41 CALIL, S. S.; da SILVA, P. R. Q.; **Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade.** Disponível em <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Último acesso em 20/01/2014.

42 BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. **Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 19(1):7-16, jan-fev, 2003.

43 BRETT C. M. A. Electrochemical Impedance Spectroscopy for Characterization of Electrochemical Sensors and Biosensors. **ECS Transactions**, v. 13, pp. 67-80, 2008.

44 BOJORGE RAMIREZ N.; SALGADO A. M.; VALDMAN B. The Evolution and Developments of Immunosensors for Health and Environmental Monitoring: Problems and Perspectives. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 26, p. 227, 2009.

45 CHIPPAUX, J, P.; WILLIAM, V.; WHITE, J. Review Article: Snake Venon Variability: Methods of Study, Results and Interpretation. **Toxicon** v. 29, n. 11, p. 1279, 1991.

46 MORAES, D. S. **Estudo dos efeitos do veneno da serpente *Bothrops alcatraz* em preparações neuromusculares *in vitro***. 2011. 76f. Tese de mestrado – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

47 NARVAES, L. V. P. **Isolamento e caracterização de toxinas do veneno de *Bothrops alcatraz* Marques, Martins e Sazima, 2002 e aspectos coevolutivos com a dieta**. 2007. 135 f. Tese de mestrado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

48 PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Artigo de Revisão: Ofidismo. **Revista da Associação Médica do Brasil**, 47(1): 24-9, 2001.

49 LAVONAS, E. J. Antivenoms for Snakebite: Design, Function, and Controversies. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.13, p. 1980, 2012.

50 ESPINO-SOLIS, G. P.; RIAÑO-UMBARILA, L.; BECERRIL, B.; POSSANI, L. D. Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. **Journal of proteomics**, v. 72, p. 183, 2009.

51 KULAWICKRAMA, S.; O'LEARY, M. A.; HODGSON, W. C.; BROWN, S. G. A.; JACOBY, T.; DAVERN, K.; ISBISTER, G. K. Development of a sensitive enzyme immunoassay for measuring taipan venom in serum. **Toxicon**, v. 55, p. 1510, 2010.

52 QUANZHI, L.; CHARLOTTE, L. O. Evaluation of four different immunogens for the Production of snake antivenoms. **Toxicon**, v. 30, n. 11, p. 1319, 1992.

53 WANG, X.H.; WANG, S. Sensors and Biosensors for the Determination of Small Molecule Biological Toxins. **Sensors**, v. 8, p. 6045, 2008.

54 **Estrutura, Função e Diversidade das Imunoglobulinas**. Disponível em <<http://www.icb.ufmg.br/labs/lbcd/grupo3/imunoglobulinas.html>>. Último acesso em 16/12/2013.

55 **Imunoglobulina-Wikipedia**. Disponível em

<<http://pt.wikipedia.org/wiki/Imunoglobulina>>. Último acesso em 16/12/2013.

56 **Serpentes**, Zoologia Comunidades. Disponível em

<<http://zoologia.comunidades.net/index.php>>. Último acesso em 12/01/2014.

57 **Entenda a Microscopia de Força Atômica (AFM)**, Olhar Nano. Disponível em

<<http://www.olharnano.com>>. Último acesso em 20/12/2013.

58 **Resolução espacial em Microscopia de contato**. Disponível em

<<http://www.cbpf.br/~nanos/Apostila/12.html>>. Último acesso em 20/12/2013.