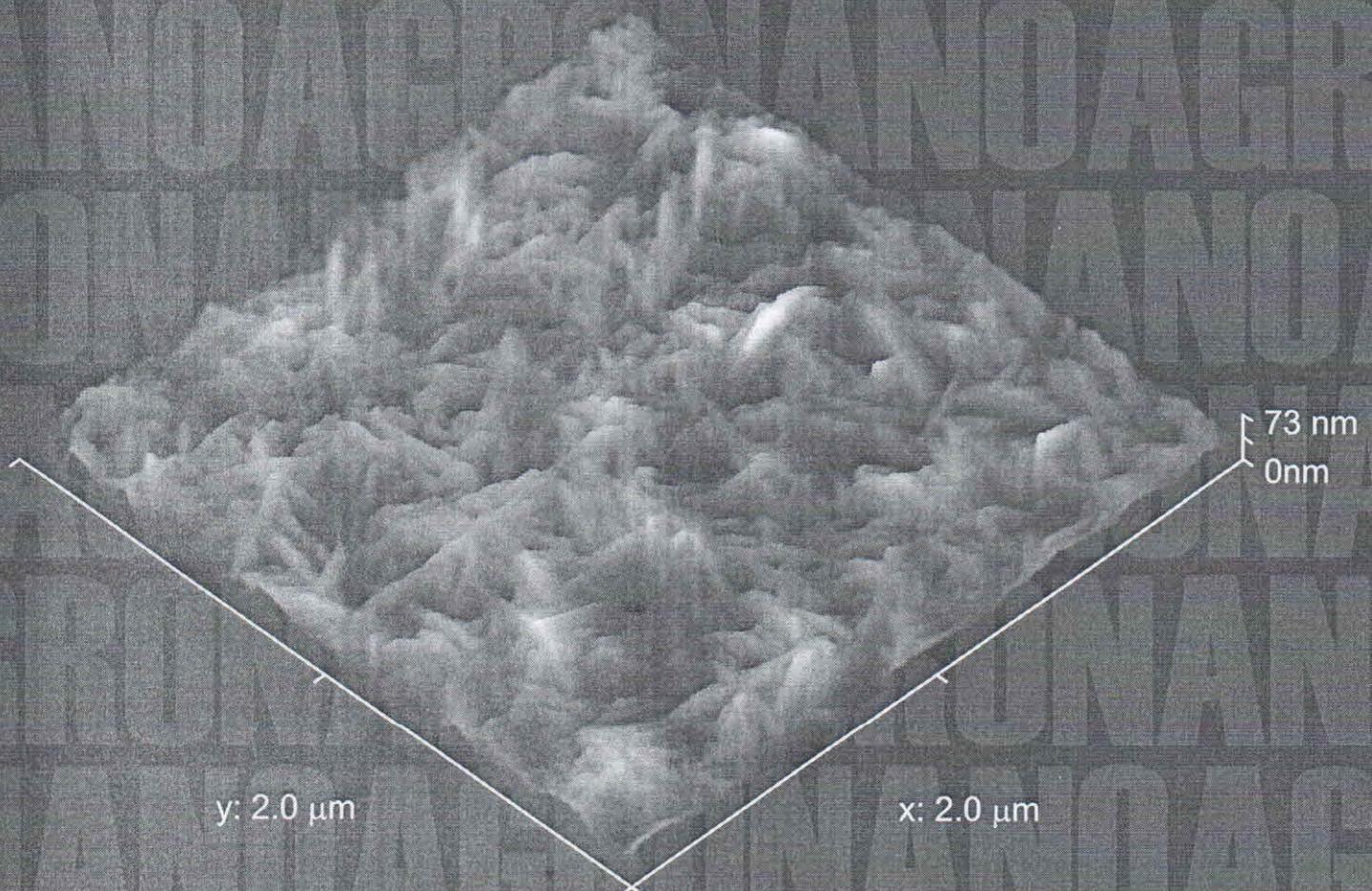




Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio

Anais do V Workshop 2009



Editores

**Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso**

Embrapa

Instrumentação Agropecuária

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**Rede de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio
Anais do V Workshop 2009**

**Odílio Benedito Garrido de Assis
Wilson Tadeu Lopes da Silva
Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Editores**

**Embrapa Instrumentação Agropecuária
São Carlos, SP
2009**

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 2107 2800
Fax: (16) 2107 2902
<http://www.cnpdia.embrapa.br>
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso
Membro Suplente: Dr. Paulo Sérgio de Paula Herrmann Junior

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Capa: Manoela Campos e Valentim Monzane
Imagem da Capa: Imagem de AFM de nanofibra de celulose - Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Manoela Campos e Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2009): tiragem 200

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

Anais do V Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao
agronegócio 2009 - São Carlos: Embrapa Instrumentação
Agropecuária, 2009.

Irregular
ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia - Evento. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de.
II. Silva, Wilson Tadeu Lopes da. III. Mattoso, Luiz Henrique
Capparelli. IV. Embrapa Instrumentação Agropecuária

© Embrapa 2009



DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE ANAPLASMOSE BOVINA

Andre Santiago Afonso^{1,2}, Ronaldo Censi Faria¹, Luiz Henrique Capparelli Mattoso^{2*}

¹Depto. de Química - UFSCar, 13560-905, São Carlos/SP

²Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, Embrapa Instrumentação Agropecuária, 13560-970, São Carlos/SP *mattoso@cnpdia.embrapa.br

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: 01.05.1.02.03

Resumo

A proposta deste projeto é o desenvolvimento de um imunossensor para detecção de *Anaplasma marginale* causadora da anaplasmoze bovina, uma doença endêmica que acarreta considerável prejuízo na cadeia produtiva bovina. Um dispositivo sensor será desenvolvido utilizando como material bioativo uma das seis proteínas principais de superfície da *A. marginale*, a MPS5. A imobilização da MPS5 sobre o eletrodo será realizada covalentemente utilizando monocamadas automontadas de tios. Como sistema de transdução avaliar-se-á a utilização da técnica de microbalança de cristal de quartzo (QCM). Para caracterização dos filmes e do processo de imobilização da biomolécula serão utilizadas as técnicas de espectroscopia de reflectância especular na região do infravermelho. A validação do imunossensor será realizada comparando os resultados obtidos do sistema sensor desenvolvido com resultados obtidos por ensaio imunoabsorvente ligado a uma enzima (ELISA) realizados com amostras de animais sadios e infectados.

Palavras-chave: Anaplasmoze, imunossensor, QCM.

Introdução

A anaplasmoze bovina é uma enfermidade causada pela riquetsia intra-eritrocítica *Anaplasma marginale*, um dos agentes etiológicos da tristeza parasitária bovina (TPB), juntamente com dois hemoprotozoários, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (DUMLER et al., 2001).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, as pesquisas voltadas para os testes sorológicos foram focadas nas proteínas de membrana, devido à possibilidade de sua produção em culturas bacterianas. Seis proteínas principais de superfície (Major Surface Proteins-MSPs: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) foram inicialmente identificadas em *A. marginale* derivado de eritrócitos bovinos e de tecidos de carrapatos. Essas proteínas, expostas na superfície da riquetsia,

são facilmente acessíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, e desempenham importantes funções para a sobrevivência do parasita. A proteína MSP5 possui maior potencial para ser utilizada como antígeno em diagnóstico sorológico, devido às suas características de conservação entre diferentes espécies e isolados de *Anaplasma* sp. Devido à facilidade de manuseio e segurança, dentre os testes sorológicos, o Enzyme Linked Sorbent Assay (ELISA), é o mais utilizado para o diagnóstico de infecções por *A. marginale*. Esta técnica consiste na reação antígeno-anticorpo, em que o antígeno é imobilizado por adsorção física sobre a superfície de microplacas de poliestireno, e através de uma reação enzimática na presença do analito de interesse, há uma mudança de coloração do sistema, o qual é monitorado com um espectrofotômetro.

Apesar dos imunoenaios apresentarem grande sensibilidade e seletividade para o

diagnóstico da anaplasmosse bovina e para a pesquisa epidemiológica essas técnicas demandam tempo, pessoal qualificado e custo elevado, o que dificulta o monitoramento e controle da doença. Tais problemas podem ser contornados com o desenvolvimento de sistemas baseados nas reações biológicas denominados biossensores.

Materiais e métodos

Em uma primeira etapa avaliar-se-á a deposição de tiol em monocamada sobre diferentes eletrodos.

Os filmes automontados derivados de alcanotióis serão depositados por imersão do substrato em solução alcoólica de mercaptoundecanoico e decanotiól na proporção de 1:3 em diferentes concentrações por 3 horas e depois lavados e secos ao ar de acordo com Briand et al. (2006).

A modificação da superfície será avaliada por voltametria cíclica (CV) avaliando os perfis dos voltamogramas antes e após a modificação das superfícies com os filmes, em solução de eletrólito suporte. A principal caracterização será realizada por espectroscopia de reflectância especular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). O antígeno, proteína MSP5 (major surface protein), será fornecido pela Embrapa Gado de Corte, para imobilização sobre as diferentes matrizes. Os eletrodos modificados com derivados de alcanotióis serão imersos em solução contendo 20 mmol.L⁻¹ de N-hidroxisuccinimida (NHS) e 10 mmol.L⁻¹ de hidróclorato de 1-etil-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) variando o tempo de incubação. Em seguida serão lavados e secos. A modificação dos filmes com esses reagentes serão avaliados por FTIR por reflectância. O próximo passo será a imobilização da proteína MSP5, imergindo os eletrodos modificados em solução do antígeno e tampão fosfato pH 7,0 por diferentes intervalos de tempo e concentração, lavados com tampão e secos. Após essa etapa, a modificação também será avaliada por FTIR por reflectância e QCM.

Os sítios ainda disponíveis serão bloqueados por imersão do biossensor em solução contendo albumina soro bovino 1% (m/v) em tampão fosfato pH 7,4 por duas horas.

O sensor será avaliado antes e após a exposição à amostra de soro contendo o anticorpo anti-MSP5 de animais infectados e em soros de animais sadios em diferentes intervalos de tempo de incubação sendo em seguida lavado com solução tampão. Como técnicas de transdução será micro balança de crista de quartzo.

As medidas nanogravimétricas serão realizadas em uma QCM Stanford modelo Q200. O eletrodo de trabalho será um disco de cristal de quartzo corte-AT com frequência fundamental de 5 MHz com eletrodos de ouro de área igual a 0,25 cm²

em ambos os lados do cristal. A resposta do sistema sensor será avaliada por meio da variação de frequência em função do tempo antes e após a adição da amostra. Avaliar-se-á a resposta do sistema após a lavagem do sistema com solução tampão com o objetivo de avaliar a regeneração do eletrodo.

Os resultados obtidos com o imunossensor serão avaliados com relação o grau de concordância utilizando o método de ELISA como método de referência, uma vez que é a técnica utilizada para o diagnóstico de anaplasmosse. Os testes serão realizados como controle para animais sadios e infectados tanto para o imunossensor quanto para o método ELISA. O estado de infectividade dos animais será confirmado por PCR para o gene msp5.

Resultados esperados

Para a confirmação da modificação da superfície dos eletrodos com os alcanotióis serão analisadas as respostas eletroquímicas características da superfície dos eletrodos de ouro modificados ou não por voltametria cíclica monitorando as mudanças nos valores de corrente dos voltamogramas antes e após a modificação com o a monocamada.

Os resultados obtidos por FTIR serão analisados pela mudança nas bandas características dos grupos funcionais a monocamada antes e após a modificação com reagentes NHS e EDC, e o antígeno. A variação de massa das superfícies com os substratos com os agentes modificantes serão avaliados com QCM diminuindo a frequência de oscilação do cristal de quartzo.

Para a reação entre o antígeno e anticorpo, os quais serão monitorados por QCM será avaliado o diminuição da frequência de oscilação do cristal de quartzo na presença do analito de interesse.

Agradecimentos

CNPq, FIPAI, EMBRAPA, FINEP/MCT.

Referências

- DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. *International journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, Reading, v. 51, p. 2145, 2001.
- BRIAND, E.; SALMAIN, M.; HERRY, J-M.; PERROT, H.; COMPERE, C.; PRADIER, C-M. *Biosensors and Bioelectronics*, Essex, v. 22, p. 440, 2006.