

**Desenvolvimento de plataformas nanoestruturadas para a biodeteccção de  
Shistosoma Mansoni**

**Development of nanostructured platforms for the biodetection of Shistosoma  
Mansoni**

DOI:10.34117/bjdv6n11-503

Recebimento dos originais: 20/10/2020

Aceitação para publicação: 24/11/2020

**Giselle Soares Dos Santos**

Doutora em Bioquímica e Fisiologia

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50670-901

E-mail: giselless84@yahoo.com.br

**Fábio Lopes De Melo**

Doutor em Saúde Pública

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães.

Endereço: Av. Moraes Rego s/n; Departamento de parasitologia, Cidade Universitária, 50670420 -

Recife, PE - Brasil - Caixa-postal: 7472

E-mail: fabio@cpqam.fiocruz.br

**César Augusto Souza De Andrade**

Professor Associado IV da Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50670-901

E-mail: csrandrade@gmail.com

**Maria Danielly Lima De Oliveira**

Professor Associado I da Universidade Federal de Pernambuco

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Endereço: Avenida Professor Moraes Rêgo S/N, Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50670-901

E-mail: m\_danielly@yahoo.com.br

**RESUMO**

A esquistossomose é uma doença negligenciada, estreitamente relacionada com os baixos níveis de desenvolvimento social e um grave problema de saúde pública. Neste trabalho, foi desenvolvido um sistema de camadas auto-montadas de silano na superfície de um eletrodo de ouro e nanopartículas de ouro eletroquimicamente depositadas para a detecção do Schistosoma mansoni utilizando uma sonda tiolada de DNA de Schistosoma mansoni como elemento de bioreconhecimento. Técnicas eletroquímicas como a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e voltametria cíclica (VC) são ferramentas úteis para o desenvolvimento destes dispositivos. A partir da análise dos resultados foi possível verificar que o compósito manteve a capacidade de estabelecer uma imobilização estável da molécula de DNA. A plataforma desenvolvida apresentou um limite de detecção de DNA de  $0.6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

**Palavras-Chave:** Esquistossomose, eletrodeposição, genossensor.

## **ABSTRACT**

Schistosomiasis is a neglected disease closely related to the low levels of social development and a serious public health problem. In this work, we developed a system based on self-assembled layer of silane compounds and gold nanoparticles deposited electrochemically on the gold electrode surface to detect *Schistosoma mansoni* using DNA thiolated probe as biorecognition element. Electrochemical techniques such as electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and cyclic voltammetry (CV) are useful tools for the development of these devices. Based on the analysis of the results we found that the nanocomposite has retained the ability to establish a stable immobilization of DNA. The developed platform showed a DNA detection limit of  $0.6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ .

**Keywords:** Schistosomiasis, electroplating, genossensor.

## **1 INTRODUÇÃO**

A esquistossomose mansônica (EM) é uma parasitose causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*, censo uma doença importante no contexto da saúde pública brasileira, uma vez que, no Brasil, a doença foi notificada em todos os estados (SOUSA et al., 2011; KATZ, 2018). A confirmação diagnóstica da esquistossomose é realizada principalmente pela análise de amostras fecais (método Kato-Katz), que atualmente é o método preconizado pela Organização Mundial de Saúde e pelo Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose-PCE (PALMEIRA et al., 2010; KATZ, 2018). Em adição, testes diagnósticos, como ELISA, imunoenensaio de fluorescência indireta e radioimunensaio também são utilizados. Mas, geralmente necessitam de longos períodos para a análise e apresentam baixa sensibilidade (WU et al., 2006). Desta forma, há a necessidade do desenvolvimento de métodos sensíveis, rápidos e seletivos para a detecção do *Schistosoma*. Uma alternativa para superar estas limitações é o uso de biossensores (SOUSA et al., 2020). Os recentes avanços em biossensores baseados na hibridização de ácidos nucleicos têm levado ao desenvolvimento da tecnologia em genossensores para as análises da sequência de DNA (XU et al., 2011). Especificamente, os biossensores baseados em hibridização eletroquímica, demonstram grande promessa para a identificação de patógenos, detecção de mutação, e determinação de sequência genômica. Os genossensores são dispositivos eletroanalíticos que incorporam uma camada genética imobilizada na superfície de um transdutor, como elemento de reconhecimento, e convertem sinais de interação entre bases nitrogenadas específicas, em sinais analíticos mensuráveis (CAMPUZANO et al., 2014).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são usadas para imobilizar sondas de DNA tiolada na superfície do eletrodo, devido às suas propriedades, tais como reter a atividade biológica, condução eficiente do sinal eletroquímico entre transdutor e a interface o que permite amplificar a resposta

elétrica. O organosilano 3-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS) oferece uma monocamada auto-montada em ouro e age de forma eficiente entre a superfície do eletrodo e filmes derivados de sol-gel (BONANNI et al., 2011). A determinação eletroquímica tem atraído bastante atenção, pois os métodos eletroquímicos têm as vantagens de baixo custo, alta sensibilidade e ser de fácil manuseio desta forma, a voltametria Cíclica (VC) e a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) foram utilizadas como ferramentas para os estudos da caracterização da interação Sonda-genoma. Como objetivo, este trabalho visa à síntese eletroquímica de nanopartículas sobre a superfície do eletrodo para produção de um genossensor eletroquímico para detecção do *S. mansoni*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

3-Mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTS) e Ácido Cloroaurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, MO, EUA) e o ferro-ferrocianeto de potássio foi adquirido da VETEC (Brasil). As soluções de DNA foram preparadas em tampão de fosfato pH 7.4, todos os outros reagentes e solventes foram de grau analítico.

As nanopartículas de ouro foram diretamente depositadas sobre o eletrodo de trabalho previamente modificado com o MPTS. Foi utilizada uma faixa de potencial de -0,2 a 1,3 V vs Ag / AgCl ciclado 30 vezes a uma velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>, numa solução a 1mM de  $\text{HAuCl}_4$  contendo 0,5M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

Os experimentos de EIE e VC foram realizados utilizando um potenciostato / galvanostato PGSTAT 128N (Autolab, Holanda) em uma célula convencional de três eletrodos sendo um de trabalho, um auxiliar e um de referência. O eletrodo de trabalho utilizado foi o de ouro, o de platina como contra eletrodo e o de referência foi o Ag/AgCl saturado com KCl. Foi utilizada uma solução de 10 mM de ferro-ferricianeto de potássio como par redox. As análises voltamétricas foram analisadas a um potencial de -0,2 a 0,7 V. Os espectros de impedância foram registrados na faixa de frequências de 100 mHz a 100kHz.

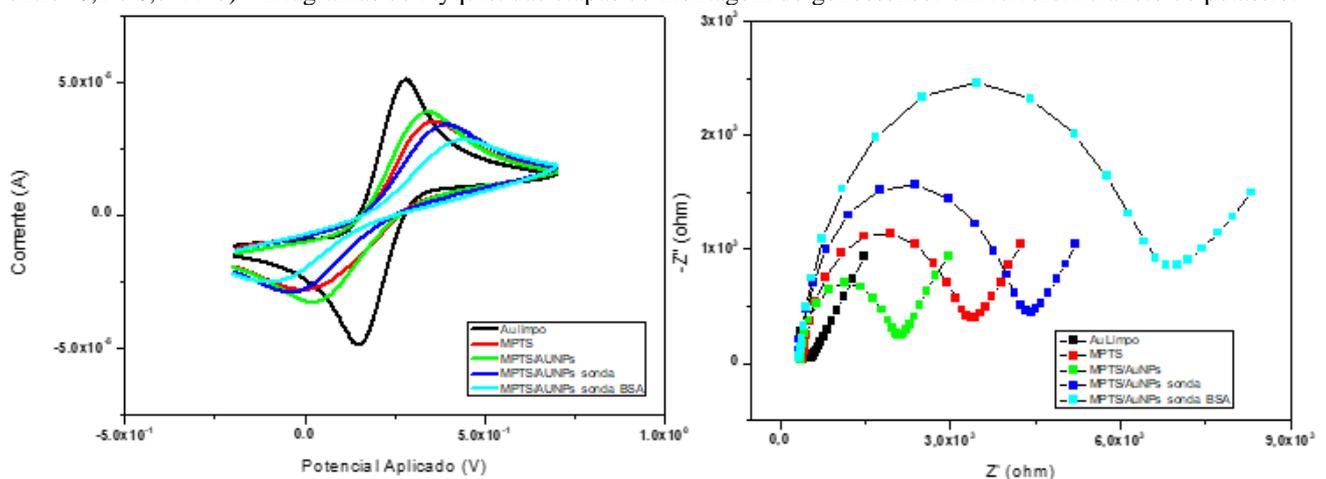
A modificação da superfície do eletrodo teve a seguinte sequência: adição de 4 µL de MPTS por 1 minuto, em seguida as nanopartículas foram eletrodepositadas. Posteriormente, incubou-se a sonda<sub>*schistosoma*</sub> por 10 min e por fim o sistema sensor foi exposto a diferentes concentrações do DNA genômico. As análises de adsorção ao eletrodo foram realizadas após cada etapa de modificação da superfície.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de métodos eletroquímicos para obtenção de nanopartículas tem se mostrado vantajoso por: aumentar a condutividade do eletrodo, facilitar a transferências de elétrons além de melhorar a sensibilidade analítica e seletividade (KIM et al., 2008). Neste sentido o comportamento eletroquímico do eletrodo modificado com MPTS/AuNPs foi caracterizado por VC e EIE.

A Figura 1A mostra a voltametria cíclica das etapas de montagem do genossensor onde podemos observar que antes da modificação as correntes de pico redox encontram-se bem definidas. Depois da modificação do eletrodo com o MPTS houve uma diminuição desses picos comprovando a formação da camada de MPTS na superfície do eletrodo dificultando assim a transferência de elétrons entre a superfície do ouro e a solução redox. O grupamento tiol expostos pelo MPTS é importante para a posterior ancoragem das nanopartículas de ouro (AuNps) via eletrodeposição. Seguida da eletrodeposição das AuNPs houve um acréscimo nas correntes de pico. Este comportamento indica que as AuNPs foram eficientemente ancoradas pelo grupamento tiol expostos pelo MPTS levando ao aumento da área de superfície eletroativa do eletrodo. Com a imobilização da sonda de DNA tiolada, ocorreu nova diminuição da corrente, em decorrência à repulsão eletrostática entre o par redox e a sonda de DNA na superfície do eletrodo. Por fim após adição de amostra com DNA complementar, nova redução foi observada indicando a ocorrência do processo de hibridação.

Figura 1. a) – Voltamograma cíclico das etapas de montagem do genossensor em meio ferroferricianeto de potássio pH 7.4 entre -0,2 e 0,7 V. b) – Diagramas de Nyquist das etapas de montagem do genossensor em ferroferricianeto de potássio.

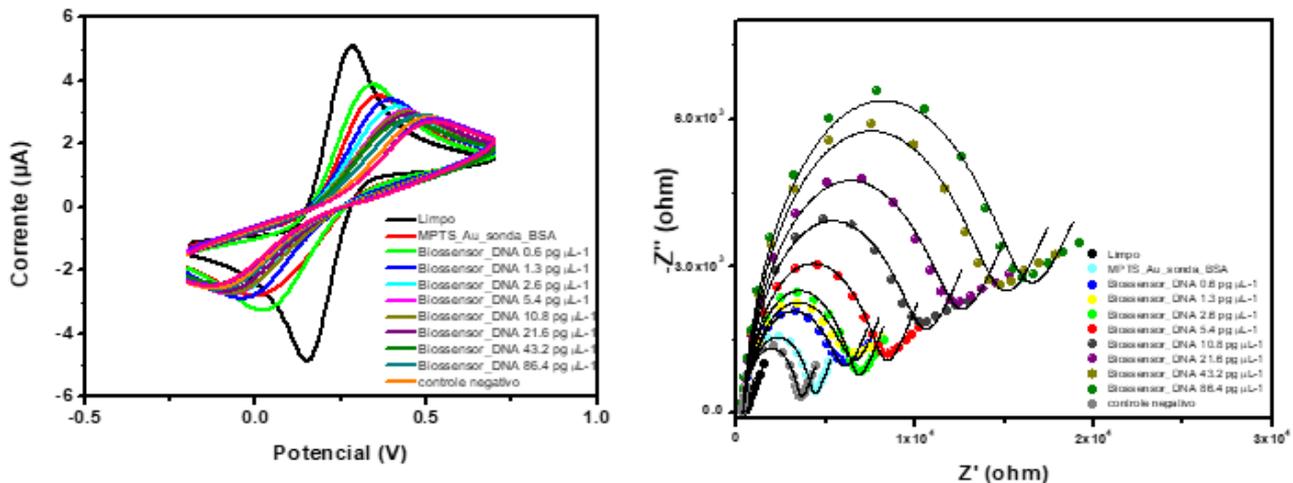


Todas as etapas de construção do genossensor foram também caracterizadas por EIE. Desta forma, o diâmetro do semicírculo no diagrama de Nyquist representa a resistência à transferência de carga ( $R_{tc}$ ), que controla a cinética de transferência eletrônica do processo redox na superfície do eletrodo (WANG et

al., 2011; KANG et al., 2009). A Figura 1b apresenta os diagramas de Nyquist das etapas de desenvolvimento do genossensor.

Com o objetivo de analisar a sensibilidade do sensor desenvolvido a plataforma sensora foi exposta a amostras contendo DNA de *Schistosoma* em diferentes concentrações. A Figura 2 mostra o comportamento do sistema sensor frente a diferentes concentrações de DNA genômico de *S. mansoni*.

Figura 2 – Resposta voltamétrica e impedimétrica do genossensor frente a diferentes concentrações de DNA de *Schistosoma mansoni*.



#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o sistema desenvolvido manteve a capacidade de estabelecer uma imobilização estável da sonda específica para a o *S mansoni*, sendo assim a plataforma sensora obtida mostrou-se eficiente na detecção do genoma do *Schistosoma* frente a diferentes concentrações do DNA, com limite de detecção de  $0.6 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . Desta forma, o genossensor desenvolvido mostra-se como uma ferramenta importante para a construção de um método diagnóstico mais sensível, rápido e com baixo custo para a esquistossomose.

#### AGRADECIMENTOS

CAPES, FACEPE, CNPq e Rede Nanobiotecnologia-CAPES.

**REFERÊNCIAS**

- BONANNI, A.; PUMERA, M.; MIYAHARA, Y. Influence of gold nanoparticle size (2–50 nm) upon its electrochemical behavior: an electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric study *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 4980–4986
- CAMPUZANO, S., PEDRERO, M., PINGARRÓN, J.M. Electrochemical genosensors for the detection of cancer-related miRNAs. *Anal Bioanal Chem.* 406, 27-33, 2014.
- KANG, X.; WANG, J.; WU, H.; AKSAY, I. A.; LIU, J.; LIN, Y. Glucose oxidase-graphene-chitosan modified electrode for direct electrochemistry and glucose sensing. *Biosens. Bioelectron.* 2009, 25, 901.
- KATZ, N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte: CPqRR, 2018.
- KIM, G.Y.; SHIM, J.; KANG, M.S.; MOON, S.H. Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. *J. Hazard. Mater.* 2008, 156, 141.
- PALMEIRA, D.C.C.; CARVALHO, A.G.; RODRIGUES, K.; COUTO, J.L.A. 2010. Prevalência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43(3):313-317.
- SOUSA, C.F.B.; MOTA, L.T.M.; VALENTE, R.K.M.; GOMES, W.E.; SILVA, V.C.S. mplementação de biossensor portátil utilizando tecnologia wi-fi para detecção de compostos fenólicos em ambiente urbano. *Braz. J. of Develop.*, Curitiba, v.6, n.8, p.59469-59480.
- SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P. 2011. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Bras Clin Med*;9(4):300-7.
- WANG, K.; LIU, Q.; DAI, L.; YAN, J.; JU, C.; QIU, B.; WU, X. A highly sensitive and rapid organophosphate biosensor based on enhancement of CdS-decorated graphene nanocomposite. *Anal. Chim. Acta* 2011, 695, 84.
- WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. 2008. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies, *Nanoscale Res. Lett.* 3 397–415.
- XU, Z.; HU, C.; HU, G. 2011. Layer-by-layer self-assembly of multilayer films based on humic acid, *Thin Solid Films* 519, 4324–4328.