

UNIVERSIDADE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JULIANA NAOMI YAMAUTI COSTA

Desenvolvimento de biossensor para detecção de Zika e Dengue

São Carlos
2020

JULIANA NAOMI YAMAUTI COSTA

Desenvolvimento de biosensor para detecção de Zika e Dengue

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Bacharel em Física Biomolecular.

Orientadora: Dr^a. Isabella Sampaio do Nascimento

São Carlos
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC, com os dados fornecidos pela autora

Costa, Juliana Naomi Yamauti

Desenvolvimento de biossensor para detecção de Zika e Dengue / Juliana Naomi Yamauti Costa; orientadora Isabella Sampaio do Nascimento – São Carlos, 2020.

28 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Físicas e Biomoleculares) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Biosensor. 2. Nanomateriais. 3. SPR. 4. Zika. 5. Dengue. I.

Desenvolvimento de biossensor para detecção de Zika e Dengue. II. Do Nascimento, Isabella Sampaio, orient.

RESUMO

Zika e Dengue são doenças virais transmitidas principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti*. A sua identificação é importante para a atualização dos dados epidemiológicos que permitem a avaliação da eficiência das medidas de combate aos vetores e, especialmente, para mulheres que desejam engravidar, visto que a infecção por Zika pode causar a microcefalia dos bebês. Os atuais métodos de diagnóstico, como o teste imunoenzimático ELISA e o molecular PCR, apresentam alto custo e são demorados, inviabilizando o diagnóstico amplo no sistema público de saúde. Assim, o desenvolvimento de um biossensor simples, rápido e de baixo custo para detecção dessas doenças é altamente desejável. Este projeto tem como objetivo o desenvolvimento de um biossensor que se baseia na agregação de nanopartículas (AuNPs) e nanorods de ouro (AuNRs) funcionalizados com sequências de DNA específicas como indicador colorimétrico da infecção por Zika e Dengue, destacando sua inovação através da elaboração de um sistema híbrido. A otimização dos sistemas de cada nanomaterial foi feita separadamente. Para a funcionalização das AuNPs com sequências de DNA da Dengue, foram otimizados os parâmetros de proporção DNA:AuNPs, meio de ressuspensão e concentração de sal. As condições que favoreceram a estabilidade e seletividade do sistema foram: proporção 1000:1 com adição de NaCl nas concentrações 50 mM/150 mM e ressuspensão com PBS das AuNPs funcionalizadas. Nessa configuração, o sistema diferenciou a sequência alvo (TP) da não-complementar (NC) - que nesse caso foram sequências de Zika. Para a funcionalização dos AuNRs com sequências de Zika, foram realizados testes de revestimento, concentração de sal e proporção de DNA:AuNRs. As melhores condições foram obtidas com AuNRs revestidos com citrato, proporção 2400:1 e adição de NaCl nas concentrações 50 mM/150 mM. O espectro UV-Vis do sistema híbrido apresentou duas bandas: uma transversal correspondente às AuNPs e outra longitudinal, correspondente aos AuNRs - mostrando-se funcional para a avaliação conjunta de cada nanomaterial. Assim, ambos os sistemas nanoestruturados demonstraram grande potencial de diagnóstico, pois foram capazes de identificar suas respectivas sequências alvo. Os próximos passos envolvem a otimização da etapa de detecção, a fim de melhorar sua sensibilidade e especificidade, e a análise estatística. Após as otimizações individuais, será avaliado o funcionamento do sistema híbrido e seu desempenho com amostras reais.

Palavras-chave: Biosensor. Nanomateriais. SPR. Zika. Dengue.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Doenças humanas virais no Brasil	7
1.2	Métodos de diagnóstico.....	7
1.3	Biossensores associados a nanomateriais	8
2	MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1	Materiais	11
2.2	Síntese de nanomateriais	11
2.2.1	Síntese de AuNPs revestidas com citrato	11
2.2.2	Síntese de AuNRs revestidos com CTAB e citrato	11
2.3	Caracterização de nanomateriais sintetizados e funcionalizados	12
2.4	Funcionalização	13
2.4.1	Preparo das sequências de DNA.....	13
2.4.2	AuNPs.....	13
2.4.3	AuNRs.....	13
2.5	Hibridização	13
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
3.1	Otimização do sistema com AuNPs e detecção de Dengue	15
3.2	Otimização do sistema com AuNRs e detecção de Zika.....	19
3.3	Sistema híbrido de nanomateriais	23
4	CONCLUSÃO.....	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças humanas virais no Brasil

Zika e Dengue são doenças causadas por patógenos do tipo arbovírus, são pertencentes à mesma família e compartilham do mesmo vetor, tendo como principal via de transmissão o mosquito *Aedes aegypti*. Ambas são endêmicas no Brasil devido às condições sociais, econômicas e ambientais, que favorecem o desenvolvimento do vetor e potencializam sua propagação.

Em 2020 o Brasil atingiu 931.903 casos prováveis de Dengue e 6.705 de Zika, simultaneamente ao aparecimento da pandemia causada pelo SARS-CoV-2, com mais de 2 milhões de casos registrados (1). Essa coincidência temporal pode promover o colapso do sistema de saúde, além de dificultar a determinação do diagnóstico devido às similaridades entre os sintomas (2). Um fator agravante é a associação da infecção por Zika vírus (ZIKAV) ao desenvolvimento de severas complicações neurológicas, como a microcefalia em fetos e a síndrome de Guillain-Barré (3). O correto diagnóstico é essencial para a obtenção de dados epidemiológicos mais representativos, avaliação da eficiência das medidas adotadas para o controle dos vetores, estudo da relação da infecção de Zika com os casos de microcefalia e a diferenciação dessas doenças em regiões em que possuem incidência - tornando o desenvolvimento de testes rápidos e de baixo custo ainda mais importantes no contexto epidemiológico do país.

1.2 Métodos de diagnóstico

Os principais testes laboratoriais utilizados para diagnósticos de infecção por arbovírus são sorológicos ou moleculares. Dentre eles temos detecção de anticorpos IgM ou IgG através da técnica ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*) ou detecção de ácidos nucleicos virais por transcrição reversa da cadeia da polimerase (do inglês, *reverse transcription polymerase chain reaction - RT-PCR*) (4). Entretanto, esses métodos possuem limitações como alto custo, pouca portabilidade, demora na obtenção dos resultados e acurácia. Testes sorológicos, por exemplo, são os mais empregados, mas não conseguem distinguir o ZIKAV de vírus relacionados (5) devido a alta homologia estrutural e de sequência de proteínas, que promovem intensa reatividade cruzada (6).

1.3 Biossensores associados a nanomateriais

Biossensores são dispositivos analíticos projetados para converter respostas físico-químicas provenientes da interação específica biomolécula-analito em sinais mensuráveis. Eles são atraentes porque realizam análises de maneira não-invasiva ou pouco invasiva, de baixo custo e alta seletividade, como os glicosímetros ou teste de gravidez (7). Dentre eles, biossensores ópticos se destacam porque oferecem rapidez e simplicidade às análises. Possuem como estrutura principal um transdutor óptico, que induz mudanças na absorção, transmissão, reflexão, refração, fase, amplitude, frequência ou polarização da luz em resposta a uma mudança físico-química proveniente do biorreconhecimento na sua interface, fornecendo múltiplos parâmetros para a detecção (8). Uma das classes dos biossensores ópticos são os colorimétricos, os quais são vantajosos para análises instantâneas de resposta visual (mudança de cor), ideais para modelos *point-of-care*, sem a necessidade de equipamentos sofisticados.

A nanotecnologia tem promovido a descoberta de novos materiais que têm sido associados a sensores para sofisticar e aumentar a sensibilidade dos diagnósticos. Dentre eles, temos os nanomateriais plasmônicos que têm sido amplamente introduzidos nos sensores colorimétricos devidos às suas propriedades ópticas e físicas, as quais amplificam o sinal e a sensibilidade do biossensor (9). Possuem esse nome devido a um fenômeno típico de nanopartículas metálicas (metais nobres) chamado de ressonância plasmônica de superfície (do inglês, *surface plasmon resonance - SPR*) que ocorre quando elas são expostas à luz, induzindo a oscilação coletiva dos elétrons livres (ressonância) devido ao seu campo eletromagnético. Dessa forma, é gerada uma separação de cargas na superfície da partícula, formando um dipolo que oscila na direção do campo elétrico da luz, com amplitude máxima em uma frequência específica, denominada SPR, conforme Figura 1 (10). Quando a frequência da luz incidente é a mesma da de SPR o efeito de ressonância ocorre, resultando em uma absorção óptica observável (11).

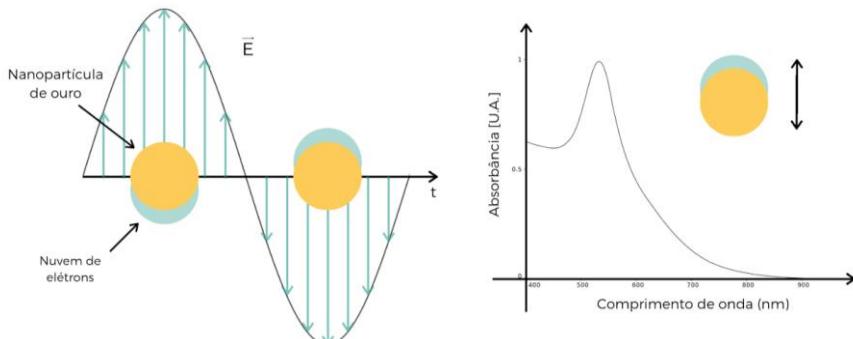


Figura 1 - Ilustração do fenômeno SPR e seu espectro em AuNPs.
Fonte: Elaborada pela autora.

Nanorods (AuNRs) possuem duas bandas de SPR (Figura 2), uma correspondente à oscilação dos elétrons no eixo longitudinal e outra fraca na região do visível, correspondente aos elétrons do eixo transversal (10). Devido a suas propriedades plasmônicas únicas, em que apresentam forte absorção e espalhamento de luz, possuem grande potencial de aplicação em sensores (12).

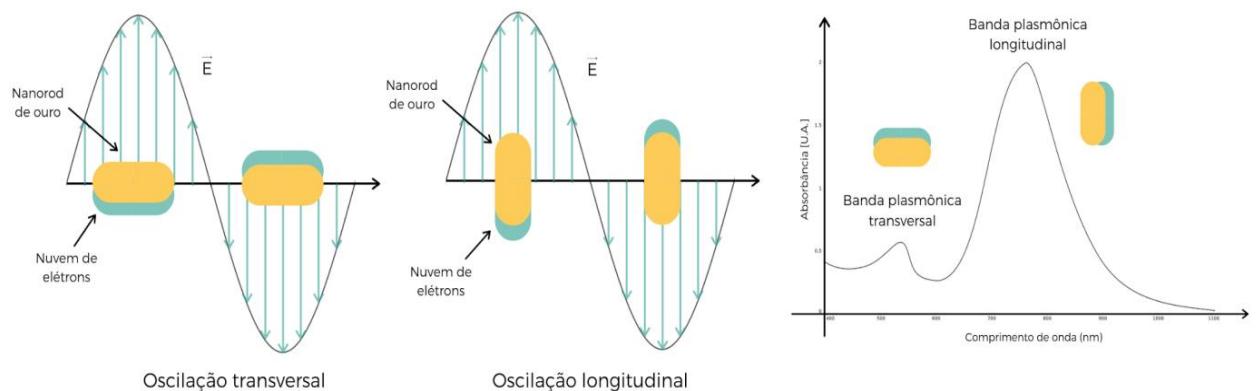


Figura 2 - Ilustração do fenômeno SPR e seu espectro em AuNRs, o qual apresenta duas bandas, uma correspondente ao eixo transversal e outra ao longitudinal.

Fonte: Elaborada pela autora

Por ser um fenômeno interligado à superfície do nanomaterial, mudanças no tamanho, forma ou da constante dielétrica do meio podem influenciar as oscilações dos elétrons, promovendo o deslocamento da banda de SPR. Devido a esta propriedade, passaram a ser empregados no desenvolvimento de nanosensores baseados na introdução de uma molécula alvo no sistema, a qual induz a mudança da coloração da solução devido a agregação ou transformação da morfologia das nanopartículas plasmônicas (9).

Este projeto visa utilizar essas bandas de absorção características como estratégia de detecção, empregando dois nanomateriais (AuNPs e AuNRs) associados a moléculas de DNA, estabelecendo sítios de reconhecimento. Assim, AuNPs serão destinadas a detecção de dengue, enquanto AuNRs serão utilizados na detecção de Zika, formando um sistema híbrido. O princípio de funcionamento do biossensor sendo desenvolvido é ilustrado na Figura 3. O DNA alvo é referido como TP, e suas sequências complementares como CP e RP. Assim, quando o TP é adicionado ao sistema híbrido ocorre a agregação do nanomaterial correspondente,

causando deslocamento em diferentes bandas de SPR - transversal para detecção de Dengue e longitudinal para detecção de Zika.

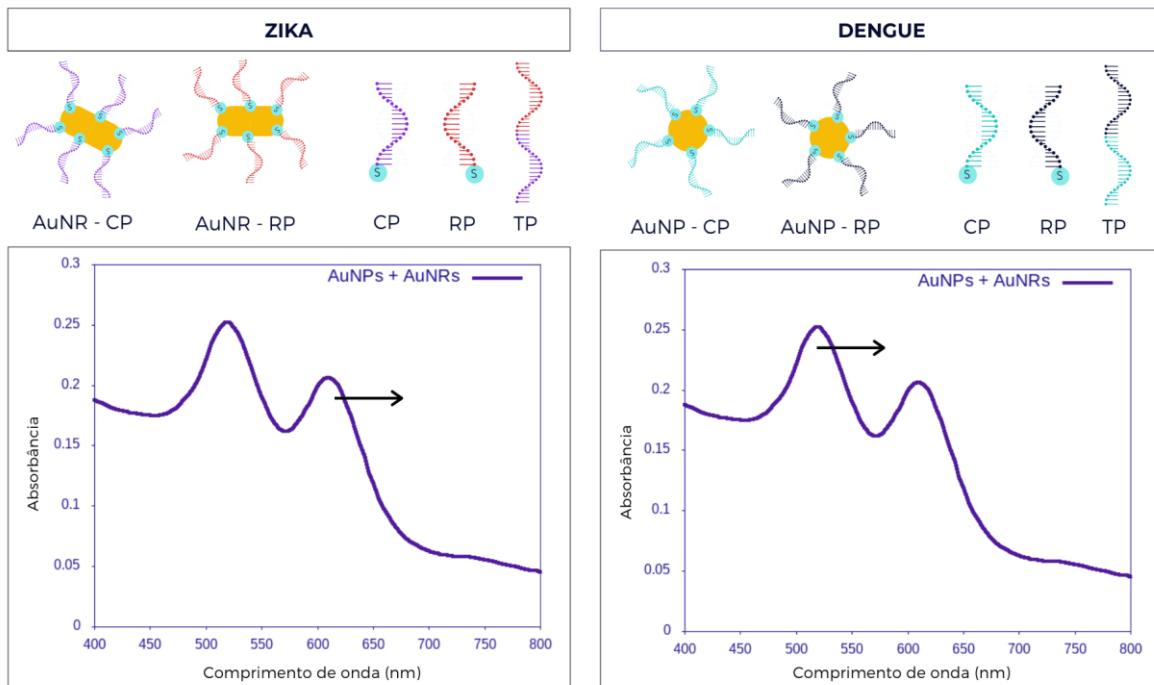


Figura 3 - À esquerda, a esperada para adição do DNA alvo da Zika, causando o deslocamento na banda longitudinal e, à direita resposta esperada da banda de SPR transversal com a adição do DNA alvo da Dengue.

Fonte: Elaborada pela autora.

Desenvolver um biossensor capaz de diagnosticar simultaneamente e diferenciar pacientes infectados com Zika ou Dengue é altamente desejável. O biossensor aqui descrito poderá ser introduzido após a amplificação isotérmica do material genético, de maneira a tornar a análise mais simples e rápida. Dessa forma, substitui métodos convencionais e mais caros, como eletroforese ou RT-PCR em tempo real, gerando maior acessibilidade, mantendo a especificidade do diagnóstico e trazendo inovação científica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

As soluções, quando em meio aquoso, foram preparadas com água ultrapura padrão Milli-Q (18,3 MΩ cm). Os materiais utilizados foram HAuCl₄ (ácido tetracloroáurico), citrato de sódio dihidratado, solução de NaCl 1M, tampão Tris-EDTA (tampão TE) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 7,4), tampão fosfato-salino (do inglês, phosphate buffered saline - PBS) (10 mM, 0,15 M NaCl, pH 7,4), brometo de cetiltrimetilamônio P.A. (CTAB) a 0,1 M, ácido ascórbico (AA) 0,1 M, nitrato de prata (AgNO₃) 0,01 M, borohidreto de sódio (NaBH₄) 0,01 M, poliestireno sulfonado (PSS), ditiotreitol (DTT), coluna de purificação NAP-5 (*GE Healthcare Life Sciences*), microplacas Greiner 96-poços e as seguintes sequências de DNA tioladas (CP e RP), armazenadas em tampão PBS: CP Dengue, TP Dengue, RP Dengue, CP Zika, TP Zika e RP Zika.

2.2 Síntese de nanomateriais

2.2.1 Síntese de AuNPs revestidas com citrato

As AuNPs foram sintetizadas a partir da redução do ácido cloroáurico (0,01%) com citrato de sódio dihidratado (1%) em solução aquosa. Assim, 20 mL de uma solução de cloreto áurico 0,01% foram aquecidos a 150 °C sob agitação de 1500 rpm; ao atingir 85 °C, adicionou-se 600 μL de citrato 1% pré-aquecido em banho térmico (feito em conjunto com o cloreto áurico). Ao atingir coloração avermelhada, o aquecimento foi desligado e a solução mantida em agitação constante por mais 30 min. A solução final foi revestida com papel alumínio e armazenada a 10 °C.

2.2.2 Síntese de AuNRs revestidos com CTAB e citrato

Foi utilizado o método mediado por sementes na presença do surfactante CTAB estabelecido por Nikoobakht e El-Sayed (13). Esse método consiste, basicamente, em duas etapas: síntese e crescimento das sementes. Para preparar 10 mL de solução de sementes, foram adicionados em sequência 250 μL de HAuCl₄ e 600 μL de NaBH₄ a 7,5 mL de CTAB, deixando a solução em agitação por 10 min semicoberta com papel alumínio - o NaBH₄ é um forte agente

redutor, reagindo exotermicamente com a água, liberando gás hidrogênio. Em seguida, a solução foi mantida em repouso por 2 h a 25 °C para a remoção do excesso de H₂, obtendo-se uma solução final de coloração marrom (14). Para o crescimento das sementes, foram adicionados em 47,5 mL de CTAB diferentes concentrações de reagentes (ajustados de acordo com a proporção de raios desejada): 3 mL de HAuCl₄, 600 µL de AgNO₃ e 480 µL de AA. A coloração do sistema mudou de amarelo escuro para transparente, indicando a redução de Au³⁺ para Au⁺. Em seguida, 100 µL de sementes foram adicionadas e o sistema foi retido em baixa agitação por 20 min - essa solução gera o crescimento anisotrópico das sementes. O sistema foi mantido à temperatura ambiente por 24h (14).

O excesso de CTAB na solução de AuNRs foi removido através da centrifugação a 30°C e 10000 g durante 5 min, esse processo foi repetido quando necessário. Como foram feitos testes com dois tipos de revestimento, os AuNRs resultantes foram funcionalizados com citrato para comparação com os revestidos com CTAB. Assim, 10 mL dos AuNRs anteriormente sintetizados foram centrifugados a 10000 g por 15 min (a fim de remover o excesso do surfactante), redispersos em Na-PSS a 0,15% até o mesmo volume inicial e deixados em repouso durante 2 h. A etapa com o PSS tem o objetivo de assegurar uma remoção eficiente de CTAB. Por fim, foi feita mais uma centrifugação com os mesmos parâmetros anteriores para a amostra ser redispersa em citrato de sódio a 5 mM e mantida em repouso por 12 h. Após essa etapa foi feito mais um ciclo de centrifugação, com volume final de 2 mL disperso em 5 mM de citrato de sódio.

2.3 Caracterização de nanomateriais sintetizados e funcionalizados

Os nanomateriais sintetizados foram caracterizados por técnicas físico-químicas, como espectroscopia do UV-Vis, onde foi obtida a localização das bandas de SPR de cada nanomaterial; espalhamento dinâmico de luz (do inglês, *Dynamic Light Scattering* - DLS), para determinação de seu tamanho; Potencial Zeta, para verificação de sua carga superficial; microscopia eletrônica de transmissão (do inglês, *Transmission Electron Spectroscopy* - TEM), para obtenção de imagens diretas dos nanomateriais; e análise de rastreamento de nanopartículas (do inglês, *Nanoparticle Tracking Analysis* - NTA), a fim de determinar a concentração das nanopartículas e dos nanorods (15). Ao serem funcionalizadas, foram caracterizadas por UV-Vis para comparação das bandas de SPR após hibridização com o DNA alvo. As dimensões dos AuNRs foram determinadas através das imagens obtidas por TEM, utilizando como ferramenta o software *ImageJ*.

2.4 Funcionalização

2.4.1 Preparo das sequências de DNA

As sequências de DNA modificadas (CP e RP) são recebidas com uma ligação dissulfeto, sendo necessário uma etapa de redução com um agente redutor para liberação do grupo tiol e posterior funcionalização (16). Para isso, as sequências liofilizadas foram ressuspensas em PB (100 mM, pH 8,4) contendo DTT 100 mM para redução da ligação dissulfeto. As soluções foram incubadas por 1h a 25 °C e 300 rpm e, em seguida, purificadas com coluna de purificação NAP-5 (*GE Healthcare Life Sciences*) e armazenadas em PBS. A concentração final das sequências foi determinada pelo *NanoDrop One*.

2.4.2 AuNPs

As AuNPs foram funcionalizadas com suas respectivas sequências de DNA tioladas (DNA-SH), as quais conseguem formar uma forte ligação Au-S (17). Após a determinação da concentração pelo NTA, foi feita a mistura de DNA e AuNPs em diferentes proporções por 1 h a 25 °C e agitação de 300 rpm. A concentração inicial determinada para todas as amostras foi de 2×10^{11} nanopartículas/mL, equivalente a ~0,33 nM. Foram montadas separadamente amostras de CP e RP, além de um controle com adição de PBS ao invés de DNA. Em seguida, foi feita a primeira adição de sal a partir de uma solução de NaCl 1 M; após 2 h, foi realizada uma segunda adição e, então, a mistura foi mantida em agitação por 15 h (18). 3 réplicas de 200 µL foram montadas para cada amostra de AuNPs-CP, AuNPs-RP e AuNPs não funcionalizadas para coleta dos espectros UV-Vis.

2.4.3 AuNRs

O procedimento é análogo ao anterior, no entanto, como a área superficial dos AuNRs é maior e por serem mais estáveis, foi testada também uma proporção maior e uma concentração de sal mais elevada.

2.5 Hibridização

Os nanomateriais funcionalizados com CP e RP foram centrifugados por 30 min a 12000 g para remoção do excesso de reagentes. Foi feita a ressuspensão para o volume inicial e CP e

RP foram misturados na proporção 1:1, sendo preparadas de 3-5 réplicas de 200 µL para que o espectro UV-Vis referente a etapa anterior à detecção fosse coletado.

Como verificação da seletividade do biosensor, para cada réplica foi adicionada a mesma quantidade de DNA - TP ou NC - sendo que nos controles foi adicionado apenas PBS, estabelecendo um volume final de 200 µL. TP, NC e PBS foram aquecidos previamente a 95 °C por 5 min para desnaturação, seguido de choque térmico em gelo por 3 min e mantidos à temperatura ambiente por 5 min. Em 3 réplicas foi adicionado TP, em outras 3 NC, e nas 3 utilizadas como controles adicionou-se PBS. As soluções foram incubadas por 1 h, a 25 °C e agitação de 300 rpm e os espectros de cada amostra foram coletados novamente. O intervalo de coleta foi 400 nm a 800 nm e as análises realizadas através do software *SpectraGryph v. 1.2.14*, com tratamento dos espectros pelo filtro Savitzky-Golay e localização das bandas com a ferramenta *Peak finder*. As etapas estão esquematizadas na Figura 4 a seguir:

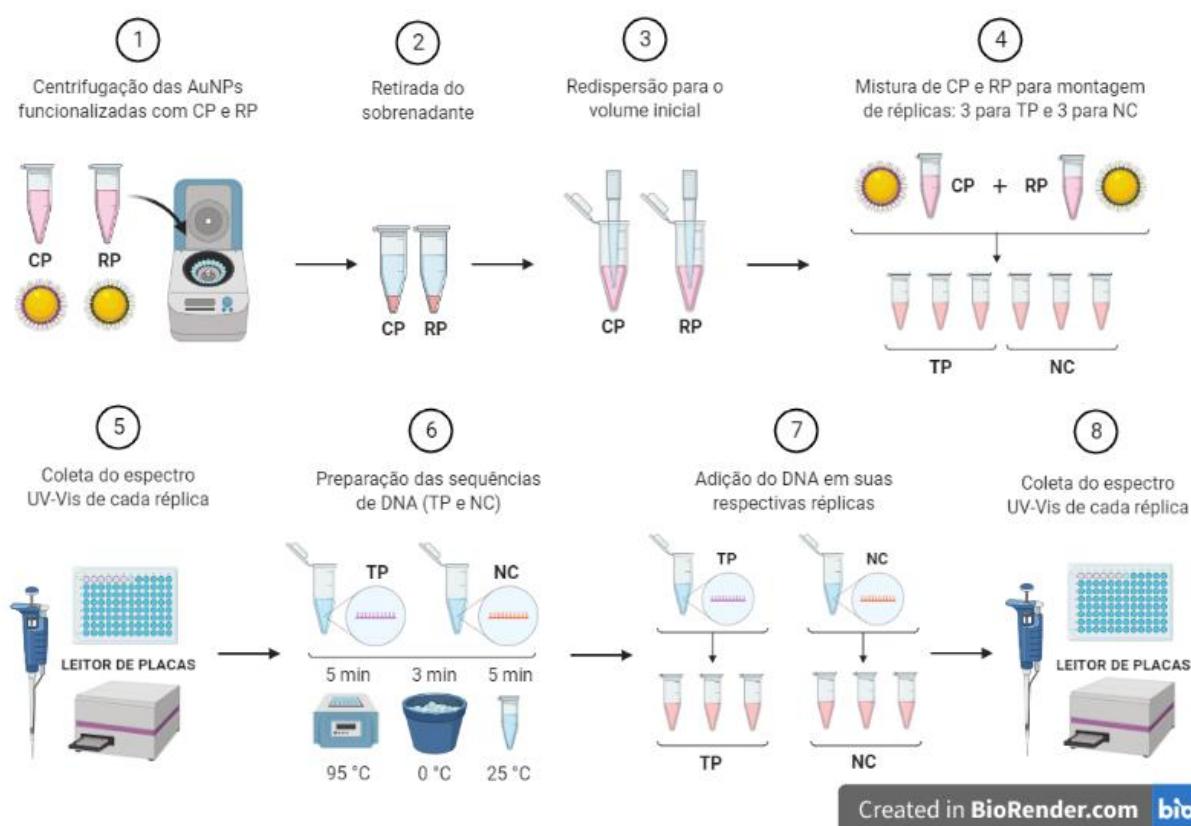


Figura 4 - Esquematização da metodologia utilizada para os testes de detecção. Criada com o BioRender.

Fonte: Elaborada pela autora.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir são referentes à otimização e testes dos sistemas individuais de cada nanomaterial (AuNPs e AuNRs) e, por último, do sistema híbrido, contendo os dois nanomateriais. Para as AuNPs, foram realizados experimentos de proporção de DNA:AuNPs e meio de ressuspensão na etapa de funcionalização e, para detecção de Dengue, de concentração de sal e DNA alvo. Já para os AuNRs, testes de revestimento, concentração de sal na etapa de funcionalização e de detecção de Zika. Como critério de análise foram observados os deslocamentos da banda de SPR após cada etapa, assim como o potencial Zeta e o raio hidrodinâmico obtido através do DLS.

3.1 Otimização do sistema com AuNPs e detecção de Dengue

Na etapa de síntese (Figura 5, A e B) foram observadas mudanças de cor da solução após a adição do agente redutor (citrato), as quais são relacionadas a redução dos íons de ouro (Au^{+3} a Au^0) e crescimento das AuNPs, obtendo-se uma solução avermelhada que indica que não há mais íons de ouro presentes na solução (Figura 5C) (19). A Figura 5D mostra o espectro de absorção no UV-Vis onde observa-se uma banda localizada em 518,8 nm, característica de AuNPs, indicando que a síntese foi bem sucedida. A partir de medidas de DLS foram determinados o diâmetro hidrodinâmico médio de $19,7 \pm 0,2$ nm e potencial zeta médio -28 ± 2 mV, indicando alta estabilidade das AuNPs (< -25 mV) (20). A concentração das AuNPs foi determinada por NTA, obtendo-se $(4,5 \pm 0,2) \times 10^{11}$ partículas/mL, a qual foi utilizada como padrão para todos os experimentos de funcionalização.



Figura 5 - A) Gradual transição de cor devido a redução dos íons de Au^{+3} a Au^0 . B) Crescimento das AuNPs. C) Solução final com coloração avermelhada, indicando estabilização das AuNPs. D) Espectro UV-Vis das AuNPs.

Fonte: Elaborada pela autora.

Um dos parâmetros analisados foi a concentração de DNA (CP ou RP) usada na etapa de funcionalização. Aumentando a proporção DNA:AuNPs, espera-se que a densidade de sequências na superfície das AuNPs aumente, promovendo maior estabilidade a elas. Dessa forma, foram testadas as proporções de 400:1 a 800:1 de DNA:AuNPs e as amostras foram caracterizadas por DLS e espectroscopia UV-Vis. A Figura 6 mostra as etapas de funcionalização com as sequências de DNA, em que são observadas mudanças colorimétricas que indicam se a funcionalização foi bem sucedida.

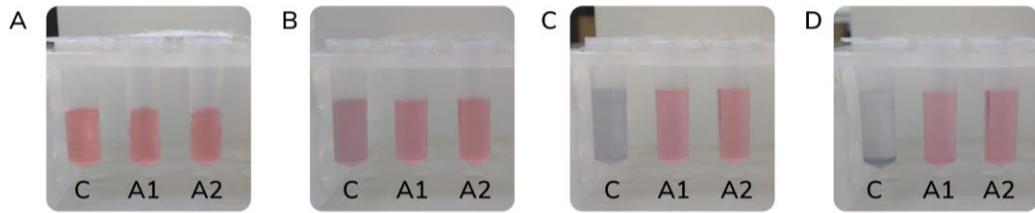


Figura 6 - Etapas da funcionalização, sendo “C” o controle, “A1” a amostra em que foi adicionado CP e “A2”, RP. A) Após adição do DNA, com exceção do controle em que foi adicionado PBS. B) Mudança de cor do controle após a primeira adição de sal, indicando agregação das AuNPs. C) Amostras após a segunda adição de sal. D) Após período de incubação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Devido à presença do sal, as AuNPs revestidas apenas com citrato se aproximam, passando a experienciar forças de Van der Waals atrativas e, consequentemente, se agregando (18). Como o DNA e as AuNPs são carregadas negativamente, a adição de sal é necessária para que a repulsão eletrostática entre ambos seja superada, tornando possível maximizar a densidade de sequências na superfície das AuNPs, promovendo estabilização estérica e forte repulsão eletrostática (21). Assim, é possível diferenciar quando ocorre a funcionalização, uma vez que em altas concentrações de sal as AuNPs revestidas com citrato se agregam causando a alteração na cor da solução de vermelho para azul. Quando funcionalizadas com DNA, as AuNPs se mantêm estáveis e a cor da solução não é alterada.

Para verificar se ocorreu mudança de tamanho das AuNPs devido à funcionalização com as sequências de DNA, realizou-se a caracterização das amostras através do DLS para cada proporção DNA:AuNPs testadas inicialmente.

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico médio das AuNPs funcionalizadas com CP.

Amostra	Diâmetro médio (nm)
CP 400:1	50 ± 4
CP 500:1	38 ± 8
CP 700:1	33,79 ± 0,08

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Diâmetro hidrodinâmico médio das AuNPs funcionalizadas com RP.

Amostra	Diâmetro médio (nm)
RP 400:1	97 ± 1
RP 500:1	61 ± 1
RP 700:1	48 ± 1

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostram que há o aumento do diâmetro hidrodinâmico médio após a funcionalização, o qual ocorre devido a formação de uma camada de DNA na superfície das AuNPs (22). Além disso, conforme a proporção de DNA aumenta, ocorre a diminuição do diâmetro médio, uma vez que a distribuição de tamanho se torna mais uniforme. Esse comportamento ocorre, possivelmente, devido à menor formação de agregados em decorrência do aumento na estabilidade das AuNPs para concentrações maiores de DNA. Também é possível observar que apesar do procedimento ser o mesmo, diferentes sequências de DNA (CP e RP) geram resultados distintos, os quais parecem afetar diretamente a estabilidade das AuNPs.

O espectro de absorbância UV-Vis também foi avaliado para cada proporção DNA:AuNPs, a fim de verificar o comportamento da banda de SPR antes (AuNPs revestidas com citrato) e após a funcionalização com DNA. Nesse caso, também foi testada a proporção 1000:1 e o deslocamento da banda de cada amostra (CP e RP) são apresentados na Figura 7.

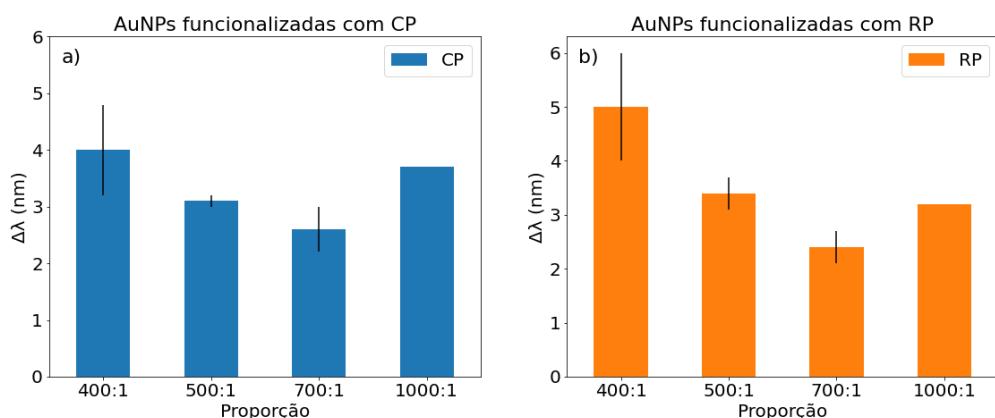


Figura 7 - Deslocamento da banda de SPR em cada teste de proporção para AuNPs funcionalizadas com a) CP e b) RP na concentração de sal 50 mM/150 mM.

Fonte: Elaborada pela autora.

O menor deslocamento da banda pode ser correlacionado com a maior estabilidade das AuNPs, uma vez que sua variação pode se dar tanto pela mudança do meio próximo à superfície quanto pela agregação das nanopartículas, como discutido por Yang et al (17). Neste caso, essa variação foi associada à formação de agregados, conforme os resultados do DLS. Podemos notar que à medida que a proporção aumenta, as amostras demonstram maior uniformidade e estabilidade, resultando em um menor deslocamento da banda.

No entanto, na transição de 800:1 para 1000:1 essa tendência é quebrada, e a variação do comprimento de onda é maior. A hipótese formulada para esta situação considera o efeito do pH, pois em meios mais ácidos - como água deionizada, que possui pH ~5,7 - pode ocorrer a protonação parcial das sequências, a qual afeta diretamente sua conformação e interação com outras fitas adjacentes na monocamada formada na superfície da nanopartícula (23). Assim, apesar da repulsão eletrostática se mostrar predominante, como foi evidenciado nas proporções 400:1 a 700:1, há possibilidade desse segundo fenômeno emergir como um mecanismo competitivo quando ocorre o aumento do número de DNAs, afetando a estabilidade do nanomaterial. A fim de verificar essa possibilidade, foi avaliado o deslocamento da banda para AuNPs ressuspensas em PBS, o qual mantém o DNA desprotonado devido ao pH mais elevado.

A Figura 8a mostra que a ressuspensão em tampão indica ter favorecido a estabilidade das AuNPs, pois CP e RP apresentaram deslocamento menor da banda de SPR em PBS, reforçando a hipótese anterior. Na Figura 8b, este resultado é comparado à melhor proporção encontrada anteriormente (700:1), e vemos que a variação é semelhante.

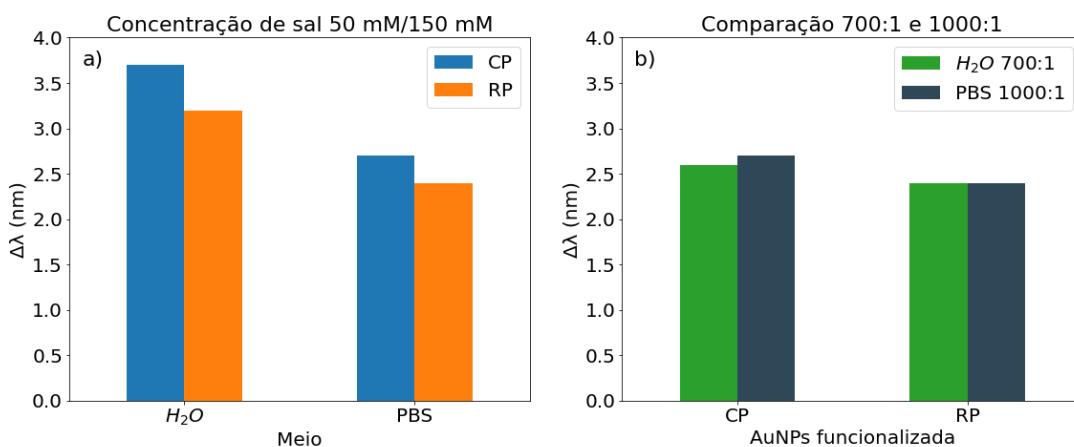


Figura 8 - a) AuNPs funcionalizadas na proporção 1000:1 e concentração de sal 50 mM/150 mM ressuspensas em água ou PBS b) Comparação entre as amostras de AuNPs funcionalizadas a 700:1 ressuspensas em água e amostras funcionalizadas a 1000:1 ressuspensas em PBS.

Fonte: Elaborada pela autora.

Portanto, de acordo com os resultados anteriores, foi estabelecido que **a proporção 1000:1 em PBS, apresenta a condição mais favorável para a estabilidade das AuNPs.**

Após a otimização da funcionalização, as condições previamente definidas foram testadas na etapa de detecção. Mantendo a proporção 1000:1 e o meio PBS, foi variada a concentração de sal (50 mM/100 mM) da etapa de funcionalização e de TP/NC (0,5 μ M e 2 μ M). Podemos observar na Figura 9 que os dois sistemas apresentaram grandes diferenças: o sistema a 50 mM/100 mM apresentou alta variabilidade, apontando a instabilidade das AuNPs (controle com variação positiva, demonstrando agregação das AuNPs), além do deslocamento de TP, assim como de NC, negativos. Já para o sistema a 50 mM/150 mM ocorreu a detecção de Dengue, em que foi obtido um deslocamento positivo para TP e negativo para NC e PBS, mostrando maior sensibilidade e especificidade ao DNA alvo.

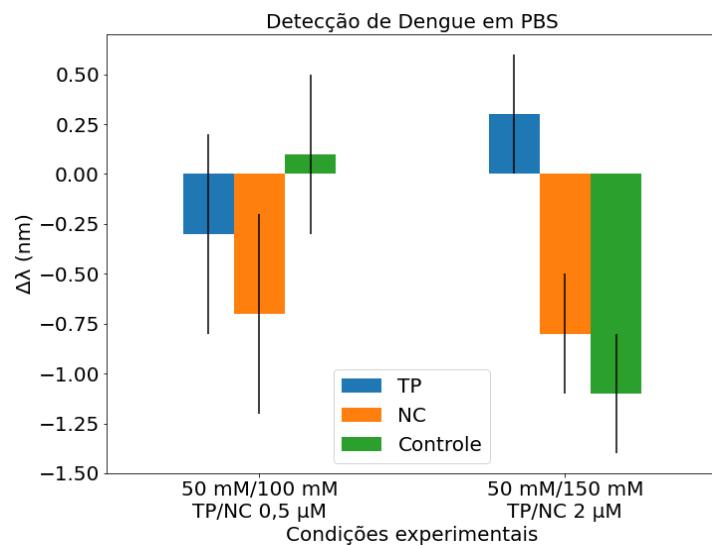


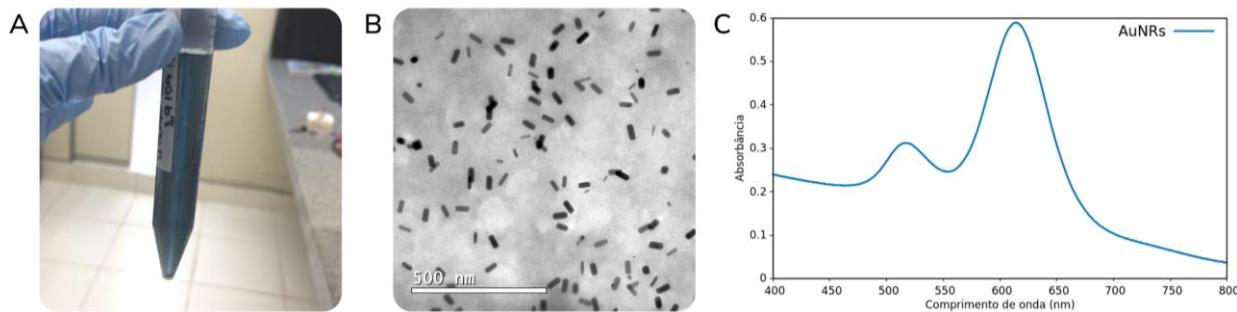
Figura 9 - AuNPs funcionalizadas à concentração de sal a a) 50 mM/150 mM e detecção a 0,5 μ M e b) 50 mM/150 mM e detecção a 2 μ M.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Otimização do sistema com AuNRs e detecção de Zika

Os AuNRs sintetizados são mostrados na Figura 10A. A partir da caracterização por TEM (Figura 10B), observou-se a morfologia típica de AuNRs. Foram calculadas as dimensões dos eixos longitudinal e transversal para obtenção da razão de aspecto a partir de 15 medidas para cada eixo em diferentes AuNRs. Assim, o diâmetro maior calculado foi de 51 ± 4 nm e o menor 22 ± 4 nm, resultando em uma razão de aspecto (AR) de $2,3 \pm 0,6$. De acordo com a banda longitudinal obtida, a AR encontra-se entre 2,0-2,5 (24), correspondendo ao valor calculado anteriormente.

Por meio da espectroscopia UV-Vis foram obtidas as bandas de SPR transversal e longitudinal dos AuNRs e foi determinada sua razão de aspecto pelos modelos estabelecidos por Near et al. (24) para posterior comparação com os resultados de TEM. Através da Figura 10C foram encontradas as bandas transversal em 517,5 nm e longitudinal em 614 nm, condizentes com resultados da literatura, em que AuNRs são caracterizados por possuírem uma banda transversal típica próxima a 520 nm e uma longitudinal entre 570 e 700 nm (25), que varia com a razão de aspecto (AR). O potencial zeta médio obtido foi de -49 ± 2 mV, indicando



a alta estabilidade dos AuNRs.

Figura 10 - A) AuNRs sintetizados. B) Caracterização dos AuNRs por TEM. C) Espectro UV-Vis AuNRs.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para a etapa de funcionalização foram testados AuNRs com dois revestimentos diferentes, CTAB (carregado positivamente) e citrato (carregado negativamente), a fim de verificar se a carga superficial poderia alterar a estabilidade dos AuNRs após a adsorção das moléculas de DNA. No mesmo experimento também foi examinada a estabilidade dos AuNRs com o aumento da concentração de sal (uma vez que são mais estáveis que AuNPs), utilizando como teste as seguintes combinações para primeira e segunda adição de sal, respectivamente: 50 mM e 150 mM; 75 mM e 225 mM. A Figura 11A e a Figura 11B mostram as amostras antes e depois da etapa de funcionalização, respectivamente. Como podemos observar, nas amostras revestidas com CTAB, não ocorreu agregação do controle, mas sim das amostras funcionalizadas. Esse comportamento pode ter sido decorrente da desestabilização superficial de cargas dos AuNRs, onde a repulsão eletrostática entre os mesmos diminui devido a adsorção do DNA (carregado negativamente), resultando na agregação das partículas. Os espectros coletados antes e após a funcionalização dos AuNRs com CTAB são mostrados na Figura 11C. Como pode ser observado nas curvas vermelha e azul escuro, após a funcionalização com as sequências de DNA, os AuNRs perderam suas bandas características, indicando a agregação

deles. No entanto, nas amostras controles em que não foram adicionadas sequências de DNA, as bandas de SPR transversal e longitudinal se mantiveram no espectro.

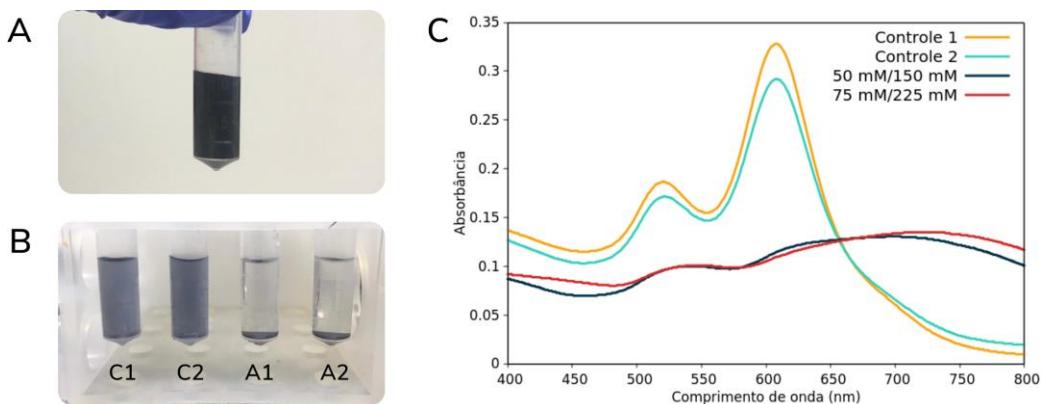


Figura 11 - A) Amostra inicial de AuNRs revestidos com CTAB. B) Após funcionalização, sendo a amostra C1 apenas com adição de sal a 50 mM/150 mM e C2 a 75 mM/225 mM, e A1 e A2 com DNA na proporção 800:1 e adição de sal 50mM/150mM e 75mM/225mM, respectivamente. C) Espectro UV-Vis de cada amostra após a funcionalização.

Fonte: Elaborada pela autora.

O mesmo teste foi realizado com AuNRs revestidos com citrato, a variação colorimétrica das amostras é apresentada nas Figura 12A e 12B. Diferentemente do resultado anterior, apenas as amostras controle agregaram, evidenciando que as concentrações de sal utilizadas foram suficientes para a obtenção de uma resposta colorimétrica que indica que a funcionalização ocorreu. O êxito desta bioconjugação em relação a anterior pode ser explicado com base na manutenção da repulsão eletrostática durante a funcionalização, uma vez que as moléculas de DNA e citrato são ambas carregadas negativamente, de maneira que após a etapa de funcionalização, os AuNRs não perdem a estabilidade. Os espectros de absorbância das amostras são mostrados na Figura 12C.

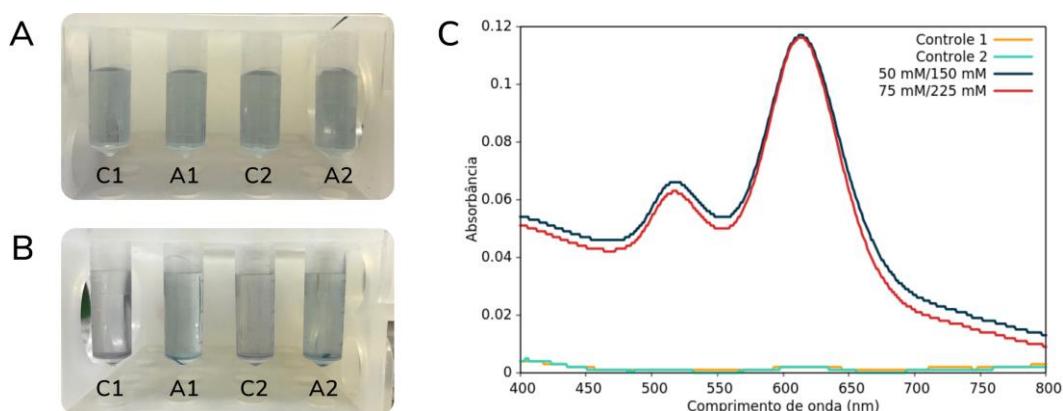


Figura 12 - A) Amostra inicial de AuNRs revestidos com citrato, sendo a amostra C1 apenas com adição de sal a 50 mM/150 mM e C2 a 75 mM/225 mM, e A1 e A2 com DNA na proporção 800:1 e adição de sal 50mM/150mM e 75mM/225 mM, respectivamente. B) Após a funcionalização. C) Espectro UV-Vis de cada amostra após a funcionalização.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar as diferenças causadas pelas duas concentrações de sal, foi analisado o deslocamento das bandas de SPR e o Potencial Zeta, os resultados são apresentados na Tabela 3:

Tabela 3 - Posição das bandas de SPR (longitudinal e transversal) antes e após a funcionalização.

Amostra	Antes (nm)	Depois (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Potencial Zeta (mV)
50 mM/ 150 mM	617	614,0	-3,0	-47 ± 1
	518,5	518,0	-0,5	
75 mM/ 225 mM	617	613,0	-4,0	$-39,5 \pm 0,9$
	518,5	517,0	-1,5	

Fonte: Elaborada pela autora.

A princípio, o maior deslocamento foi relacionado à maior eficiência na bioconjugação, uma vez que a banda de SPR pode se deslocar pela mudança da constante dielétrica próxima a superfície - a qual seria causada pela substituição do citrato pelo DNA. No entanto, experimentos posteriores com AuNPs sugeriram que uma alta variação do deslocamento da banda estaria sendo promovida pela agregação parcial das AuNPs. O Potencial Zeta mostra que a amostra com menor concentração de sal está carregada mais negativamente, que pode indicar que a densidade de sequências em sua superfície é maior. A proporção DNA:AuNRs de funcionalização também foi avaliada, sendo testadas 600:1 (exceto RP), 800:1 e 2400:1. A Figura 13 mostra o deslocamento da banda de SPR antes e depois da funcionalização, onde foi observado que ao aumentar a proporção, menor foi o deslocamento da banda - que em analogia as AuNPs, indica maior estabilidade.

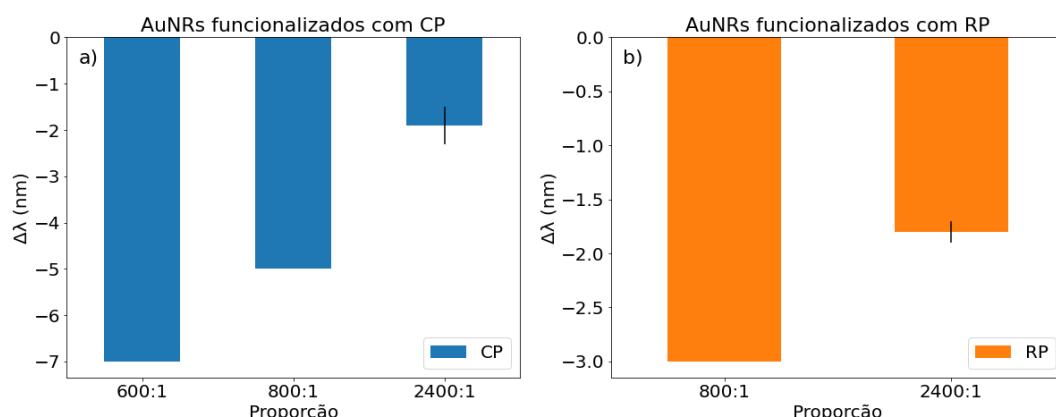


Figura 13 - Deslocamento da banda SPR em cada teste de proporção para AuNRs funcionalizados com a) CP e b) RP.

Fonte: Elaborada pela autora.

Assim, os resultados mostram que as **condições mais favoráveis à estabilidade dos AuNRs são: revestimento de citrato, proporção de funcionalização 2400:1 e concentração de sal 50 mM/150 mM**, as quais foram escolhidas para os experimentos de detecção.

Utilizando as condições experimentais determinadas anteriormente, foi feito o teste de detecção com a concentração de TP/NC a 0,5 μM . A Figura 14 mostra uma maior variação para a sequência alvo, indicando sensibilidade do sistema ao TP. Porém, há intersecção entre os desvios de TP e NC e um alto erro associado, o que diminui a especificidade do sensor, uma vez que possibilita resultados falso-positivos ou falso-negativos. Novas otimizações são necessárias para aumentar a reproduzibilidade e seletividade desse sistema. Ainda assim, o resultado é promissor e mostra a capacidade dos AuNRs funcionalizados de reconhecer as sequências alvo.

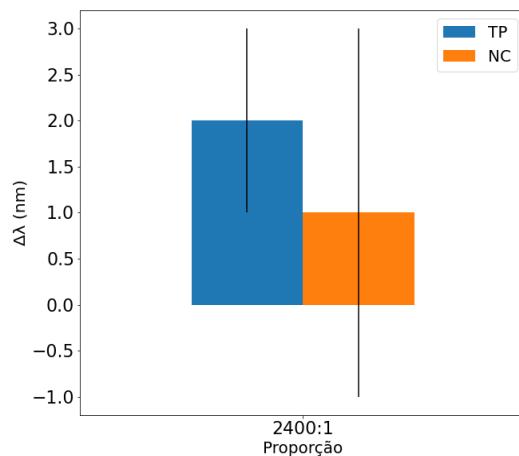


Figura 14 - Deslocamento da banda de SPR para AuNRs funcionalizados a 2400:1 e concentração de TP/NC a 0,5 μM .

Fonte: Elaborada pela autora.

3.3 Sistema híbrido de nanomateriais

Como a otimização para cada detecção ocorre individualmente, foi realizado um teste prévio com AuNPs e AuNRs não funcionalizados para verificação do espectro do sistema híbrido. Uma amostra de cada solução estoque (AuNPs e AuNRs) foi diluída 2x e, em seguida, misturadas na proporção 1:1 (Figura 15A). Foram coletados os espectros de UV-Vis, mostrados na Figura 15B. Podemos observar que o espectro resultante (roxo) abaixo conservou ambas as bandas dos AuNRs e das AuNPs, apenas incrementando a equivalente ao eixo transversal devido a correspondência entre as mesmas nas AuNPs e AuNRs. Assim, verificamos que é

possível estabelecer um sistema híbrido estável, o qual manteve as bandas plasmônicas, que são a base principal deste método de detecção.

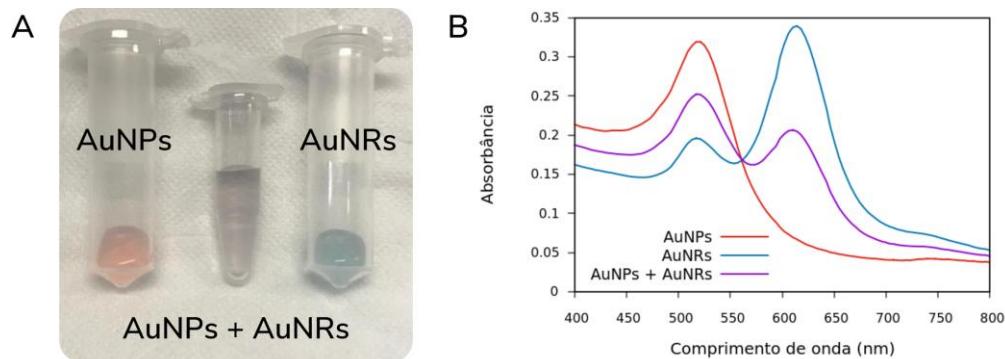


Figura 15 - A) Da esquerda para a direita: AuNPs, mistura de AuNPs e AuNRs, e AuNRs. B) Espectro UV-Vis de cada amostra, em vermelho das AuNPs, azul AuNRs e roxo da mistura dos nanomateriais.
Fonte: Elaborada pela autora.

4 CONCLUSÃO

Os experimentos de otimização das AuNPs mostraram que há influência da proporção de DNA:AuNPs, do pH e da concentração de sal nas etapas de funcionalização e detecção. As melhores condições encontradas foram na proporção 1000:1, em PBS e na concentração de sal a 50 mM/150 mM, as quais também favoreceram a detecção de Dengue, demonstrando sensibilidade e especificidade ao TP a 2 µM. Quanto aos AuNRs, revestimento, proporção DNA:AuNRs e concentração foram testados. Para a funcionalização, o melhor revestimento foi o citrato, na proporção 2400:1 e concentração de sal a 50 mM/150 mM. Utilizando essas condições, o sistema biossensor mostrou uma variação média do comprimento de onda maior para o TP a 0,5 µM em comparação com a resposta para o NC na mesma concentração. No entanto, devido ao alto erro associado, ainda é necessário otimizar sua especificidade. O sistema híbrido também foi estudado a fim de verificar a compatibilidade entre os nanomateriais, sendo obtido um espectro UV-Vis que mostrou a conservação das bandas plasmônicas: a transversal correspondente as AuNPs e a longitudinal dos AuNRs - indicando a formação de um sistema estável e funcional para o biossensor, em que são mantidas as propriedades individuais de cada nanomaterial.

Assim, ambos os sistemas nanoestruturados demonstraram grande potencial de diagnóstico, pois foram capazes de detectar suas respectivas sequências alvo. Os próximos passos envolvem a otimização da etapa de detecção, a fim de melhorar sensibilidade e especificidade do dispositivo, além da análise estatística com maior número de réplicas e cálculo do p-valor. Após as otimizações individuais, será avaliado o funcionamento do sistema híbrido e seu desempenho com amostras reais.

REFERÊNCIAS

- 1 CGARB/DEIDT/SVS. **Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes Aegypti (dengue, chikungunya e zika)**. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2020/outubro/23/boletim_epidemiologico_svs_41.pdf. Acesso em: 23 nov. 2020.
- 2 COLLINS, M. H.; WAGGONER, J. J. Detecting vertical Zika transmission: emerging diagnostic approaches for an emerged *Flavivirus*. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 7, p. 1055–1069, 12 July 2019.
- 3 DAI, Q. *et al.* A one-step highly sensitive method for DNA detection using dynamic light scattering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 26, p. 8138–8139, 2 July 2008.
- 4 DE SOUZA, C. D.; NOGUEIRA, B. R.; ROSTELATO, M. E. C. M. Review of the methodologies used in the synthesis gold nanoparticles by chemical reduction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 798, p. 714–740, 25 ago. 2019.
- 5 FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTO, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 131, p. 149–155, 15 April. 2019.
- 6 GUO, H. *et al.* Correlating the shape, surface plasmon resonance, and surface-enhanced raman scattering of gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 24, p. 10459–10464, 18 June 2009.
- 7 HOOVER, B. M.; MURPHY, R. M. Evaluation of nanoparticle tracking analysis for the detection of rod-shaped particles and protein aggregates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 1, p. 452–463, Jan. 2020.
- 8 HUANG, X.; EL-SAYED, M. A. Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. **Journal of Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 13–28, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>. Acesso em: 23 nov. 2020.
- 9 LIU, B.; LIU, J. Methods for preparing DNA-functionalized gold nanoparticles, a key reagent of bioanalytical chemistry. **Analytical Methods**, v. 9, n. 18, p. 2633–2643, 2017.
- 10 LORENZ, C.; AZEVEDO, T. S.; CHIARAVALLOTTI-NETO, F. COVID-19 and dengue fever: A dangerous combination for the health system in Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 35, p. 101659, 2020. PMID: 32278756.
- 11 MARANGONI, V. S. **Theranostic nanomaterials applied to the cancer diagnostic and therapy and nanotoxicity studies**, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.11606/t.76.2016.tde-21102016-155818>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- 12 METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271–283, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.029>. Acesso em: 18 nov. 2020.
- 13 MALHOTRA, B. D.; ALI, M. A. **Nanomaterials in biosensors:** fundamentals and applications. [s.l.] William Andrew Publishing, 2018. cap. 1, p. 1–74.
- 14 NEAR, R. D. *et al.* Rapid and efficient prediction of optical extinction coefficients for gold nanospheres and gold nanorods. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 45, p. 23950–23955, 14 Nov. 2013.
- 15 NIKOBAKHT, B.; EL-SAYED, M. A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. **Chemistry of Materials**, v. 15, n. 10, p. 1957–1962, May 2003.
- 16 PRIYAMVADA, L. *et al.* Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 28, p. 7852–7857, 12 July 2016.
- 17 RAJAH, M. M. *et al.* Zika Virus: emergence, phylogenetics, challenges, and opportunities. **ACS Infectious Diseases**, v. 2, n. 11, p. 763–772, 11 Nov. 2016.

- 18 SHIN, J.; ZHANG, X.; LIU, J. DNA-functionalized gold nanoparticles in macromolecularly crowded polymer solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 45, p. 13396–13402, 15 Nov. 2012.
- 19 SHNOUDEH, A. J. *et al.* Synthesis, characterization, and applications of metal nanoparticles. In: bionanotechnology. **Biomaterials and Bionanotechnology**. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 527–612.
- 20 SHAJARI, D. *et al.* Synthesis and tuning of gold nanorods with surface plasmon resonance. **Optical Materials**, v. 64, p. 376–383, 1 Feb. 2017.
- 21 TANG, L.; LI, J. Plasmon-based colorimetric nanosensors for ultrasensitive molecular diagnostics. **ACS Sensors**, v. 2, n. 7, p. 857–875, 28 July 2017.
- 22 VERSIANI, A. F. *et al.* Nanosensors based on LSPR are able to serologically differentiate dengue from Zika infections. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 9 July 2020.
- 23 WANG, W. *et al.* Zeta-potential data reliability of gold nanoparticle biomolecular conjugates and its application in sensitive quantification of surface absorbed protein. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v. 148, p. 541–548, 1 Dez. 2016.
- 24 YANG, X. *et al.* Gold nanomaterials at work in biomedicine. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10410–10488, 14 Oct. 2015.
- 25 ZHANG, J. *et al.* Optimization of DNA hybridization efficiency by pH-driven nanomechanical bending. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 28, n. 15, p. 6494–6501, 17 April 2012.