

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

## REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO

### ANAIS DO VI WORKSHOP – 2012

Maria Alice Martins  
Morsyleide de Freitas Rosa  
Men de Sá Moreira de Souza Filho  
Nicodemus Moreira dos Santos Junior  
Odílio Benedito Garrido de Assis  
Caue Ribeiro  
Luiz Henrique Capparelli Mattoso

#### Editores

Fortaleza, CE  
2012

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Instrumentação**  
Rua XV de Novembro, 1452,  
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](mailto:sac@cnpdia.embrapa.br)

**Embrapa Agroindústria Tropical**  
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270,  
CEP 60511-110 – Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
<http://www.cnpat.embrapa.br>  
E-mail: [sac@cnpat.embrapa.br](mailto:sac@cnpat.embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Embrapa Instrumentação**

Presidente: João de Mendonça Naime  
Membros: Débora Marcondes Bastos Pereira  
Milor, Washington Luiz de Barros Melo, Sandra  
Protter Gouvêa, Valéria de Fátima Cardoso.  
Membro suplente: Paulo Sérgio de Paula  
Herrmann Júnior

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: Antonio Teixeira Cavalcanti Júnior  
Secretário-Executivo: Marcos Antonio Nakayama  
Membros: Diva Correia, Marlon Vagner Valentim  
Martins, Arthur Cláudio Rodrigues de Souza, Ana  
Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Adriano  
Lincoln Albuquerque Mattos e Carlos Farley  
Herbster Moura

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto  
Capa: Mônica Ferreira Laurito, Pedro Hernandes Campaner  
Imagens da capa:

Imagem de MEV-FEG de Titanato de potássio – Henrique Aparecido de Jesus Loures  
Mourão, Viviane Soares  
Imagem de MEV de Eletrodeposição de cobre – Luiza Maria da Silva Nunes, Viviane Soares  
Imagem de MEV de Colmo do sorgo – Fabricio Heitor Martelli, Bianca Lovezutti Gomes,  
Viviane Soares  
Imagem de MEV-FEG de HPMC com nanopartícula de quitosana – Marcos Vinicius Lorevice,  
Márcia Regina de Moura Aouada, Viviane Soares  
Imagem de MEV-FEG de Vanadato de sódio – Waldir Avansi Junior  
Imagem de MEV de Fibra de pupunha – Maria Alice Martins, Viviane Soares

1ª edição

1ª impressão (2012): tiragem 300

**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

---

Anais do VI Workshop da rede de nanotecnologia aplicada ao agronegócio 2012 – São  
Carlos: Embrapa Instrumentação; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012.

Irregular

ISSN: 2175-8395

1. Nanotecnologia – Evento. I. Martins, Maria Alice. II. Rosa. Morsyleide de  
Freitas. III. Souza Filho, Men de Sá Moreira de. IV. Santos Junior, Nicodemos Moreira  
dos. V. Assis, Odílio Benedito Garrido de. VI. Ribeiro, Caue. VII. Mattoso, Luiz  
Henrique Capparelli. VIII. Embrapa Instrumentação. IX. Embrapa Agroindústria  
Tropical.



## APLICAÇÃO DA NANOTECNOLOGIA E IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA PARA A CONSTRUÇÃO DE IMUNOSSENSOR

Marlene de Barros Coelho\*<sup>1</sup>, Flávio Ribeiro de Araújo<sup>1</sup>, Joseane Aparecida de Carvalho<sup>2</sup>, Valdir Souza Ferreira<sup>2</sup>, Paulo S. de P. Herrmann Júnior<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Corte, <sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, <sup>3</sup>Embrapa Instrumentação Agropecuária, \*mbcoelho@cnpqg.embrapa.br

Projeto Componente: PC2

Plano de Ação: PA4

### Resumo

A imunointeração de proteínas em solução (anticorpo) com suas proteínas complementares (antígeno) imobilizadas em uma superfície nanoestruturada leva a variações no índice de refração, na espessura ou na constante dielétrica da camada imobilizada. Tais propriedades podem ser exploradas no desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) é uma técnica útil para caracterizar a formação de filmes sobre transdutores metálicos e como método de detecção de biomoléculas. Desta forma, são apresentados resultados parciais da interação entre proteína recombinante de *M. bovis* e anticorpos contra TB por EIE, analisando o comportamento eletroquímico do par redox  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ .

**Palavras-chave:** Imunossensor nanoestruturado, detecção de biomoléculas, proteína recombinante, tuberculose bovina.

### Publicações relacionadas

Carvalho, J.A., Coelho, M.B. e Ferreira, V.S. Modificação de eletrodo de ouro com sílica gel e nanopartículas para o desenvolvimento de imunossensor nanoestruturado, Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica/ Luís Frederico Pinheiro Dick et al. (Org.) – Lajeado: Ed. da Univates, p. 1219-1221, 2011.

### Introdução

A detecção de proteínas e peptídeos, específicos, no plasma ou soro (em concentrações não usuais) pode ser um diagnóstico precoce de certas doenças que acometem humanos ou animais. Então, um método que seja capaz de avaliar proteínas e peptídeos diretamente em uma amostra e, ainda, sem qualquer pré-tratamento ou separação, é extremamente vantajoso. Esta detecção direta pode ser baseada em métodos que fazem uso de interação específica de proteínas, por exemplo, uma proteína recombinante de *Mycobacterium bovis*, bactéria que causa a tuberculose bovina (TB) com anticorpos contra a mesma doença.

Os anticorpos são proteínas, presentes no plasma, produzidas devido a uma resposta imunológica à presença de uma substância estranha

(com um peso molecular maior que 1,5kDa), denominado antígeno, e tem uma afinidade específica por este antígeno. A imunointeração de proteínas em solução com suas proteínas complementares imobilizadas em uma superfície leva a variações, por exemplo, no índice de refração, na espessura e na constante dielétrica da camada imobilizada. Estas propriedades são exploradas em biossensores ópticos, eletroquímicos e piezoelétricos [1].

O biossensor por impedância eletroquímica permite o monitoramento quantitativo e qualitativo de proteínas, bactérias ou outros patógenos, pela medida de mudanças nas propriedades capacitivas e resistivas de um meio ou de eletrodos. Essa técnica é sensível a fenômenos interfaciais. A interação analisada pelo biossensor é semelhante à do tipo que

é atualmente empregada no ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*), técnica eficiente, no entanto cara, demorada e com um razoável nível de interações inespecíficas que levam a resultados falso-positivos ou falso-negativos [2-6].

As nanopartículas são aplicadas na construção de biossensores, por mostrarem resultados muito interessantes no incremento da resposta [7]. As nanopartículas realçam os sinais em muitas aplicações devido à suas propriedades eletrônicas, fotônicas e catalíticas únicas. A interação específica entre moléculas alvo e conjugado nanopartícula-anticorpo induz alterações das propriedades elétricas tais como resistência e capacitância, que podem ser representadas como mudanças na impedância. Além disso, são fáceis de preparar, têm boa biocompatibilidade e área superficial relativamente elevada. Proteínas adsorvidas diretamente sobre superfícies metálicas de maior dimensão usualmente são desnaturadas e perdem sua bioatividade, ao contrário do que ocorre quando adsorvidas em nanopartículas de ouro [8, 9].

#### Materiais e métodos

Um eletrodo limpo foi imerso em um sol previamente hidrolisado do precursor 3-mercaptopropil-trimetoxisilano (MPTS) por 30 minutos e enxaguado com etanol e água deionizada. Então, o eletrodo Au/MPTS foi imerso em nanopartículas de ouro (AuNPs), protegido da luz, por 5h a 4°C. Em seguida, o eletrodo Au/MPTS/AuNPs foi enxaguado com água deionizada e exposto a 150µL de antígeno (proteína recombinante) AgTB 5,0µg mL<sup>-1</sup> em tampão fosfato salino (PBS) 10mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,2) por aproximadamente 15h a 4°C [10]. O eletrodo resultante Au/MPTS/AuNPs/AgTB foi enxaguado com PBS e exposto a 150µL de albumina de soro bovino (BSA) 5,0µg mL<sup>-1</sup> por 30 minutos a temperatura ambiente e enxaguado com PBS. E por fim, o eletrodo foi exposto a 150µL de soro bovino reconhecidamente positivo ou negativo para tuberculose bovina, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C. Em seguida, o imunossensor Au/MPTS/AuNPs/AgTB/AcTB foi enxaguado com PBS.

As medidas de impedância foram realizadas em um potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT 128N, da Metrohm Autolab®, controlado pelo *software* EcoChemie B.V., FRA (v. 4.9.005) para aquisição de dados. As análises dos espectros de impedância e a simulação dos circuitos equivalentes foram feitas com o auxílio do *software* EcoChemie B.V., NOVA (v. 1.6.005). Foi aplicada

ao eletrodo de trabalho uma onda senoidal com 10mV de amplitude e um potencial de 220mV vs. Ag/AgCl KCl 3,0 mol L<sup>-1</sup>, em uma faixa de frequência de 0,1 a 104Hz com 10 pontos por década [11].

#### Resultados e discussão

A superfície do eletrodo de ouro, em cada estágio de modificação, foi caracterizada utilizando a EIE. O comportamento eletroquímico do par redox [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-3/4</sup> foi investigado. A Fig. 1(A) mostra os diagramas de Nyquist da superfície do ouro sem modificação, modificada com MPTS e depois com AuNPs, com a imobilização da proteína AgTB e após a interação AgTB-AcTB. Foi observado que cada etapa de modificação do eletrodo altera as propriedades eletroquímicas da superfície.

O eletrodo de ouro limpo (EL) exibiu um comportamento aproximadamente retilíneo, que é característica de um processo eletroquímico controlado por difusão. Quando o eletrodo foi modificado como MPTS, a cinética de transferência de elétrons foi perturbada e observa-se o aparecimento de uma parcela representada por um semicírculo no espectro, indicando a formação de uma camada de bloqueio para a difusão da espécie eletroativa até a superfície do eletrodo. As AuNPs ancoradas no filme exercem um importante papel na transferência eletrônica e a resistência fica bem próxima daquela do eletrodo sem modificação. As AuNPs agem como minúsculos centros de condução. A resistência à transferência eletrônica é novamente observada com a imobilização do antígeno (AgTB), indicando que a proteína está adsorvida na superfície das AuNPs bloqueando estes sítios de condução eletrônica.

A EIE é uma técnica sensível a fenômenos interfaciais. Sendo assim, a ligação entre o antígeno e o anticorpo é evidenciada pelo novo aumento da resistência à transferência eletrônica. A aplicação do imunossensor resultou na detecção específica de anticorpos contra tuberculose bovina (AcTB) presentes em soro reconhecidamente positivo. A especificidade do imunossensor foi testada utilizando soro reconhecidamente negativo (ausência de anticorpos específicos contra tuberculose bovina). Os gráficos na Fig.1(B) mostram que nenhuma variação significativa de resistência à transferência eletrônica foi observada quando o imunossensor foi testado em soro negativo.

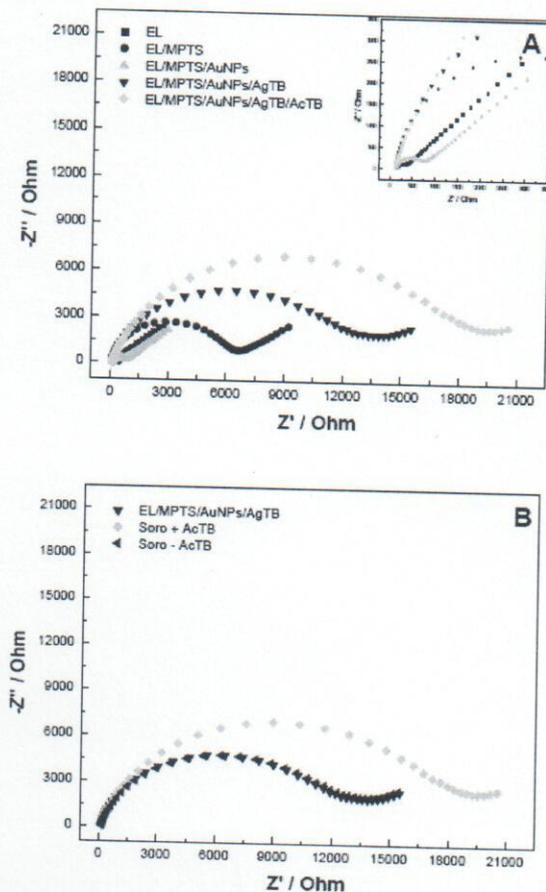


Figura 1: Gráficos de Nyquist (A) obtidos para o eletrodo de ouro em diferentes etapas do processo de montagem e (B) obtidos após aplicação do imunossensor para análise de soros reconhecidamente positivos ou negativos para tuberculose bovina, em solução  $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$  em PBS pH 7,2 e KCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  [11].

## Conclusões

A EIE tem se mostrado adequada para acompanhar as etapas de modificação do eletrodo e, também, como método de detecção de proteínas. Até o momento, os resultados mostraram que a proteína recombinante imobilizada manteve sua atividade biológica, respondendo especificamente a anticorpos contra tuberculose bovina nos soros analisados, indicando que o imunossensor desenvolvido apresenta potencial para aplicações futuras em diagnóstico laboratorial dessa e de outras doenças que acometem bovinos.

## Agradecimentos

CNPq, FINEP, Embrapa, UFMS e CAPES

## Referências

1. R. Liang; J. Qiu; P. Cai *Analytica Chimica Acta* 2005, 534, 223.
2. D. Berdat; A. Marin; F. Herrera; M. A. M. Gijs *Sensors and Actuators B* 2006, 118, 53.
3. G. H. Kim; A. G. Rand; S. V. Letcher *Biosensors and Bioelectronics* 2003, 18, 91.
4. S. M. Radke; E. C. Alocilja *Biosensors and Bioelectronics* 2005, 20, 1662.
5. Y. Sun; F. Yan; W. Yang; S. Zhao; W. Yang; C. Sun *Analytical Bioanalytical Chemistry* 2007, 387, 1565.
6. D. Tang; R. Yuan; Y. Chai; X. Zhong; Y. Liu; J. Dai *Clinical Biochemistry* 2006, 39, 309.
7. J. M. Pingarrón; P. Y. Sedenó; A. G. Cortés *Electrochimica Acta* 2008, 53, 5848.
8. S. Zhang; N. Wang; Y. Niu; C. Sun *Sensors and Actuators B* 2005, 109, 367.
9. L. P. Lu; S. Q. Wang; X. Q. Lin *Analytica Chimica Acta* 2004, 519, 161.
10. J. Jia; B. Wang; A. Wu; G. Cheng; Z. LI; S. Dong *Analytical Chemistry* 2002, 74, 2217.
11. J. A. Carvalho, MSc. Theses, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2011.