

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR PARA A DETECÇÃO DE miRNAs ASSOCIADOS A DOENÇAS CARDIOVASCULARES

Renato Pessoa e Melo Neto¹; Jose Luiz de Lima Filho²

¹Estudante do Curso de Biomedicina – CCB – UFPE; E-mail: renatopessoaneto@gmail.com,

²Docente/pesquisador do Depto de Bioquímica – CCB – UFPE. E-mail: joseluiz60@gmail.com.

Sumário: Doenças cardiovasculares matam milhares de pessoas e o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos podem contribuir para maior sobrevivência dos pacientes. Dentre esses novos métodos, destaca-se o genossensor eletroquímico por ser sensível, rápido e possivelmente point-of-care. Neste estudo foi desenvolvido um biossensor eletroquímico baseado na eletropolimerização de anilina (ANI) e 3,4-etilenodioxitiofeno (EDOT). Após a copolimerização foram avaliados os seguintes pontos: influência da concentração do dopante (SDS); desempenho do copolímero comparado aos homopolímeros; análise preliminar de detecção de ácido nucleico e, por fim, foi realizado um planejamento fatorial para avaliar a influência das variáveis: concentrações de monômeros e tempo de imobilização. Os resultados mostram que diminuir a concentração do SDS melhora o desempenho do sistema e que o copolímero obteve um melhor desempenho que os homopolímeros. Adicionalmente, as análises preliminares indicam que o sistema é sensível para perceber a presença do analito de interesse. O planejamento fatorial mostrou, através do diagrama de Pareto, que o sistema sofre influência da concentração, mas não do tempo.

Palavras-chave: biossensor; diagnóstico; DNA

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, as doenças cardiovasculares foram a principal causa de morte no mundo. De acordo com o DATASUS, em 2010, mais de 320 mil pessoas morreram em decorrência de doenças cardiovasculares no Brasil, sendo mais de 16 mil só em Pernambuco. Apesar das técnicas diagnósticas, para essas doenças, já estarem bem consolidadas elas não possibilitam uma detecção rápida e sensível, portanto os biossensores são uma solução. Os biossensores são dispositivos analíticos em que um elemento de reconhecimento biológico é imobilizado em um transdutor físico-químico. Os transdutores podem ser eletroquímicos, magnéticos, piezoelétricos, termométricos, e os elementos de reconhecimento podem ser proteínas, ácidos nucleicos, bactérias, etc. Os transdutores eletroquímicos apresentam vantagens importantes, dentre elas: são mais baratos, práticos, podem ser miniaturizados além de oferecerem um baixo limite de detecção (GIL; MELO, 2010). No desenvolvimento de um biossensor algumas características são fundamentais, tais como a especificidade e a sensibilidade. Com a finalidade de aumentar a sensibilidade tem se modificado o transdutor com materiais condutores, dentre eles os polímeros. Dentre os polímeros mais utilizados na modificação dos transdutores estão o PEDOT (poli-3,4-etilenodioxitiofeno) e a PANI (polianilina) por serem materiais de boa condutibilidade, biocompatibilidade, e ambos já foram previamente descritos com sucesso na aplicação em biossensores. A copolimerização é um processo no qual forma-se um polímero composto por 2 ou mais monômeros distintos e que conservam características dos homopolímeros utilizados (EL-ENANY, 2012). Para o reconhecimento do seus alvos os biossensores podem utilizar diferentes tipos de biomoléculas, como anticorpos, DNA, RNA, proteínas. Os biossensores que utilizam DNA como biorreceptor (elemento de reconhecimento) são chamados de genossensores. Para tanto, um dos

fenômenos que podem ser observados é a oxidação das bases nitrogenadas em determinada faixa de potencial. Dentre as quatro bases presentes no DNA (adenina, timina, citosina e guanina) a adenina e guanina apresentam característica redox, sendo a guanina a mais eletroativa, e portanto a mais estudada eletroquimicamente (E. FERAPONTOVA, 2011). Este trabalho portanto tem a proposta de desenvolver um biossensor eletroquímico para a detecção de sequências de DNA. Para isso utilizado um copolímero de PEDOT e PANI na modificação de seu transdutor visando uma melhora na imobilização de sua biomolécula e detecção de seu alvo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O biossensor foi composto por tiras testes contendo 3 eletrodos: um eletrodo de trabalho e um auxiliar constituídos de carbono e um eletrodo de referência constituído de prata/cloreto de prata. Primeiramente foi realizada a avaliação da influência da concentração de dodecil sulfato de sódio (SDS) na construção do sistema, onde foram testadas as concentrações de 0,3, 0,225 e 0,15 M. O copolímero teve seu desempenho comparado a ambos os homopolímeros de PEDOT e PANI. Foi também realizada a prova de conceito do sistema em que foi testado a capacidade do mesmo em detectar os eventos de imobilização e hibridização. O desenho fatorial completo de 2^3 foi realizado para avaliar a influência das variáveis independentes das concentrações de ANI e EDOT (0,03 M e 0,07 M) e tempo de imobilização (30 a 90 minutos) em relação a variável dependente sinal obtido. Todas as análises foram realizadas através das técnicas de voltametria cíclica (VC) (tampão fosfato pH 7,4) e voltametria de pulso diferencial (VPD) (tampão TRIS-HCl pH 7,0).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

O SDS é um surfactante utilizado com o objetivo de promover a solubilização dos monômeros de anilina e EDOT em água (EL-ENANY, 2012). Maiores valores de correntes observados nas voltametrias cíclicas refletem maior condutividade do sistema (GUIMARD; GOMEZ; SCHMIDT, 2007). Conforme observado na figura 1, a redução na concentração de SDS de 0,3 M (linha azul) para 0,15 M (linha verde) mostrou o melhor resultado devido a um aumento no pico da corrente de 190 μA para 685 μA .

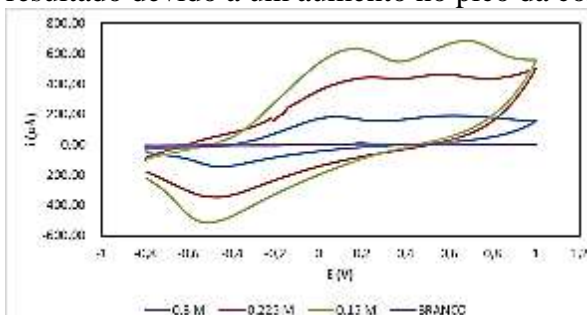


Figura 1: Voltametria cíclica das várias concentrações de SDS. Os parâmetros de voltametria cíclica aplicados foram: 1 ciclo de -0,8 a 1V com uma velocidade de varredura de 100 mV/s em tampão PBS pH 7,4.

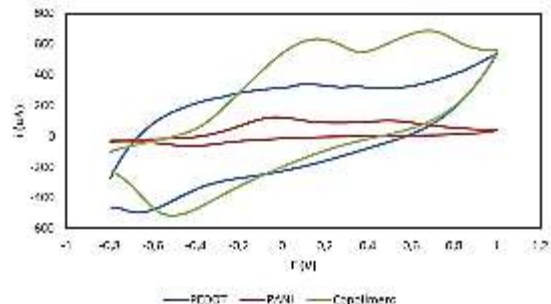


Figura 2: Voltametria cíclica do comparativo entre os polímeros. Os parâmetros de voltametria cíclica aplicados foram: 1 ciclo de -0,8 a 1V com uma velocidade de varredura de 100 mV/s em tampão PBS pH 7,4.

O desempenho do copolímero foi comparado com o desempenho dos homopolímeros PANI e PEDOT. Conforme observado na figura 2, a comparação entre os picos de correntes dos compostos mostrou que o copolímero teve um pico de 685 μA (linha verde) enquanto que o PEDOT obteve um pico de 556 μA (linha azul) e a PANI um pico de 122 μA (linha vermelha). Estes resultados comprovam a eficiência da copolimerização, isto se deve ao fato de que neste processo, são mantidas as características dos dois

homopolímeros, além de que o novo composto terá suas próprias vantagens (OHLAN; SINGH, 2008)

Para realizar a prova de conceito do sistema, foi feita uma voltametria cíclica com o DNA imobilizado em sua superfície e também com o seu alvo complementar e os resultados desses experimentos comparados entre si e com o biossensor apenas modificado com o copolímero. De acordo com a figura 3, o sistema foi capaz de reconhecer a presença da molécula de DNA imobilizada em sua superfície devido a uma diminuição no pico de corrente do sistema que caiu de 685 μA (linha vermelha) para 424 μA (linha verde). Essa imobilização é provocada principalmente pela interação eletrostática entre os grupos fosfatos carregados negativamente do DNA e a superfície do eletrodo carregada positivamente pela presença do copolímero (WASHE et al., 2013). A subsequente queda no sinal para 355 μA (linha azul) confirma a hipótese de que o sistema foi capaz de detectar a hibridização da sonda com seu alvo complementar.

No diagrama de Pareto (figura 4), o comprimento da barra é proporcional ao efeito padronizado. A análise estatística mostrou que as variáveis independentes da concentração de ANILINA e EDOT obteve um efeito com significância positiva sobre o pico de oxidação eletroquímico da guanina, sugerindo que concentrações mais elevadas possam melhorar o desempenho do sinal eletroquímico. A variável independente tempo de imobilização não mostrou valores estatísticos significativos. A linha vertical é utilizada para julgar os efeitos que são estatisticamente significativos. As barras que ultrapassam esta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativas em relação a um nível de confiança de 95% (NASCIMENTO et al., 2012).

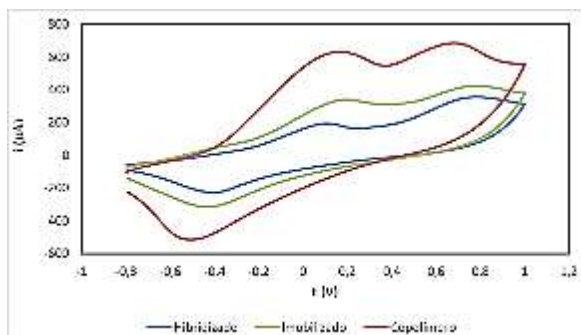


Figura 3: Voltametria cíclica comparando o copolímero com a resposta do imobilizado e do hibridizado. Os parâmetros de voltametria cíclica aplicados foram: 1 ciclo de -0.8 a 1V com uma velocidade de varredura de 100 mV/s em tampão PBS pH 7,4.

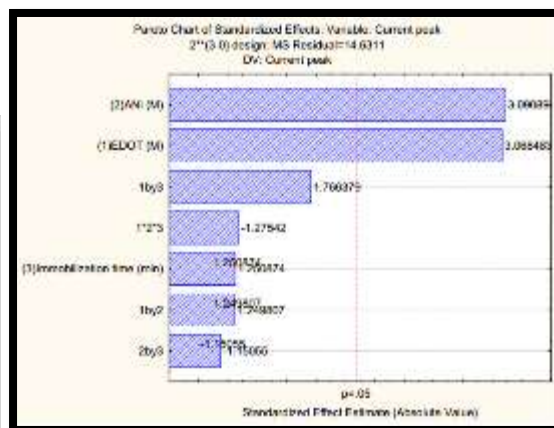


Figura 4: Gráfico de barras do Pareto mostrando a estimativa do efeito padronizado (valor absoluto) das variáveis independentes concentração de EDOT (1), a concentração de anilina (2) e tempo de imobilização (3) em relação a oxidação eletroquímica da Guanina, desenho fatorial 2^3 completo.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados, a modificação proposta pelo copolímero pode diferenciar entre o imobilizado do hibridizado. O planejamento fatorial também dá indicação para a continuação do projeto no qual serão testados o melhor tempo de imobilização e concentração da sonda. Em seguida, os testes com amostras reais será feita para validar o dispositivo. Estando então apto para a utilização como um dispositivo de diagnostico point of care.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor José Luiz de Lima Filho pela oportunidade e orientação; ao CNPq, à FACEPE, a CAPES e ao FINEP pelo investimento em ciência e Tecnologia através de fomento às atividades de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BATCHELOR-MCAULEY, C.; WILDGOOSE, G. G.; COMPTON, R. G. The physicochemical aspects of DNA sensing using electrochemical methods. **Biosensors & bioelectronics**, v. 24, n. 11, p. 3183–90, jul. 2009.
- BELLUZO, M. S.; RIBONE, M. É.; LAGIER, C. M. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. **Analytical Chemistry**, p. 1366–1399, 2008.
- E. FERAPONTOVA, E. Electrochemical Indicators for DNA Electroanalysis. **Current Analytical Chemistry**, v. 7, p. 51–62, 2011.
- EL-ENANY, G. Supercapacitive properties of Electropolymerized Poly (3, 4-ethylene dioxythiophene) and Poly (aniline) Co-polymer electrodes. **Zaštita materijala**, v. 53, p. 93–101, 2012.
- GIL, E. D. S.; MELO, G. R. DE. Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 375–391, set. 2010.
- GUIMARD, N. K.; GOMEZ, N.; SCHMIDT, C. E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 8-9, p. 876–921, 2007.
- NASCIMENTO, G. A et al. Electrochemical DNA biosensor for bovine papillomavirus detection using polymeric film on screen-printed electrode. **Biosensors & bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 61–6, 2012.
- OHLAN, A.; SINGH, K. Conducting ferromagnetic copolymer of aniline and 3, 4 - ethylenedioxythiophene containing nanocrystalline barium ferrite particles. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, 2008.
- WASHE, A. P. et al. Facile and versatile approaches to enhancing electrochemical performance of screen printed electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 91, p. 166–172, 2013.