



I SEVEN  
CONGRESS OF HEALTH

## **Estudo da interação da fucosidase humana com anticorpo monoclonal por técnicas eletroquímicas**

### **Study of the interaction of human fucosidase with monoclonal antibody by electrochemical techniques**

**Jhenifer Bueno Correia da Rosa**  
**Dhésmon de Lima**  
**Karen Wohnrath**  
**Christiana A. Pessôa**  
**Juliana Inaba**

#### **1 INTRODUÇÃO**

A fucosidose é uma doença neurodegenerativa progressiva, caracterizada por mutações no gene *FUCA1*, resultando numa deficiência na codificação da enzima  $\alpha$ -L-fucosidase (GENETICS HOME REFERENCE, 2008). Essa deficiência reduz e/ou inativa a enzima, impossibilitando esta de hidrolisar macromoléculas ligadas a L-fucose nos lisossomas, gerando seu acúmulo nas células, promovendo uma série de lesões celulares, deterioração neurológica progressiva entre outras manifestações clínicas (ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE DOENÇAS DO LISSOSOMA; GENETICS HOME REFERENCE, 2008).

O diagnóstico da fucosidose, atualmente, não é acessível, apresentando apenas 104 laboratórios no mundo que realizam o teste de diagnóstico, sendo 4 deles no continente norte-americano, e nenhum na América Latina (ORPHA.NET). Os testes para diagnóstico são baseados em exames clínicos, sequenciamento Sanger, exoma completo e PCR, os quais podem ser inconclusivos ou possuem um alto custo. Esses fatos, afetam o tratamento e a qualidade de vida do paciente (MORAES, 2019).

Neste sentido, este projeto busca desenvolver um novo método de diagnóstico rápido, de baixo custo e fácil execução para a detecção direta da alfa-L-fucosidase. Os imunossensores eletroquímicos apresentam uma ótima alternativa para a detecção de analitos, já que esses dispositivos são quantitativos, com uma alta sensibilidade e com respostas mensuráveis de forma eficaz e rápida (MORAES, 2019). Os imunossensores são sistemas que empregam o bioreconhecimento baseado na interação específica de anticorpos/antígenos tendo uma dessas biomoléculas acoplado a superfície de



transdutores eletroquímicos. Essa porção é a responsável pela seletividade do biossensor, a interação e reconhecimento molecular transmite sinais analiticamente mensuráveis (GRAÇA; FERREIRA, 2015).

## 2 OBJETIVOS

**Objetivo Geral:** desenvolver uma plataforma viável em elétrodos de carbono vítreo para a detecção eletroquímica da proteína FUCA1;

### Objetivos específicos:

- Construir um eletrodo de carbono vítreo por automontagem (*Self assembled monolayers-SAM*) oxidado para ligação de anticorpo monoclonal anti-fucosidase.
- Caracterizar os sensores obtidos por técnicas espectroscópicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 LIMPEZA E MODIFICAÇÃO DOS ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO (ECV)

O eletrodo de carbono vítreo (ECv) foi inicialmente polido de forma mecânica em suspensão de alumina 0,3 $\mu$ m, seguido por um banho de ultrassom em álcool etílico por 5 minutos. Nanopartículas de ouro (AuNPs) foram depositadas sobre a superfície do eletrodo, utilizando eletrodeposição. O eletrodo foi imerso em uma solução de ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) a 10mmol.L<sup>-1</sup>, no qual foi aplicado a técnica de cronoamperometria, submetendo o sistema a um potencial constante de +0,3V durante 700s. O eletrodo modificado (ECv/AuNPs) foi lavado com água destilada, e sua superfície foi incubada por 2 horas uma solução de cystamina (Cys) a 50mmol.L<sup>-1</sup>, para a formação da SAM.

### 3.2 MEDIDAS ELETROQUIMICAS

O ECv/AuNPs/Cys foi caracterizado por meio de medidas de voltmetria de onda quadrada (VOQ) e de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Foi empregado um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência, um eletrodo de platina como eletrodo auxiliar e o eletrodo modificado como o eletrodo de trabalho. Esses eletrodos

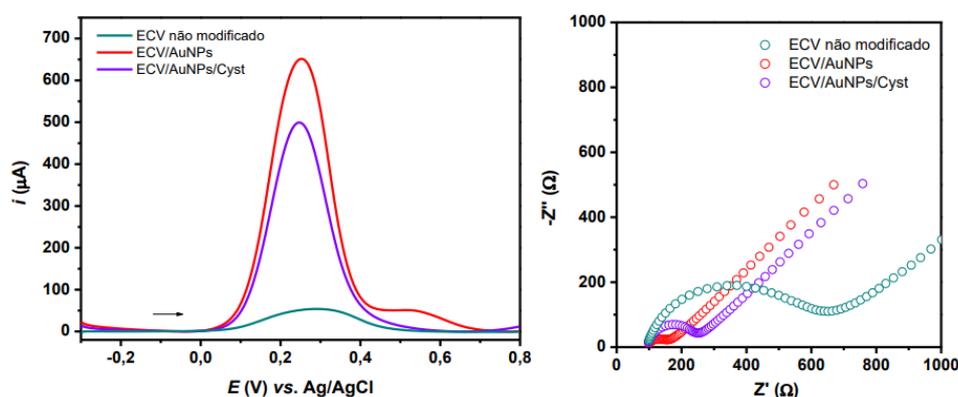


foram imersos em uma célula eletroquímica contendo uma solução tampão PBS 0,15 mol. L<sup>-1</sup>, a qual é o eletrólito suporte, na presença de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], conectados em um multipotenciostato Metrohm Autolab M204. Para as medidas de VOQ os parâmetros utilizados foram: amplitude de potencial = 2 mV; incremento de potencial = 2 mV; frequência dos pulsos de potencial = 40 Hz). Para as medidas de EIE, foram empregados os seguintes parâmetros: amplitude de potencial = 10 mV; potencial aplicado = 0,24 V; intervalo de frequências = 10 kHz-100 mHz)

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na figura 1, estão apresentados os voltamogramas de onda quadrada (figura 1A) e o diagramas de Nyquist (figura 1B), obtidos por EIE, obtidos em cada etapa de modificação do eletrodo. É observado a presença de um pico de oxidação por volta de +0,25V, o que corresponde ao pico de oxidação dos íons [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup> a [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>3-</sup>. Os diagramas de Nyquist apresentaram um semicírculo na região de baixas frequências, referente ao processo de transferência de carga para a reação redox da sonda eletroquímica, e um segmento linear na região de frequências mais altas, referente ao processo de difusão dos íons em solução.

Figura 1: (A) Voltogramas de onda quadrada obtidos a cada etapa de modificação do ECV (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol.L<sup>-1</sup> na presença de 5 mmol.L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]. (B) Diagramas de Nyquist obtidos a cada etapa de modificação dos ECV (eletrólito suporte: tampão PBS 0,15 mol.L<sup>-1</sup> na presença de 5 mmol.L<sup>-1</sup> de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]/K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]



É verificado que a modificação do eletrodo de carbono vítreo com as nanopartículas de ouro ocasionaram um aumento na intensidade de corrente e uma redução na resistência a transferência de carga para o processo redox dos íons [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>4-</sup>



I SEVEN  
CONGRESS OF HEALTH

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ , já que os nanomateriais possuem essas propriedades, como elevada condutividade elétrica e alta área superficial específica. Desse modo conclui-se que a eletrodeposição de AuNPs, maximiza a área eletroativa do dispositivo, assim como, aumento de sua condutividade.

Portanto, houve um decréscimo na intensidade de corrente e um aumento na resistência após a formação da SAM sobre o ECv/AuNPs. Pois as moléculas de cystamina podem ligar-se covalentemente ao ouro metálico por meio da quebra da ligação dissulfeto, formando ligações ouro-enxofre, o que leva a uma monocamada compacta e organizada sobre o eletrodo. Deste modo, as monocamadas de cystamina funcionaliza a superfície eletrodica com grupos amino, o que auxiliará na imobilização dos anticorpos IgG anti-L-fucosidase, via ligação covalente amida com os grupos carboxílicos presentes na molécula IgG. A diminuição da intensidade de corrente e o aumento da resistência, resultam da formação da monocamada de cystamina, a qual, dificulta o processo de transferência de elétrons pois bloqueia parcialmente o acesso dos íons a superfície eletrodica.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos foram promissores em relação a modificação dos eletrodos. As nanopartículas de ouro auxiliaram no aumento da condutividade elétrica e maximizaram a área eletroativa do eletrodo, enquanto a incorporação da monocamada de cystamina, auxiliará na imobilização correta e estável dos anticorpos para a detecção da enzima  $\alpha$ -fucosidase.

## AGRADECIMENTOS

Universidade Estadual de Ponta Grossa, GDEM, Collaborations Pharmaceuticals, Inc.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE DOENÇAS DO LISSOSOMA. Fucosidose. Disponível em: <<https://aplisosoma.org/doencas/fucosidose/>>. Acesso em: 05 mar 2022.

GENETICS HOME REFERENCE. Fucosidose. 2008. Disponível em: <<https://medlineplus.gov/genetics/condition/fucosidosis/#references>>. Acesso em: 05 mar 2022.



I SEVEN  
CONGRESS OF HEALTH

GRAÇA, Juliana S.; FERREIRA, Marystela. Liposome-Encapsulated Biomolecules: application in enzymatic biosensors and immunosensors. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 4, p. 1552-1564, 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

MORAES, Maria Oneide Silva de. Desenvolvimento e caracterização de imunossensor eletroquímico para detecção de câncer de tireoide diferenciado. 2019. 114 f. Tese (Doutorado de Química) Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

ORPHA.NET. Fucosidose. Disponível em:  
[https://www.orpha.net/consor/cgibin/OC\\_Exp.php?Expert=349&lng=PT](https://www.orpha.net/consor/cgibin/OC_Exp.php?Expert=349&lng=PT). Acesso em: 05 mar 2022.