



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE
ANTÍGENO DE *Trypanosoma cruzi* EM SUPORTE DE OURO**

JANAÍNA DE SOUZA DUARTE

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Orientadora Externa: Prof^ª. Dr.^ª Rosa Amália Fiemam Dutra

Recife, 2003



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA**

JANAÍNA DE SOUZA DUARTE

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE
ANTÍGENO DE *Trypanosoma cruzi* EM SUPORTE DE OURO**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Bioquímica pela Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovado por: _____

Data ____/____/____

Tudo tem seu tempo e até certas manifestações mais vigorosas e originais entram em voga ou saem de moda. Mas a sabedoria tem uma vantagem: é eterna.

Baltasar Gracián.

Dedico este trabalho à minha família, que me faz lembrar, todos os dias, como é importante acreditar na vitória.

Ao Samuel, com quem compartilhei todos os sentimentos de amor, carinho, saudade, ansiedade, aflição, alegria, satisfação e conquista durante o mestrado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua benevolência e presença constante do seu amor em minha vida. Por me fazer forte nos momentos em que senti a fraqueza de ser humana e principalmente por me conceder saúde, fé e esperança. Pela oportunidade de estar em Recife e ter vivido grandes experiências.

À minha família, que mesmo distante, sempre se fez presente: mamãe e papai; meus irmãos, Jonathas, Jaqueline, Carolina e Camila; meus sobrinhos, Douglas e Giovanna; meus cunhados, Adriana e Redner. Vocês sabem como são importantes para mim e que palavras são insuficientes para expressar a minha gratidão e alegria neste momento.

Ao Samuel, pelo companheirismo, apoio, incentivo, amor e carinho de sempre. E à toda sua família, Srs. Fernando e Dalvinha, Ana, Hilda, Léa e Vovó Inalda pela compreensão, paciência, acolhida, cuidado e amizade.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pela orientação, oportunidade, confiança, amizade, pelo exemplo de profissionalismo e principalmente pelo seu “arsenal” de idéias para inovar sempre.

À Prof.^a Dr.^a Rosa Amália Fireman Dutra, pela orientação, dedicação, confiança, paciência, especialmente pela amizade. Pela compreensão durante meus primeiros passos na vida científica.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, pela atenção, disposição para ajudar sempre, pelas dúvidas solucionadas, por suas aulas inesquecíveis e pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

À Prof.^a Dr.^a Maria da Paz Carvalho da Silva, pelo carinho, apoio, amizade, pela acolhida desde o curso de extensão, pelos conselhos e dicas de saúde.

Aos professores do Mestrado, não só pelas “lições bioquímicas” mas também pelas lições de vida que tanto contribuem para o nosso crescimento pessoal.

A Prof.^a Dr.^a Yara Gomes e Valéria Pereira, pesquisadoras do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela colaboração, apoio técnico e amizade.

A todos os amigos do Mestrado: César, Flávia, Graça, Heberty, Kid, Nadejda, Sérgio, Sílvia e Val. Por todos os momentos de aflição, expectativa, alegria e descontração que dividimos... Que saudade!

Aos colegas do Laboratório de Biossensores, pelo respeito, apoio técnico, carinho, incentivo, auxílio e amizade, e de forma especial à Cássia, Dani, Fabrícia, Neide, André e Jorge.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Keila Moreira, Alessandro Albertini, Alexandre Libânio, Danielly Brunaska e Eduardo Alécio por me “socorrerem” na hora de usar alguns equipamentos, pela convivência saudável e afetuosa.

A todos os colegas da Bioquímica e do LIKA, Andréia, Elba, Givanildo, Roberto, Marson, Edilson, Carol, Conceição, Roberta, Sandriana e Sandra Pinheiro pelas palavras de incentivo e força nos momentos de desânimo e tristeza.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, em especial a Djalma e Miron pela presteza e cuidado com os nossos pedidos. À Neide, pelo carinho e atenção dedicados a mim com tanta sinceridade.

Aos funcionários do LIKA pela apoio técnico e contribuição para o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

A todos os que torceram por mim e acreditaram na minha vitória, que mesmo não mencionados aqui, mas que sem dúvida ajudaram-me nesta caminhada.

A todos que me acolheram em Recife e em suas casas. Em especial, à Raquel e André, meus pais adotivos, pelo cuidado, carinho, incentivo e “reguladas” quando necessárias.

Aos meus queridos amigos de Goiânia, Fabiana, Euler, Lílian, Juliana, Patrícia e Júnior, pelas lembranças inestimáveis e convivência maravilhosa.

À Fundação Biomanguinhos-FIOCRUZ/RJ, na pessoa de Edmilson, pelo “pronto-atendimento” e fornecimento de antígeno e soro, materiais essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante a segunda metade do curso.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Formas tripomastigotas em esfregaço sangüíneo.	14
Figura 2. Teste de IFI.	14
Figura 3. Diagrama esquemático de imunoensaio em suporte de ouro.	16
Figura 4. Esquema de um imunossensor típico.	17
Figura 5. Esquema representativo dos métodos de imobilização: (a) adsorção física, (b) microencapsulamento, (c) “ <i>entrapment</i> ”, (d) ligação covalente, (e) “ <i>cross-link</i> ”, (f) associação dos métodos “ <i>entrapment+cross-link</i> ”	20

Lista de Figuras do Artigo

Figure 1. Results of polyacrylamide gel eletrophorese according to Standard of Molecular Weight (MWP). The recombinant CRA~FRA antigen is observed in the last column in relation to MWP.	35
Figure 2. Curve of controls sera Optical Density (490 nm) versus antigen concentration Optical Density (490 nm).	38

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Diferentes tipos de imobilização em ouro para o desenvolvimento de imunossensores.	21

Lista de Tabelas do Artigo

Table 1: Results of Fold Increased (FI) in OD ₄₉₀ from three immobilization methods.	39
Table 2: Coefficient of variation (CV) obtained from Fold Increased (FI) at replicates of three immobilization methods.	39

RESUMO

Antígenos recombinantes de *Trypanosoma cruzi* (CRA~FRA) fornecidos pela Fundação Biomanguinhos-Rio de Janeiro, Brasil, foram ligados a suportes de ouro usando três métodos de imobilização: adsorção física, via polietilenoimina e via polietilenoimina associada ao glutaraldeído, como agente bi-funcional. Este último método apresentou resultados com aumento nos valores de sensibilidade, medida pelo ratio do positivo e negativo em densidade óptica do 490 nm (“*Fold Increased*”). A concentração ótima do antígeno foi estabelecida e determinada com 1,0 µg/mL em 100 µL para a área de 9 mm² do suporte de ouro. Uma comparação entre este procedimento e o teste ELISA-Biomanguinhos foi descrita. Assim, foi obtido um método confiável de imobilização de antígeno de *Trypanosoma cruzi* em suporte de ouro, abrindo novas perspectivas para o desenvolvimento de biossensores.

ABSTRACT

The recombinant *Trypanosoma cruzi* antigen (CRA~FRA) supplied by Fundação Biomanguinhos - Rio de Janeiro, Brazil, was attached to gold support using three immobilization methods, such as: physical adsorption, via polyethylenimine and via polyethylenimine plus glutaraldehyde as bi-functional agent. This last method showed best results with increased values of sensitivity measured by Fold Increased (positive and negative OD₄₉₀ ration). The optimal antigen concentration was established and it was found that the amount of antigen such as 100 µL at 1.0 µg/mL for 9 mm² gold support area was required. A comparison between this procedure and the ELISA Biomanguinhos-protocol was described. A reliable method of immobilization *T. cruzi* antigen on gold support was achieved which open new perspectives for the biosensors development.

Keywords: methods, immobilization, *T. cruzi* antigen, gold support.

ÍNDICE

	Página
Dedicatória	04
Agradecimentos	05
Lista de Figuras	07
Lista de Tabelas	08
Resumo	09
Abstract	10
I. Introdução	12
1. Diagnóstico Laboratorial	13
1.2. Métodos Parasitológicos	13
1.3. Métodos Sorológicos	14
2. Imunoensaios	15
2.1. Utilização de ouro como suporte	17
3. Imobilização do Componente Biologicamente Ativo	18
4. Antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
II. Objetivos	24
Geral	24
Específicos	24
III. Referências Bibliográficas	25
IV. Artigo	31
V. Conclusões	44
VI. Adendo	45