

Este exemplar  
conceprade a redacção  
final de tese defendida  
por Leite Lopes e aprovada pela  
Comissão Julgadora em 3-07-86.

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE  
IMUNOSORVENTES E AVALIAÇÃO DE DESEM  
PENHO EM ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

57 final

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE CAMPINAS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE IMUNOSORVENTES  
E AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO EM ENSAIOS IMUNOENZIMÁTICOS

Autor : Leila Peres  
Orientador : Edison Bittencourt

Tese submetida à Comissão de  
Pós-graduação da Faculdade de  
Engenharia de Campinas - UNICAMP,  
como parte dos requisitos necessá  
rios para obtenção do grau de  
MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

Campinas - SP - Brasil

Julho de 1986

A G R A D E C I M E N T O S

Ao Prof. Dr. Edison Bittencourt, pela orientação sempre competente, prestada durante toda a realização deste trabalho;

Aos Profs. Drs. Mário E. Camargo, Antonio W. Ferreira e Celso Granato, pela orientação e coordenação dos experimentos realizados na área de Imunologia;

Aos corpos técnicos e administrativos do Centro de Tecnologia da Indústria Química e Têxtil, CETIQT, do SENAI, Rio de Janeiro, e do Centro Têxtil do IPT, São Paulo, onde foram preparados os Suportes-Resina;

Aos corpos técnicos e administrativos dos setores de Imunologia e Medicina Nuclear, do Instituto de Medicina Tropical, IMT, da USP e do Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas Gastão Fleury, S.C. Ltda, onde foram realizados os imunoenaios e a produção dos reagentes sorológicos. Agradeço especialmente a Marisa M. Makino, Márcia B. de Carvalho, Cristina G. Franco, Sônia Nishida e Antonieta Rocca;

Ao Dr. Markus Michael, que realizou o estudo do desempenho do imunosorvente desenvolvido, em Teste ELISA para a Doença de Chagas, incluindo a interpretação e tratamento estatístico dos dados;

A Maria Angélica C. Poletto e a Clóvis de Souza Jr., pelo grande auxílio prestado, em análises laboratoriais e preparação dos Suportes-Resina;

À Ashland Resinas Sintéticas Ltda, Inpal e Hoechst ,  
pelo fornecimento de amostras de resinas;

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela utilização  
de equipamentos e reagentes;

À Margarida Seixas Maia e à Odette Ropello pela cui-  
dadosa datilografia do trabalho;

Às amigas Lídia M. Maegava e Maria Teresa M. Rodri-  
gues, pela grande ajuda dada através de discussões, sugestões e  
estímulo;

De uma maneira muito especial, a José Luiz, pelo ca-  
rinho e incentivo;

Aos professores, alunos e funcionários do Departamen-  
to de Engenharia Química, e todas as demais pessoas que de al-  
gum modo, colaboraram para a execução deste trabalho.

A meus queridos pais, Pedro e Iria, e in memoriam ,  
a Leo Trochmann e a Peregrino de Oliveira Lino Jr., pelo amor  
e grande exemplo de vida que me transmitiram.

R E S U M O

Neste trabalho iniciou-se a caracterização de um novo tipo de suporte para imobilização de antígenos e anticorpos que foi descrito pela primeira vez por Bittencourt et al em 1983. Este suporte é constituído por tecidos sintéticos recobertos com resinas reticuláveis que apresentam grupos N-metilol capazes de reagir covalentemente com grupos funcionais característicos de proteínas, como grupos amino e hidroxila.

Imunosorventes preparados com antígenos de diversas patologias, como Doença de Chagas e Toxoplasmose (doenças parasitárias) e Rubéola (virose), mostraram excelente desempenho no diagnóstico sorológico, em testes imunoenzimáticos do tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Os estudos realizados, sugerem que a reação de imobilização é controlada pela área superficial disponível, associada à geometria da molécula. Os resultados indicam que a ligação da proteína se dá superficialmente sobre a resina, em uma primeira camada, por ligação covalente com grupos N-metilol, presentes em excesso, ou por adsorção química. Segue-se, então, a formação de multicamadas de proteína, ligadas por forças mais fracas. A Isoterma de Adsorção obtida para a imobilização do anticorpo humano, IgG, apresentou um formato sigmoidal, correspondente a modelos como o B.E.T., e outros, que assumem adsorção em multicamadas.

Para superfícies de poliestireno, que são atualmente os suportes mais utilizados na preparação de imunosorventes, para Testes ELISA, as isotermas obtidas foram consistentes com

a de Langmuir. O mesmo ocorreu para as isotermas de captação, do anticorpo humano IgG em solução, por imunosorventes preparados com Suporte-Resina e Anti-IgG imobilizado, demonstrando o caráter de adsorção em monocamada.

Variáveis relevantes na reação de imobilização, tais como: pH, concentração de eletrólitos, temperatura, tempo de reação e concentração da imunoproteína, foram estudadas para se estabelecer as condições de reação mais adequadas.

Um estudo sistemático do desempenho do imunosorvente desenvolvido, em Teste ELISA para Doença de Chagas, mostrou os mesmos níveis de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, obtidos com placas de poliestireno, com a vantagem de estabilidade superior.

A B S T R A C T

In this work the characterization of a new type of support for the immobilization of antigens and antibodies was initiated. This support that was firstly described by Bittencourt et al in 1983, consists of synthetic fabrics coated with crosslinked resins containing N-methylol groups able to form covalent bonds with functional groups such as hydroxyl and amino, which are characteristic of proteins.

Immunosorbents prepared with characteristic antigens of different pathologies, such as Chagas' Disease and Toxoplasmosis (parasitic diseases) and Rubella (viruse), presented excellent performance in sorologic diagnosis, when utilized in ELISA tests (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays).

The studies conducted suggest that the immobilization reaction, is controled by the surface area available, associated to the area occupied by the molecule. The results indicate, covalent bonding or chemical adsorption, of the immunoproteins with N-methylol groups, which are present in excess at the surface of the crosslinked resin. This first layer seems to be followed by multilayers sorbed by weaker forces. The Adsorption Isotherm obtained for the immobilization of human antibody, IgG, presented a sigmoidal form corresponding to models, such as B.E.T. and others, which assume the formation of multilayers.

With respect to polystyrene surfaces, which are presently the most utilized type of support in ELISA tests, the isotherms obtained were fitted by the Langmuir Model.

This same model was consistent, with the isotherms obtained from the capture of the human antibody IgG in solution, by Anti-IgG, previously immobilized on the supports, demonstrating monolayer adsorption.

Relevant variables for the immobilization reaction, such as: pH, temperature, time of reaction, and concentrations of immunoproteins and electrolytes were studied, with the objective of determining the most adequate reaction conditions.

A systematic study of the performance of the immunosorbent developed in this work, was conducted with ELISA tests for Chagas' Disease, showing the same levels of sensitivity, specificity and reproductibility of polystyrene plates, with the advantage of superior stability.

Í N D I C E G E R A L

	Página
CAPÍTULO 1 - Introdução	1
CAPÍTULO 2 - Revisão Teórica	8
2.1. Conceitos Básicos de Imunologia necessários para a compreensão das interações antígeno-anticorpo que ocorrem em Testes Sorológicos	9
2.1.1. A Relação entre a Configuração Espacial e as Propriedades das Moléculas de Proteína	9
2.1.2. As Características Estruturais dos Antígenos e suas Propriedades	15
2.1.3. As Características Estruturais dos Anticorpos e suas Propriedades	19
2.1.3.1. Estrutura Básica da Molécula de Anticorpo	21
2.1.3.2. Características e Propriedades Principais das Imunoglobulinas Humanas	23
2.1.4. A Interação Antígeno-Anticorpo	27
2.2. Revisão dos Testes Sorológicos Clássicos Utilizados para a Identificação e Quantificação de Antígenos e Anticorpos	30
2.2.1. Teste Sorológico de Hemaglutinação Passiva	32
2.2.2. Teste Sorológico de Imunofluorescência	35
2.2.3. Teste Sorológico de Fixação de Complemento	37
2.3. Testes Sorológicos Não-Convencionais para Determinação Quantitativa de Anticorpos e Antígenos	40
2.3.1. Radioimunoensaio	40

	Página
2.3.2. Teste Sorológico ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	44
2.3.2.1. A Escolha da Enzima para a Formação de Conjugados Anti-imunoglobulina-enzima, que são usados em Testes ELISA	47
2.3.2.2. Revisão dos Métodos Utilizados para Pre- paração de Conjugados Enzimáticos para Uso em Testes ELISA	48
2.3.2.3. Revisão dos Imunosorventes Utilizados em Teste ELISA. Caracterização do Imunosor- vente Ideal	50
2.3.2.4. Revisão dos Métodos Utilizados para De- terminação de Anticorpos e Antígenos em Amostras e Soros Desconhecidos usando Tes- te ELISA	53
2.3.2.5. Sensibilidade e Reprodutibilidade do Tes- te ELISA	57
2.4. Revisão dos Tipos de Suporte e Métodos de Pre- paração Utilizados na Obtenção de Imunosorven- tes	58
2.5. Materiais Usados na Preparação dos Suportes Estudados neste Trabalho	70
2.5.1. Resinas Amínicas	75
2.5.2. N-metilolacrilamida (NMA)	82
2.5.3. Catalisadores e Processos de Polimerização	84
2.5.4. Tecidos Sintéticos Utilizados	90
2.5.4.1. Poliester	91

	Página
2.5.4.2. Nylon 6,6	91
2.6. Formas de Formaldeído Encontradas em Resinas Amínicas e em Tecidos Tratados com essas Resinas	93
2.7. Métodos Analíticos para Determinação das várias Formas de Formaldeído	96
2.7.1. Determinação de Formaldeído em Resinas Amínicas	96
2.7.1.1. Formaldeído Total	96
2.7.1.2. Formaldeído Livre	97
2.7.1.3. Formaldeído Metilol	99
2.7.1.4. Formaldeído Metilado	100
2.7.1.5. Formaldeído Metilênico	101
2.6.2. Determinação de Formaldeído em Tecidos Tratados com Resinas ou Monômeros à Base de Formaldeído	101
2.6.2.1. Formaldeído Livre em Tecidos Tratados	102
2.6.2.2. Formaldeído Metilol em Tecidos Tratados	105
2.8. Caracterização da Natureza da Ligação que Ocorre entre a Proteína e o Suporte-Resina na Preparação de Imunosorventes	107
2.8.1. Isotermas de Adsorção	110
CAPÍTULO 3 - Materiais e Métodos	120
3.1. Preparação do Suporte-Resina	121
3.2. Preparação de Discos de Suporte-Resina Sensibilizados	124

	Página
3.3. Metodologia do Teste Imunoenzimático ELISA, utilizando discos do Suporte-Resina sensibilizados como Imunosorvente	126
3.4. Preparação de Placas de Poliestireno Sensibilizadas	129
3.5. Metodologia do Teste Imunoenzimático ELISA, utilizando Placas de Poliestireno Sensibilizadas como Imunosorvente	129
3.6. Preparação do Traçador IgG - $^{125}\text{I}$ , para uso em Radioimunoensaio	130
3.7. Determinação da Quantidade de Proteína ligada por Disco de Suporte-Resina por Radioimunoensaio	130
3.8. Preparação das Proteínas (antígenos e anticorpos)	131
3.8.1. Antígeno da Doença de Chagas	131
3.8.2. Antígeno de Toxoplasmose	131
3.8.3. Antígeno da Rubéola	131
3.8.4. Imunoglobulina G humana	132
3.8.5. Anti-imunoglobulina G humana	132
3.9. Preparação do Conjugado Enzimático : anti-imunoglobulina G humana-peroxidase	132
3.10. Determinação de Formaldeído Livre no Suporte-Resina	133
3.11. Determinação da Concentração de Grupos Metilol no Suporte-Resina	134

	Página
CAPÍTULO 4. Resultados e Discussões	138
4.1. Introdução	139
4.2. Ensaio Preliminares visando a Seleção de Resinas, Condições de Polimerização e Tecidos Sintéticos para Preparação do Suporte-Resina	141
4.3. Caracterização do Suporte-Resina Desenvolvido	149
4.3.1. Concentração de Grupos Metilol no Suporte-Resina	150
4.3.2. Área Superficial Disponível no Suporte-Resina para Imobilização de Proteínas	157
4.4. Estudos das Variáveis que influenciam a Quantidade de Imunoproteína Imobilizada no Suporte-Resina na Reação de Imobilização	160
4.4.1. Influência da Quantidade de Resina Depositada e da Concentração de Grupos N-metilol do Suporte-Resina	162
4.4.2. A Influência do pH, Concentração de Eletrólitos, Temperatura e Tempo de Reação	174
4.4.2.1. A Influência do pH e Concentração de Eletrólitos	174
4.4.2.2. Influência da Variação da Temperatura e do Tempo de Reação	180
4.5. Estudo da Natureza e Estabilidade da Ligação entre o Suporte-Resina e Superfícies de Poliestireno e a Proteína	185

	Página
4.5.1. Aplicação de Modelos e Isotermas de Adsorção a Dados de Equilíbrio obtidos na Imobilização do Anticorpo IgG em Discos de Suporte-Resina (35 g NMA/m <sup>2</sup> ) e em Superfícies de Poliestireno	188
4.5.2. Estudo de Estabilidade da Ligação da proteína ao Suporte-Resina	205
4.5.2.1. O Efeito da Temperatura e Tempo de Estocagem	206
4.5.2.2. O Efeito da Tensão Iônica e pH (o uso de Soluções Eluentes)	211
4.6. Avaliação da Capacidade de Captação de IgG em solução para Imunosorventes Preparados com Suporte-Resina e Diferentes Quantidades de Anti-IgG Imobilizada. Discussão da Natureza da Interação Imunosorvente - IgG em solução	213
4.7. Estudo Sistemático do Desempenho do Imunosorvente Desenvolvido, no Teste ELISA para Doença de Chagas	225
4.7.1. Painel de Soros Humanos utilizado	227
4.7.2. Titulação dos Soros do Painel	228
4.7.3. Sensibilidade	
4.7.4. Reprodutibilidade	
4.7.5. Especificidade e Reatividade Cruzada	234
4.8. Teste ELISA com Placas de Poliestireno Sensibilizadas, para Doença de Chagas	238

	Página
4.8.1. Sensibilidade	238
4.8.2. Especificidade e Reatividade Cruzada	240
4.9. Comparação do Teste ELISA com Discos, com o Teste ELISA com Placas de Poliestireno, para a Doença de Chagas	240
4.10. Comparação do Teste ELISA com Discos, com Testes Sorológicos Clássicos	242
4.11. Demonstração da Viabilidade da Determinação Quantitativa de Soros em Teste ELISA com Discos, utilizando-se apenas uma Diluição do Soro	242
CAPÍTULO 5. Conclusões e Sugestões	249
5.1. Conclusões	250
5.2. Sugestões	254
Referências Bibliográficas	257

CAPÍTULO 1

Introdução

Nos dias atuais é cada vez maior a interação entre a Área Médica e a Área de Desenvolvimento de Materiais, na qual estão incluídas as Engenharias Química, de Materiais e Mecânica, além da Química e da Física.

Isso ocorre, em parte, devido à crescente aplicação de materiais poliméricos, na confecção e recobrimento de artefatos implantáveis, como órgãos, válvulas e próteses, bem como de produtos de uso externo, como capilares poliméricos usados em diálise e oxigenação do sangue, em circulação extra-corpórea.

Materiais poliméricos insolúveis em água, são também usados como suportes, para imobilização de enzimas e proteínas biologicamente ativas, como antígenos e anticorpos.

Estes suportes com proteínas imobilizadas, são utilizados em testes analíticos, para dosagem e identificação de certas substâncias, como hormônios, toxinas, antígenos e anticorpos presentes no sangue, na urina e em outros fluidos do corpo humano.

Testes Sorológicos são técnicas utilizadas para análise de componentes do sangue, como antígenos e anticorpos, que têm grande importância no diagnóstico de inúmeras doenças causadas por parasitas, vírus, bactérias ou fungos.

Nos Testes Sorológicos ocorrem reações de anticorpos ou antígenos presentes no soro sanguíneo, com antígenos característicos do parasita, vírus ou bactéria, ou anticorpos específicos purificados, obtendo-se quase sempre, uma revelação visual desta reação.

Esta revelação é dada nos testes sorológicos clássicos, pela aglutinação de partículas nos testes de Hemaglutina

ção; pela lise de hemácias, nos testes de Fixação de Complemento; pela fluorescência de compostos formados, nos Testes de Imunofluorescência; e nos testes não-convencionais, pela formação de compostos corados, nos testes imunoenzimáticos, e pela leitura de radioatividade em radioimunoensaaios.

Os Testes Imunoenzimáticos do tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), descritos simultaneamente por Engvall e Perlmann<sup>(7)</sup> e Van Weemen e Schuurs<sup>(8)</sup>, em 1971, e os Testes Radioimunológicos introduzidos por Wide e Porath<sup>(6)</sup> em 1966, que são de desenvolvimento mais recente, mas já muito difundidos, trouxeram um grande progresso para o diagnóstico sorológico.

O Teste ELISA utiliza na sua rotina anticorpos marcados com enzima, normalmente a peroxidase, e o Radioimunoensaio utiliza anticorpos ou antígenos marcados com isótopos radioativos, principalmente  $^{125}\text{I}$ .

Em geral, estes testes utilizam antígenos específicos ou eventualmente anticorpos, imobilizados em suportes sólidos insolúveis em água, denominados suportes "sensibilizados" ou imunosorventes.

Estes imunosorventes quando incubados com o soro do sangue de um paciente, reagem especificamente com elementos presentes no soro, como anticorpos contra o antígeno imobilizado, ou seus componentes.

Esta reação é então revelada, por uma nova incubação com uma solução de um anti-anticorpo ou de um antígeno, marcados com um indicador (enzima ou isótopo radioativo).

No Teste ELISA procede-se a uma nova incubação com

uma solução de substrato adequado à enzima, cuja reação proporciona o desenvolvimento de coloração, de intensidade mensurável por espectrofotometria. No Radioimunoensaio a radioatividade do imunosorvente é medida em contadores de radiação gama.

Pela grande sensibilidade, especificidade, não-subjetividade na leitura dos resultados, e adequação ao processamento de grande número de soros, estes testes apresentam nítida superioridade sobre os testes sorológicos clássicos, tendendo a substituí-los, em muitos casos.

Os suportes mais utilizados atualmente na preparação de imunosorventes, para uso em testes imunoenzimáticos do tipo ELISA, são superfícies de poliestireno no formato de cavidades de placas, tubos ou esferas.

Entretanto, a imobilização de antígenos ou anticorpos a essas superfícies se dá por simples adsorção, o que acarreta as seguintes limitações de ordem prática:

- a) A instabilidade e fragilidade da ligação suporte-proteína, que não permite a estocagem das placas sensibilizadas por períodos longos, a não ser sob condições especiais;
- b) A dessorção da proteína adsorvida na placa, que ocorre durante as reações sorológicas que compõem a rotina do teste, diminuindo a reprodutibilidade e sensibilidade do mesmo;
- c) As diminutas quantidades de proteína que se consegue adsorver nestas superfícies de poliestireno, que diminuem a sensibilidade do teste.

Conforme se observa na literatura<sup>(32,33,54)</sup>, procura-se solucionar estes problemas, através da ligação covalente de antígenos ou anticorpos ao suporte sólido, na tentativa de implementar a estabilidade do imunosorvente obtido, ou seja, da ligação da proteína ao suporte e de se ligar maiores quantidades de proteína.

Entretanto, muitos destes processos são de difícil execução, necessitando elevado controle das condições de reação, de alto custo ou de resultados pouco confiáveis.

Este trabalho originou exatamente de dificuldades encontradas por pesquisadores do Instituto de Medicina Tropical, da Universidade Estadual de São Paulo-USP, na obtenção de suportes sólidos reativos, que permitissem a ligação covalente do antígeno do Trypanosoma cruzi, agente causador da Doença de Chagas e responsável pela infecção atual de 10 a 20 milhões de pessoas nas Américas.

O imunosorvente preparado com estes suportes sólidos através da ligação covalente do antígeno, seria então usado na rotina do Teste ELISA, que já se mostrara um eficiente método de medida do anticorpo contra o Trypanosoma cruzi, utilizando-se como suporte sólido principalmente as placas de poliestireno.

No Instituto de Medicina Tropical da USP - Laboratório de Imunologia, tinham sido feitas várias tentativas para ligação covalente de antígenos a suportes lá preparados.

Inicialmente avaliou-se um teste imunoenzimático para Doença de Chagas, usando como imunosorvente pequenas esferas de poliestireno recobertas com acetato de celulose, oxidadas pelo

metaperiodato de sódio<sup>(17)</sup>. Em termos de estabilidade o problema foi resolvido, mas foram ligadas apenas quantidades muito pequenas de antígeno, permitindo uma amplitude de reatividade de muito limitada.

Tentou-se também a preparação de outros suportes descritos na literatura<sup>(54)</sup> para a imobilização de enzimas, baseados na hidrólise ácida de tecidos de poliamida (Nylon 6,6), para quebra de ligações peptídicas  $\begin{matrix} -N-C- \\ | \quad || \\ H \quad O \end{matrix}$  e liberação de grupos funcionais reativos. A ligação do antígeno dá-se então, através de um reagente intermediário, comumente o glutaraldeído.

Na utilização deste método, entretanto, ocorrem problemas relativos ao controle da hidrólise ácida do Nylon, resultando na deterioração do suporte, pela quebra das ligações das cadeias poliméricas, chegando à dissolução em casos extremos.

Foi também testado no Instituto de Medicina Tropical, por solicitação da Organização Mundial da Saúde-OMS, um imunossorvente composto por fitas de Nylon com antígeno de Trypanosoma cruzi ligado covalentemente, como descrito por Marci-par<sup>(32)</sup>. Os Testes ELISA realizados com este imunossorvente tiveram entretanto, resultados comparáveis aos das esferas tratadas com meta-periodato de sódio, ou seja, sem possibilidade de uso em testes quantitativos, dada a limitada reatividade.

A partir destas dificuldades encontradas, formou-se uma associação entre o Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical, da USP e o Departamento de Engenharia Química, da Faculdade de Engenharia de Campinas, da UNICAMP, visan-

do o desenvolvimento de um novo suporte reativo, capaz de imobilizar, de preferência covalentemente, proteínas em grande quantidade, fornecendo como produto um imunosorvente estável, de alta reatividade, adequado para determinações quantitativas em Testes ELISA, com sensibilidade e reprodutibilidade semelhantes ou superiores às do Teste ELISA com placas de poliestireno. O uso deste novo suporte deveria ainda proporcionar a automação do Teste ELISA, para poder ser usado em bancos de sangue e laboratórios de rotina, que exigem grande número de análises, num curto período de tempo.

A produção das proteínas como antígenos, anticorpos, conjugados enzimáticos e radioativos, utilizadas nos estudos realizados, bem como os testes imunoenzimáticos e radioimunoensaios de avaliação do produto produzido, foram efetuados no Instituto de Medicina Tropical e no Laboratório de Análises e Pesquisas Clínicas Gastão Fleury S.C. Ltda.

O novo suporte desenvolvido para a preparação de imunosorventes é de baixo custo e de fácil obtenção, sendo composto por tecidos sintéticos recobertos por uma fina camada de resina polimerizada, apresentando grupos funcionais N-metilol ( $N-CH_2OH$ ), aptos a reagir através de reação covalente, com grupos funcionais de proteínas (grupos amino e hidroxila).

Este tipo de suporte foi primeiramente descrito na literatura por Bittencourt et al<sup>(103)</sup>, em 1983, constituindo então um produto original, e motivando o estudo sistemático desenvolvido neste trabalho conjunto.

CAPÍTULO 2

Revisão Teórica

## 2.1. Conceitos Básicos de Imunologia Necessários para a Compreensão das Interações Antígeno-Anticorpo que ocorrem em Testes Sorológicos

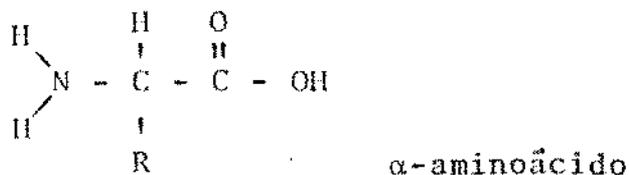
Nos testes para diagnóstico sorológico em Imunologia, são utilizadas em todos os métodos de rotina, as interações que ocorrem entre moléculas de proteína imunologicamente ativas como antígenos, anticorpos ou seus componentes.

Para uma boa compreensão dos conceitos utilizados nesses testes sorológicos e das reações neles envolvidas, é necessária uma caracterização eficiente dos tipos de moléculas que se deseja identificar ou quantificar e das interações que ocorrem entre elas.

### 2.1.1. A Relação entre a Configuração Espacial e as Propriedades das Moléculas de Proteína <sup>(1)</sup>

Proteínas são macromoléculas formadas por sequências particulares de resíduos de aminoácidos, cuja conformação confere à cada proteína um complexo formato tridimensional característico.

Um aminoácido pode ser representado pela fórmula geral:



onde R representa uma entre mais de 20 cadeias laterais possíveis como se pode ver na Tabela 2.1.

TABELA 2.1

Aminoácidos usualmente encontrados em proteínas (1)

1 - Glicina (Gly)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}}_2$
2 - Alanina (Ala)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_3$
3 - Valina (Val)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_3$
4 - Leucina (Leu)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_3$
5 - Iso-Leucina (Ile)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \underset{\text{CH}_2 - \text{CH}_3}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_3$
6 - Fenilalanina (Phe)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{array}{l} \diagup \text{CH} = \text{CH} \diagdown \\ \diagdown \text{CH} - \text{CH} \diagup \end{array}$
7 - Tirosina (Tyr)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH} \begin{array}{l} \diagup \text{CH} = \text{CH} \diagdown \\ \diagdown \text{CH} - \text{CH} \diagup \end{array} - \text{OH}$
8 - Treonina (Thr)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \underset{\text{OH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_3$
9 - Serina (Ser)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{OH}$
10 - Cisteína (Cys)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{SH}$
11 - Cistina	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{NH}_2$
12 - Metionina (Met)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3$
13 - Triptofano (Try)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}} - \underset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}} \begin{array}{l} \diagup \text{CH} = \text{CH} \diagdown \\ \diagdown \text{CH} - \text{CH} \diagup \end{array}$
14 - Prolina (Pro) ( $\alpha$ -iminoácido)	$\text{HN} \begin{array}{l} \diagup \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 \\ \diagdown \text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}}_2 \end{array}$
15 - Hidroxiprolina (Hyp) ( $\alpha$ -iminoácido)	$\text{HN} \begin{array}{l} \diagup \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 \\ \diagdown \text{CH}_2 - \underset{ }{\text{CH}} - \text{OH} \end{array}$
16 - Ácido Aspartico (Asp)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
17 - Asparagina (Asn)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CONH}_2$
18 - Ácido Glutâmico (Glu)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
19 - Glutamina (Gln)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CONH}_2$
20 - Arginina (Arg)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} - \overset{\text{NH}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}} - \text{NH}_2$
21 - Lisina (Lis)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH}_2$
22 - Histidina (His)	$\text{NH}_2 - \overset{\text{COOH}}{\underset{ }{\text{CH}}} - \text{CH}_2 - \underset{\text{H}}{\underset{ }{\text{N}}} \begin{array}{l} \diagup \text{C} = \text{CH} \diagdown \\ \diagdown \text{CH} - \text{C} \diagup \end{array}$



Esta conformação tridimensional resulta de interações espaciais entre cadeias laterais R, de acordo com a flexibilidade, carga e outras propriedades das mesmas.

Para exemplificar a estrutura primária de uma proteína, mostra-se na Figura 2.1 a enzima ribonuclease, cuja cadeia proteica contém 124 resíduos de aminoácidos, tomados entre os usuais 20 tipos expostos na Tabela 2.1.

Pode-se ver na Figura 2.1, que a ribonuclease apresenta em sua sequência característica 4 resíduos do aminoácido cistina, formados cada um deles por 2 resíduos de cisteína, ligados entre si por pontes dissulfídicas (-S — S-). Como entretanto cada um dos resíduos de cisteína está localizado numa posição determinada da cadeia, estas ligações dissulfídicas promovem o dobramento da cadeia e a estabilização de sua conformação tridimensional.

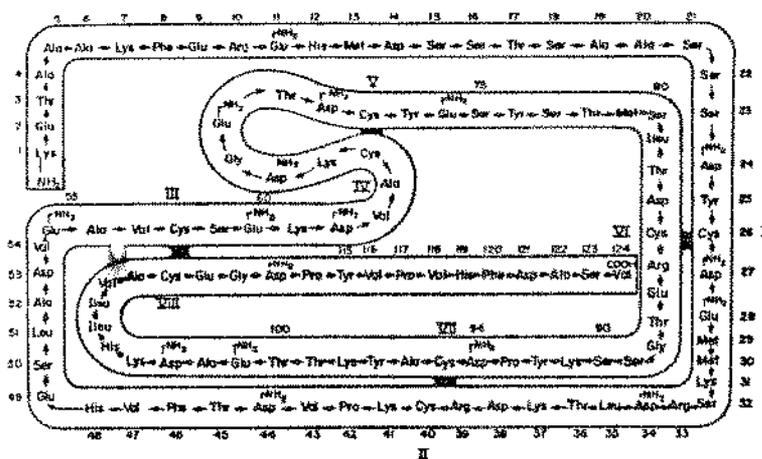


Figura 2.1- Sequência Resíduos de Aminoácidos da Molécula da Ribonuclease (Para as abreviações ver Tabela 2.1)<sup>(1)</sup>

São ligações intra-moleculares que conferem à molécula sua estrutura secundária.

A conformação espacial que é a representação da estrutura secundária de uma cadeia proteica, pode ser observada na Figura 2.2, que apresenta a estrutura tridimensional da proteína na quimotripsina, obtida por técnicas cristalográficas, usando Raio-X.

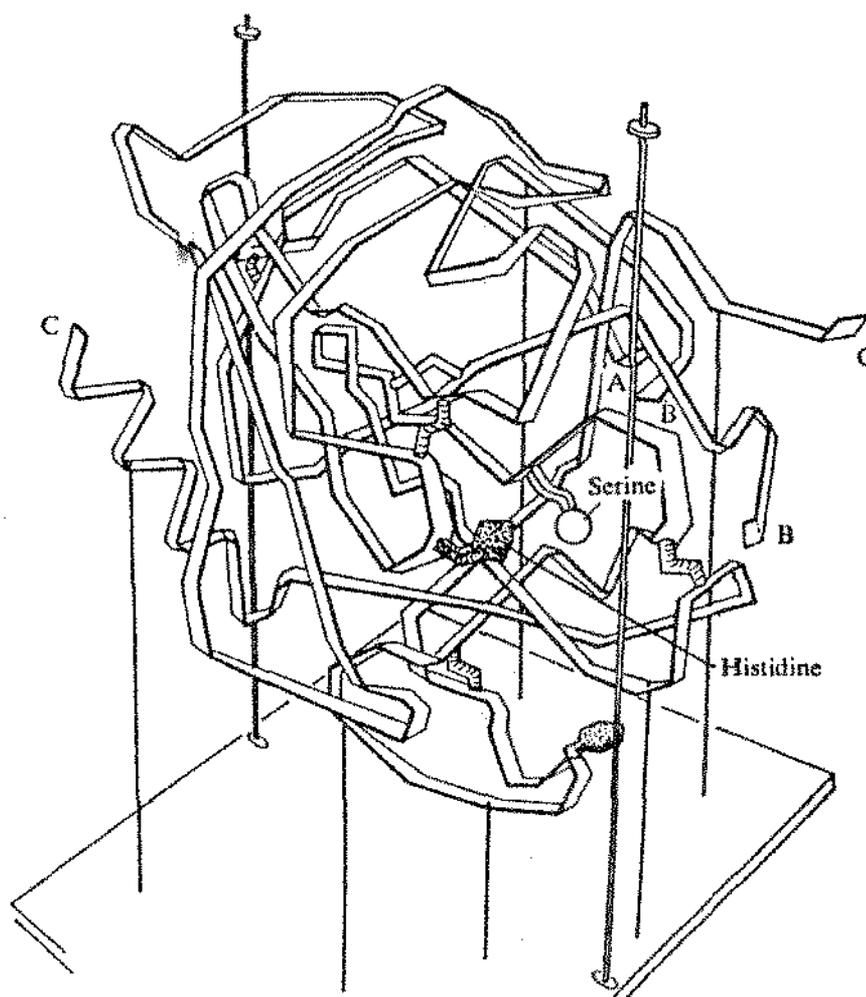


Figura 2.2 - Estrutura Tridimensional da Quimotripsina, com resolução de  $2 \text{ \AA}^{\circ}$  (1)

Proteínas podem conter mais de uma cadeia proteica, ligadas entre si por pontes dissulfídicas estabelecidas entre 2 resíduos de cisteína, formando a chamada estrutura ternária.

Finalmente moléculas de proteína podem formar agrega-

dos como dímeros , pentâmeros, etc., através de ligações intermoleculares entre certos resíduos de aminoácidos, desde que não façam parte do sítio ativo da molécula, no caso de uma enzima, ou de uma imunoproteína (anticorpo ou antígeno). Esta é a estrutura quartenária.

A maioria dos resíduos de aminoácidos que compõem a molécula proteica, não estão envolvidos no seu sítio ativo, que se constitui de no máximo 20 resíduos para enzimas específicas para substratos poliméricos.

O papel dos resíduos não envolvidos no sítio ativo, é a determinação da conformação espacial da molécula e especialmente do formato e orientação dos resíduos que compõem o sítio ativo.

Os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio ativo, não estão necessariamente lado a lado ou mesmo próximos uns dos outros, na sequência da estrutura primária da proteína. A cadeia proteica tem a tendência de dobrar-se sobre si mesma, de tal modo que os resíduos hidrofílicos permaneçam na superfície da estrutura globular, a fim de facilitar a solubilidade da molécula em solventes aquosos. É este dobramento específico da cadeia proteica que proporciona uma aproximação suficiente de determinados resíduos que compõem o sítio ativo, determinando a sua especificidade em relação a um substrato (enzima) ou a uma outra molécula com atividade imunológica (p.e. anticorpo).

Os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos que compõem o interior da estrutura tridimensional da molécula, também exercem importante papel na manutenção desta estrutura, já que promovem ligações intra-moleculares.

### 2.1.2. As Características Estruturais dos Antígenos e suas Propriedades (2,3)

Antígenos são substâncias químicas externas a um organismo, que quando nele introduzidas, são reconhecidas por células especiais encarregadas da manutenção do organismo como ele é.

Estas substâncias ou células estranhas ao organismo apresentam estruturas novas que correspondem a determinado trecho ou lugar da molécula, que sensibilizam fundamentalmente dois tipos de célula : os linfócitos B e os linfócitos T.

Uma vez sensibilizados, os linfócitos B se diferenciam em plasmócitos e iniciam uma síntese intensa de anticorpos capazes de reagir especificamente com a parte da molécula estranha, chamada de determinante antigênico. Mas para ocorrer essa diferenciação é necessária a cooperação do linfócito T, que conforme evidências regula essa produção de anticorpos.

Antígenos, em sua grande maioria, são proteínas simples ou ligadas a lipídeos ou carboidratos. Em número muito menor aparecem alguns polissacarídeos.

Antígenos são portanto, substâncias de elevado peso molecular, embora sejam conhecidas certas substâncias de baixo peso molecular, que sob certas condições, são capazes de induzir imunização e produzir reações imunológicas.

Um antígeno é operacionalmente definido pela apresentação de 2 características fundamentais :

- a) Imunogenicidade: é a capacidade de induzir a resposta imune, ou seja, a formação de anticorpos contra aquele antígeno;

b) Antigenicidade : é a capacidade de reagir especificamente com os anticorpos produzidos por seu estímulo, ou seja, é a propriedade que possui a molécula de antígeno de se adaptar tridimensionalmente à molécula de anticorpo, reagindo especificamente.

Nos estudos iniciais em Imunologia, a maioria dos antígenos estudados eram particulados, tais como bactérias ou células sanguíneas.

O uso fez com que seja corrente chamar-se de antígeno aos próprios microorganismos ou células, seus produtos metabólicos como por exemplo toxinas ou seus extratos. Na verdade trata-se de uma impropriedade, já que são misturas complexas de antígenos e devem ser chamados mais adequadamente de mosaicos antigênicos.

Nem todas as substâncias capazes de reagir com anticorpos, demonstrando antigenicidade, são capazes de induzir a formação de anticorpos ou seja não são imunogênicas.

Vários polissacarídeos bacterianos quando purificados não apresentam imunogenicidade, mas quando inoculados na forma natural, associados à bactérias, induzem a formação de grandes quantidades de anticorpos, que reagem especificamente com o polissacarídeo purificado. A purificação anula a imunogenicidade do polissacarídeo, mas não sua antigenicidade.

Substâncias como esta, que só induzem resposta imune quando conjugadas com outras substâncias são denominadas Haptenos.

Funcionam como haptenos não são substâncias tão complexas, mas também várias substâncias de baixo peso molecular

e de estrutura muito simples, conjugadas quimicamente à proteínas.

Anticorpos sintetizados como resposta à presença destes conjugados reagem não apenas com o conjugado original (proteínas-hapteno), mas também com conjugados do mesmo hapteno com outras proteínas e mesmo com o hapteno isolado.

A demonstração de que anticorpos eram formados contra estruturas químicas pequenas e bem definidas, os haptenos, artificialmente introduzidas na molécula do antígeno, permitiu a conclusão de que anticorpos contra antígenos naturais tinham também sua especificidade dirigida contra trechos pequenos e simples da molécula do antígeno. Estes trechos especiais, com os quais os anticorpos se combinam são chamados de Determinantes Antigênicos, que em proteínas naturais devem conter de 4 a 6 resíduos de aminoácidos apenas, ou seja, compõem diminutas frações do volume total da molécula.

Através de experimentos realizados por Kabat<sup>(3)</sup>, ficou estabelecido que o tamanho máximo do sítio de combinação do anticorpo ("cavidade") é de  $7 \times 14 \times 34 \text{ \AA}$ , que é o tamanho aproximado do determinante contendo 5 ou 6 resíduos.

Um antígeno proteico pode ter sua configuração espacial representada por uma hélice enrolada sobre si mesma, mantida fixa através de pontes de hidrogênio, pontes dissulfídicas e ligações iônicas estabelecidas entre os resíduos de aminoácido, que formam sua estrutura primária.

As porções da macromolécula que usualmente funcionam como determinantes antigênicos, são aquelas que se projetam para o exterior do corpo central da estrutura globular tridimen-

sional, tais como resíduos terminais, ângulos ou quinas, que mais facilmente podem ser atingidas pelos linfócitos B e T, com os quais vão se interrelacionar.

Os restos de aminoácidos que ficam na parte interior do emaranhado helicoidal dobrado sobre si mesmo (estrutura secundária), que constitui a molécula de antígeno, não poderão participar de determinantes antigênicos, pois não serão acessíveis.

Portanto, as propriedades de imunogenicidade e antigenicidade de proteínas naturais dependem muito mais da configuração espacial fixa assumida pela molécula, do que da sequência de aminoácidos que a compõe.

A importância da configuração espacial fica demonstrada, pelo fato de que a molécula de antígeno não reage mais com o anticorpo cuja produção induziu, quando ela é denaturada por calor ou reagentes químicos, ocorrendo o desenrolamento da cadeia da proteína.

A configuração espacial do antígeno determina também a maior ou menor acessibilidade do determinante antigênico, tanto para induzir a síntese de anticorpos, como para reagir posteriormente com eles.

É também aceito que o aumento do peso molecular da molécula de antígeno, que apresenta então uma estrutura tridimensional mais complexa, favoreça a ocorrência de maior número de determinantes antigênicos e portanto, aumente a sua imunogenicidade.

### 2.1.3. As Características Estruturais dos Anticorpos e suas Propriedades (2,3)

Anticorpos são proteínas solúveis encontradas no soro sanguíneo de animais, sintetizadas a partir do estímulo da presença de um antígeno no organismo.

A produção de anticorpos, que têm a propriedade de reagir especificamente com os antígenos neutralizando-os, é realizada por células sanguíneas chamadas linfócitos B (linfócitos imunocompetentes), que após a identificação do antígeno se diferenciam em plásmocitos e iniciam a síntese. Entretanto, para que a identificação e síntese ocorram, é necessária a cooperação dos linfócitos T.

A separação das proteínas do soro sanguíneo por eletroforese (mobilidade em campo elétrico) resulta em 5 frações principais: a albumina (A) e as globulinas designadas por  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ .

Quando se faz um estudo eletroforético de um soro com alta concentração de anticorpos (soro hiperimune) verifica-se um elevado pico de gamaglobulina ( $\gamma$ ), que é a proteína mais lenta, por ser a menos carregada eletricamente. Reagindo-se este soro com o antígeno que estimulou a produção destes anticorpos, separando-se o precipitado formado: antígeno-anticorpo (Ag-Ac) e realizando-se uma nova eletroforese, verifica-se um pico normal para a gamaglobulina. (Figura 2,3).

Mostra-se desta maneira que os anticorpos são moléculas da família das gamaglobulinas. As gamaglobulinas apresentam entretanto diferenças entre si, tendo ainda sido identifi

casas duas outras globulinas distintas das gamaglobulinas, que também exibem atividade de anticorpo.

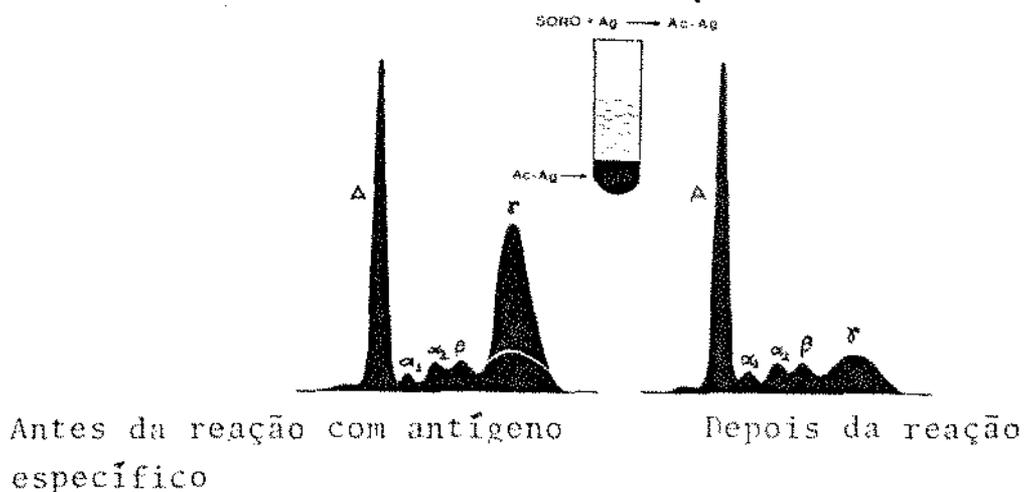


Figura 2.3. Separação de Proteínas de um Soro Hiperimune por eletroforese<sup>(3)</sup>

Realizando-se a sedimentação por ultracentrifugação de anticorpos purificados, verifica-se que certos anticorpos se dimentam-se rapidamente, apresentando peso molecular aproximado de 900000 e constante de sedimentação de 19 Svedberg e ou tros anticorpos exibem peso molecular aproximado de 160000 e constante de sedimentação de 7 Svedberg.

O anticorpo pode então ser caracterizado pela sua mobi lidade em campo elétrico e sua constante de sedimentação, além das suas propriedades imunológicas específicas, como a neutri lização de toxinas ou aglutinação de hemácias.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), adotou a designa ção genérica de imunoglobulinas, para todas as classes de pro teína que apresentem atividade de anticorpo ou tenham a mesma estrutura básica da molécula de anticorpo. As cinco classes de imunoglobulinas humanas conhecidas até hoje são denominadas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

### 2.1.3.1. Estrutura Básica da Molécula de Anticorpo

Em virtude da IgG ser a imunoglobulina de maior concentração no soro sanguíneo, portanto mais fácil de ser obtida, foi a primeira a ter sua estrutura estudada.

Porter e Eldeman<sup>(2,5)</sup>, entre 1959 e 1962, realizaram pesquisas básicas que conduziram a um modelo da molécula de IgG que hoje é admitido como a unidade estrutural básica de todas as classes de imunoglobulinas (Figura 2.4):

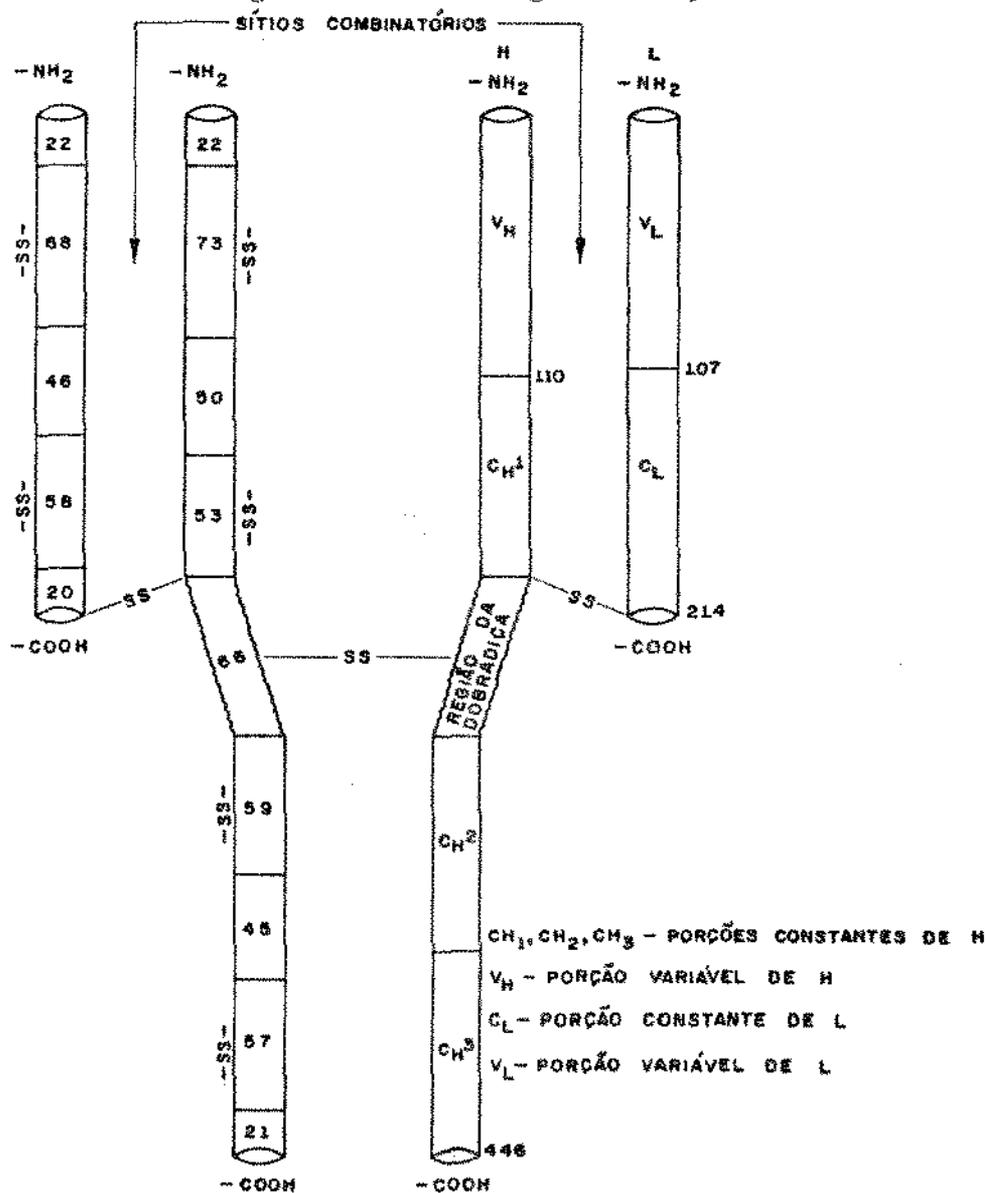


Figura 2.4- Estrutura Básica da Molécula de IgG

- a) 2 subunidades chamadas cadeias pesadas - H (do inglês heavy) com peso molecular variando entre 50000 e 75000, dependendo da classe a que pertence o anticorpo. As cadeias pesadas são unidas covalentemente, por pontes dissulfídicas na região das dobradiças e por forças hidrofóbicas:
- b) 2 subunidades chamadas cadeias leves - L (do inglês light) com peso molecular em torno de 25000. Cada cadeia leve é unida a cada uma das cadeias pesadas, por sua extremidade C-terminal, através de uma ponte sulfídica, estabelecida entre um resto cisteínico da cadeia leve e outro da cadeia pesada.

As cinco classes de imunoglobulinas humanas até agora conhecidas diferem-se, entre si na sequência de aminoácidos da cadeia pesada, sendo as cadeias leves iguais para todas, embora haja 2 tipos de cadeia leve, com diferentes sequências de aminoácidos:  $\kappa$  e  $\lambda$ .

As cadeias pesadas específicas para cada classe são designadas pelas letras gregas:  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  e denominam as imunoglobulinas: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE.

Cada uma das cadeias, leve ou pesada, possui uma porção aminoterminal ( $-\text{NH}_2$ ) e a oposta é carboxiterminal ( $-\text{COOH}$ ).

Cada molécula de anticorpo possui 2 sítios de combinação específicos para o determinante antigênico que induziu a sua síntese. Os sítios combinatórios se localizam nas porções  $-\text{NH}_2$ -terminais das cadeias leve e pesada e por isso a sequência de aminoácidos destas porções é altamente variável e específica para cada antígeno.

A região das cadeias pesadas chamada região das dobra

diças é altamente rica em prolina e por isso muito flexível, permitindo que os 2 sítios combinatórios afastem-se um do outro para poderem ligar-se a determinantes distantes na mesma molécula antigênica ou em diferentes moléculas, como se pode ver na Figura 2.5.

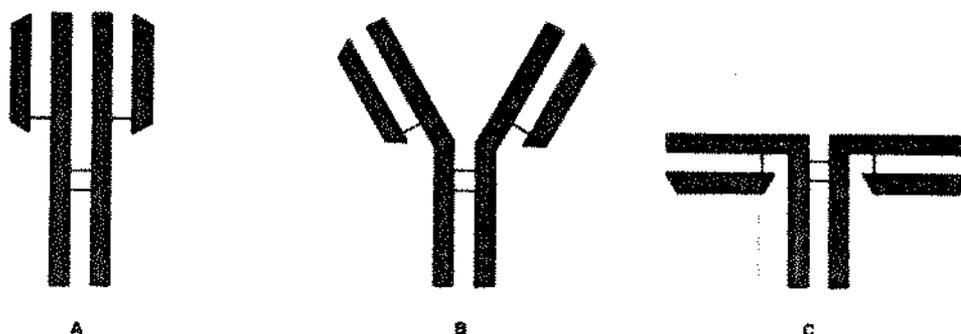


Figura 2.5 - Flexibilidade da região das dobradiças<sup>(3)</sup>. IgG livre, com sítios combinatórios próximos (A), IgG combinada com determinantes afastados (B) e com máximo afastamento, 180° (C)

#### 2.1.3.2. Características e Propriedades Principais das Imunoglobulinas Humanas<sup>(2,3)</sup>

##### 2.1.3.2.1. Imunoglobulina G (IgG)

A IgG é constituída de 1328 moléculas de aminoácidos, cada cadeia pesada - H, contendo 446 resíduos de aminoácidos e cada cadeia leve - L, 214.

É a imunoglobulina que ocorre em maior concentração no soro humano (1240 ± 270 mg/100 ml, em condições normais). É o único anticorpo humano que atravessa a placenta. Atua na forma monomérica, isto é, não forma aglomerados e seu peso molecular é de 160000.

Existem 4 subclases de IgG humana, denominadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 que correspondem a 70%, 16%, 10% e 4% do to-

tal, respectivamente. As subclasses diferenciam-se pelo número de pontes dissulfídicas (-S-S-) entre as cadeias pesadas existentes na região da dobradiça: 2 para IgG1 e IgG4, 4 para IgG2 e 5 para IgG3, por certas propriedades e pequenas variações de sequência de aminoácidos entre as 4 subclasses.

Ao microscópico eletrônico as moléculas de IgG se apresentam como cilindros de 250 a 270 Å de comprimento, por 35 a 40 Å de eixo menor<sup>(4)</sup>.

A composição em aminoácidos da IgG humana pode ser observada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Composição da IgG humana<sup>(4)</sup>

aminoácido	<u>g aminoácido</u> 100g proteína	aminoácido	<u>g aminoácido</u> 100g proteína
Lisina	7,06	Alanina	3,29
Histidina	2,44	Valina	7,92
Arginina	4,02	Metionina	0,93
Ácido Aspartico	7,77	Isoleucina	2,16
Teonina	7,04	Leucina	7,40
Serina	9,13	Tirosina	5,76
Ácido Glutâmico	11,18	Fenilalanina	4,07
Prolina	6,40	Cisteína	2,07
Glicina	3,37	Triptofano	2,63
		Carboidrato	2,87

#### 2.1.3.2.2. Imunoglobulina A (IgA)

No soro e secreções exócrinas (saliva, lágrima, fluido nasal, etc.) a IgA existe na forma monomérica, apresentando peso molecular ao redor de 160000. Pode no entanto formar polímeros com 2, 3 ou 4 moléculas ligadas entre si por uma cadeia peptídica de peso molecular 15000, chamada peça J (Junction Piece), tendo portanto os dímeros peso molecular de 360000 e constantes de sedimentação variando de 9 a 13 S Svedberg.

A IgA está presente no fluido que reveste todas as mucosas dos tratos respiratório, gastro-entérico e urinário e durante a infecção destas mucosas verifica-se um grande aumento do teor deste anticorpo nos fluidos que irrigam esta área e portanto também no sangue.

Existem 2 subclasses de IgA, IgA1 e IgA2, nas proporções de 80 e 20% no soro e 50 e 50% nas secreções. A IgA1 tem 3 pontes -S-S- entre as cadeias leves e pesadas (1 entre as pesadas e 1 entre a cadeia pesada e cada uma das leves) e a IgA2 apresenta apenas 2 pontes sulfídicas (1 entre as duas cadeias pesadas e 1 entre as duas cadeias leves. As cadeias leves e pesadas se mantêm unidas apenas por forças hidrofóbicas).

#### 2.1.3.2.3. Imunoglobulina M (IgM)

É encontrada principalmente na forma de pentâmero, com peso molecular 900000 e constante de sedimentação de 19 S. São cinco unidades monoméricas de peso molecular 180000 reunidas pelas 2 porções carboxi-terminais das cadeias pesadas, que

ficam espaçadas entre si e ligadas pela peça J formando um disco central (Figura 2.6).

Sua valência é dada pelo número de sítios de combinação que podem combinar-se com determinantes antigênicos, que normalmente é 5, já que quando um dos 2 sítios  $\text{NH}_2$ -terminais de cada molécula de IgM, se combina com uma macromolécula de antígeno, o outro fica impedido estericamente, resultando na pentavalência.

Após a infecção primária com vírus de rubéola, a quantidade de anticorpo IgM aumenta rapidamente, atinge o pico durante a segunda semana e mantém-se às vezes detectável por períodos de até 5 semanas.

Por causa do aparecimento transiente da IgM e sua ausência em casos de reexposição, a detecção de IgM é de grande ajuda no diagnóstico de infecção primária de rubéola e subsequente acompanhamento do paciente.

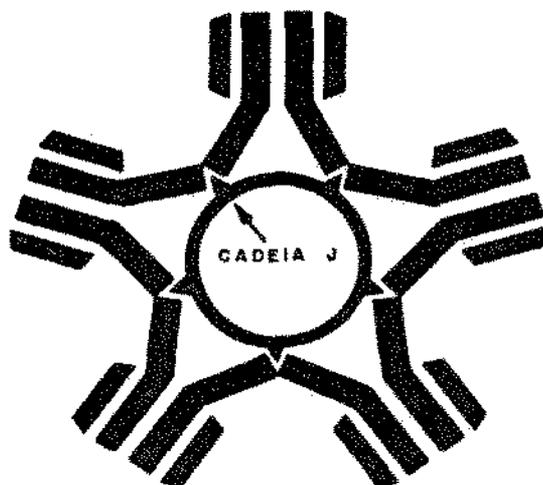


Figura 2.6 - Representação planar do pentâmero IgM<sup>(3)</sup>

#### 2.1.3.2.4. Imunoglobulina D (IgD)

Existe em pequenas quantidades no soro de indivíduos normais: 5 mg/100 ml, sendo difícil de se detectar. As cadeias H da IgD têm peso molecular 70000 e são ligadas entre si apenas por 1 ponte dissulfídica. Tem peso molecular de 185000.

#### 2.1.3.2.5. Imunoglobulina E (IgE)

Sua concentração em soros normais é infima, porém em pacientes com doenças alérgicas, dermatites e quadros correlatos, apresenta níveis de 15 µg/ml. Tem peso molecular 185000, por causa das cadeias H (ε) possuírem um peso molecular de 70000 e não de 50000 como a IgA e a IgG, devido a existência de uma 4<sup>a</sup> região ou domínio (CH<sub>4</sub> - constante) que não existe na IgG, além de alto teor de carboidrato.

#### 2.1.4. A Interação Antígeno-Anticorpo<sup>(2,3)</sup>

A peculiaridade que caracteriza este tipo de interação é a especificidade.

As células imunocompetentes sintetizam o anticorpo sob influência de características estruturais do antígeno, ou seja, a sequência de aminoácidos do sítio de combinação do anticorpo tem a configuração espacial mais adequada, de modo a complementar a configuração do grupo determinante do antígeno.

Por isso, a capacidade discriminadora do anticorpo é comparável à das enzimas. A simples mudança de um átomo de hidrogênio ou de uma hidroxila na molécula antigênica pode afetar

profundamente a sua capacidade de interagir com anticorpos sintetizados sob seu estímulo.

Esta discriminação é explicada pelo fato de que a interação antígeno-anticorpo se dá por forças intermoleculares não-covalentes, que só à distâncias inferiores a 5 Å se exercem eficazmente.

Assim a perfeição do encaixe depende da complementariedade espacial de suas estruturas. Quanto maior ela for, maior é a área de contato e maior é a afinidade da combinação.

Entretanto, quando anticorpos são sintetizados pela população das células imunocompetentes, ainda que em resposta a um único determinante, pequenas diferenças entre as moléculas de anticorpos ocorrem, pois cada célula responde de modo peculiar ao estímulo recebido. Disto resultam propriedades ligeiramente diferentes entre os anticorpos sintetizados, especialmente no que se refere à afinidade para com o grupo de determinante do antígeno.

Portanto, quando se fala de uma propriedade do anticorpo em relação a um determinante específico, fala-se da propriedade média das populações de anticorpos.

Considerando-se que os antígenos naturais são constituídos por diferentes determinantes, a variabilidade de comportamento das moléculas de anticorpos específicos para estes antígenos, poderá ser significativa.

Além de reagir com antígenos que induziram a sua formação, os anticorpos que têm pouca afinidade também reagem com outros antígenos estruturalmente semelhantes, ainda que com pequena intensidade. Estas reações são denominadas Reações Cru-

zadas e normalmente interferem em testes sorológicos para identificação de certos antígenos ou anticorpos.

O antígeno original que induz a formação de determina do anticorpo é chamado homólogo e os antígenos de reações cru zadas são chamados heterólogos.

Pode-se exemplificar o fenômeno da Reação Cruzada atra vés de uma fechadura com muitas reentrâncias e saliências re presentando o anticorpo, que só abre com uma determinada cha ve: o antígeno, e uma fechadura com pequena especificidade (pe quena afinidade) que pode-se abrir com várias chaves (Figura 2.7).

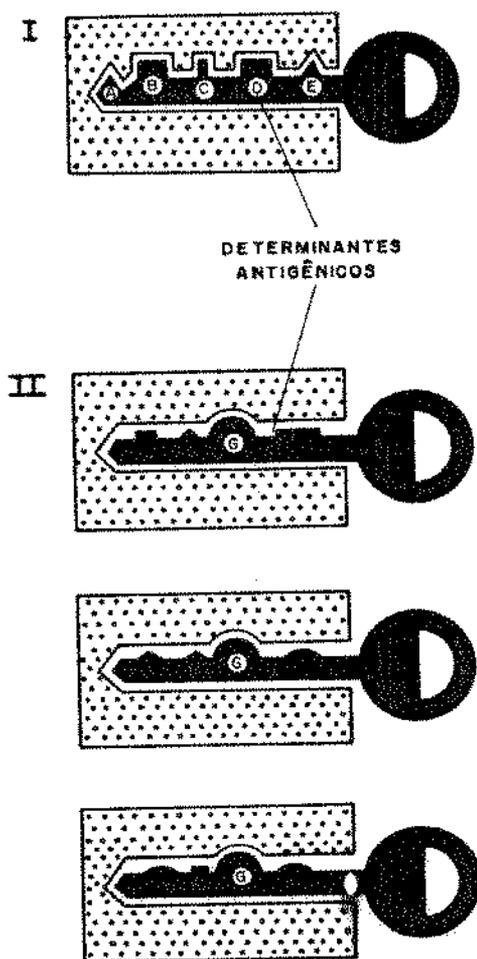


Figura 2.7 - Esquema representando a especificidade da molécula de an ticorpo e o fenômeno da Reação Cru zada<sup>(3)</sup>.

I - Fechadura (anticorpo) com vá rios pontos de ligação A, B, C, D e E.

II - Fechadura com pequena especifi cidade. Abre com várias chaves, bastando que a chave apresente o grupamento G. (Reação Cruza da).

As forças que atuam na interação antígeno - anticorpo são de natureza física, não havendo ligação covalente, mas apenas adsorção. Embora as forças sejam fracas, proporcionam em conjunto, complexos relativamente estáveis.

As cadeias laterais das moléculas de anticorpo e antígeno quando em meio aquoso, tendem-se a se aproximar por forças hidrofóbicas provocando colisões.

Após a aproximação das moléculas, começam a atuar forças coulômbicas entre grupos ionizados  $-NH_3^+$  ou  $-COO^-$  das cadeias laterais das moléculas de antígeno e anticorpo. À medida que se aproximam as moléculas, outros grupos mais fracamente ionizados também começam a agir. As forças coulômbicas são proporcionais ao quadrado da distância.

Essa maior aproximação possibilita a formação de grande número de pontes de hidrogênio, entre as ligações peptídicas.

A uma aproximação da ordem de  $5 \text{ \AA}$  começam a atuar as chamadas Forças de Van de Waals, resultantes da atração do núcleo de um átomo sobre os elétrons de outro átomo.

## 2.2. Revisão dos Testes Sorológicos Clássicos Utilizados para a Identificação e Quantificação de Antígenos e Anticorpos (2,3)

Testes laboratoriais para identificação e quantificação de antígenos, anticorpos ou de seus componentes presentes no soro sanguíneo são de importância fundamental, juntamente com o diagnóstico clínico, para o diagnóstico final e seguro de inúmeras doenças causadas por bactérias, parasitas, vírus e outras causas, sendo muitas vezes o único meio de diagnóstico.

Estes testes sorológicos servem não apenas como suporte para diagnóstico, como também para triagem de doadores de sangue e estudos epidemiológicos.

Os testes sorológicos de rotina em laboratórios, se baseiam na reação específica que ocorre entre o antígeno de determinada doença e o seu anticorpo específico, cuja presença no soro sanguíneo em determinados níveis, é indicada pela positividade ou negatividade do teste.

Nos Testes Sorológicos Clássicos a visualização desta interação antígeno-anticorpo se dá através da aglutinação de células portadoras de antígenos superficiais por anticorpos específicos (Hemaglutinação), por anticorpos marcados com substâncias fluorescentes (Imunofluorescência), por anticorpos fixadores de complemento (Reação de Fixação de Complemento) e outros.

A intensidade das reações sorológicas é geralmente avaliada pelo "Título", ou seja, pela diluição do soro em que se observa determinado efeito, sob certas condições experimentais.

Por exemplo, analisando-se um soro, em várias diluições, quanto à sua capacidade de produzir aglutinação, se a aglutinação ocorrer até a diluição de 1:640 (1 parte de soro e 640 partes de diluente), diz-se que o soro possui título de 640.

Ao se comparar títulos de vários soros deve-se fazê-lo usando a mesma técnica de dosagem, os mesmos reagentes, incluindo reagentes de referência (soros, antígenos, etc.) padronizados.

### 2.2.1. Teste Sorológico de Hemaglutinação Passiva

A aglutinação é a formação de agregados de células (hemácias) ou partículas inertes (coloídes, bentonita, latex), na superfície das quais estão fixadas moléculas de antígeno naturais (aglutinação direta ou natural) ou artificialmente introduzidos (aglutinação indireta ou passiva). Os agregados são formados por pontes moleculares de anticorpos específicos presentes no soro. Cada anticorpo se combina com duas moléculas de antígeno situadas em células ou partículas diferentes (Figura 2.8).

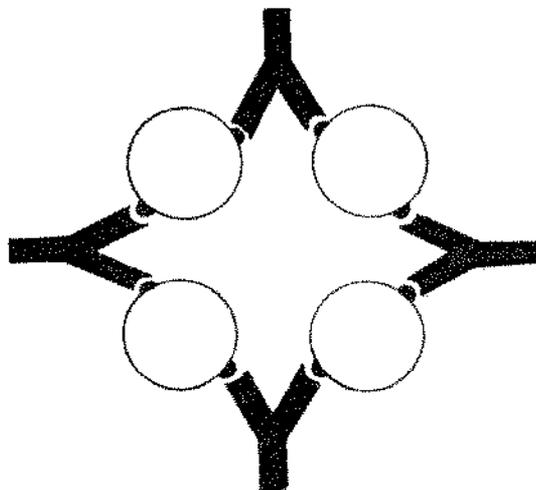


Figura 2.8 - Aglutinação de células por anticorpos dirigidos contra determinantes da superfície celular<sup>(3)</sup>

Quando se utiliza hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos) para fixar antígenos à superfície, tornando-as aglutináveis em presença de anticorpos específicos, dá-se o nome de Hemaglutinação Passiva.

As hemácias mais utilizadas são as de carneiro e as hu

manas, nas quais pode-se ligar antígenos covalentemente ou não, com boa reprodutividade. Além disso, podem ser armazenadas por longos períodos após a fixação do antígeno.

A técnica da hemaglutinação passiva é realizada principalmente em placas de poliestireno com cavidades ou poços de pequeno volume (100  $\mu$ l), nos quais se coloca uma série de diluições sucessivas do soro a testar e uma dose sempre constante de suspensão de hemácias, ou seja, do antígeno nelas fixado (Figura 2.9). Incuba-se à temperatura e tempo de reação adequados e faz-se a leitura.

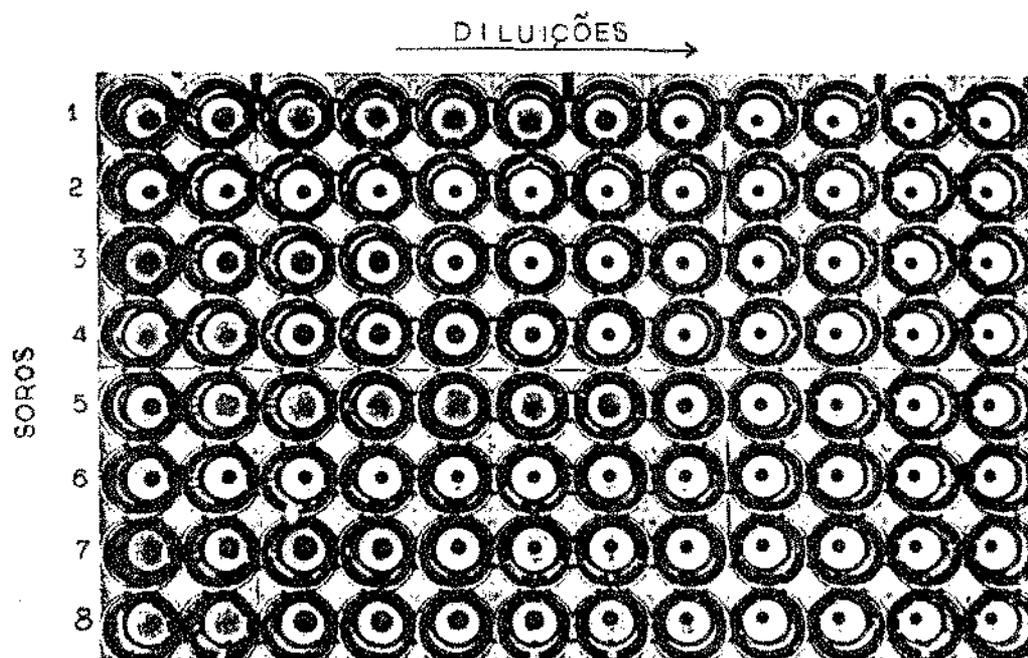


Figura 2.9 - Hemaglutinação em Placas de Microtitulação<sup>(2)</sup>

Nas cavidades onde não há hemaglutinação, as hemácias sedimentam-se no fundo e naquelas em que o anticorpo presente foi suficiente, as hemácias se aglutinam formando um revestimento da cavidade. (Figura 2.10).

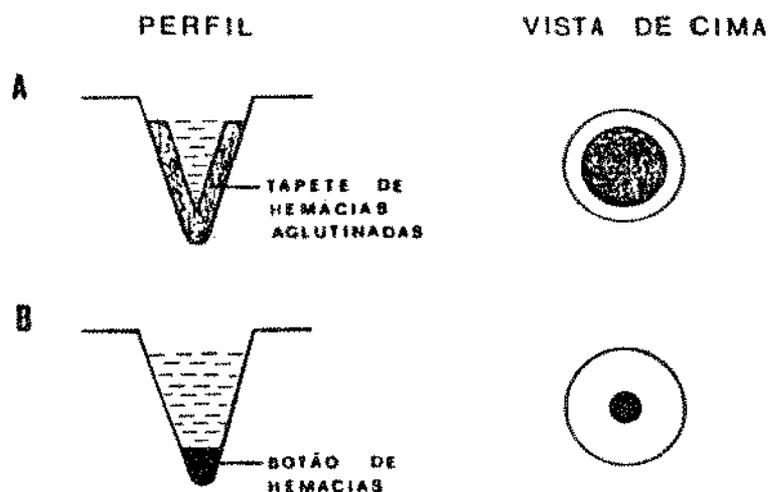


Figura 2.10 - Reação positiva (A) e Reação negativa (B) de Hemaglutinação, em uma placa de microtitulação<sup>(3)</sup>.

De acordo com o aspecto do sedimento, o resultado é interpretado: (-) para reações negativas quando se forma um botão de hemácias no fundo da cavidade, (+4) para reações altamente positivas, quando quase toda cavidade é revestida por um tapete de hemácias aglutinadas e (+3), (+2) e (+1) para aspectos intermediários.

A hemaglutinação apresenta alta sensibilidade, conseguindo detectar quantidades de anticorpo da ordem de 0,03 µg, grande rapidez de leitura, mas tem como inconveniente uma grande subjetividade de leitura do resultado, que confere-lhe uma precisão inferior a 50%, impedindo que seja quantitativa.

É aplicada entretanto a muitos antígenos solúveis, proteicos, polissacarídeos, bacterianos, viriais e outros.



A técnica da imunofluorescência indireta ou de dupla camada é mais usada. Sobre antígeno fixado à lâminas se coloca soro a várias diluições.

Após a formação do complexo Antígeno-Anticorpo, lava-se a lâmina para retirada de proteínas não reagidas e trata-se a lâmina com uma solução de anticorpo marcado (anti-imunoglobulina produzida em animais, marcada com o fluorocromo), que é específico ao anticorpo do complexo Antígeno-Anticorpo formado e lê-se o resultado ao microscópio (Figura 2.12).

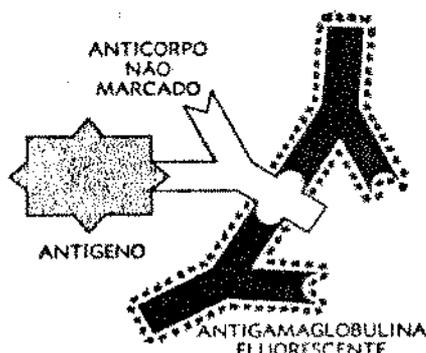


Figura 2.12 - Imunofluorescência indireta ou de dupla camada<sup>(2)</sup>

Existe a subjetividade de interpretação do resultado da reação ao microscópio, mas fazendo-se diluições sucessivas do soro, a técnica pode ser semi-quantitativa.

Usa-se esta técnica na pesquisa de anticorpos para diagnóstico de Toxoplasmose, Sífilis, Esquistossomose, Leptospirose, Doença de Chagas, etc.

Com esta técnica diferentes tipos de anticorpos do soro podem ser pesquisados, pois a especificidade do conjugado fluorescente é dirigida ao anticorpo. Usando-se anticorpos fluorescentes específicos para cada classe de imunoglobulina: IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE, pode-se identificar a classe de an-

ticorpo que se ligou ao antígeno. Em determinadas fases de uma infecção, esta informação pode ser importante como na Rubeóla ou Toxoplasmose.

### 2.2.3. Teste Sorológico de Fixação de Complemento

São denominadas como Complemento onze proteínas do soro sanguíneo, que após a formação de um complexo Antígeno-Anticorpo, podem se fixar ao anticorpo.

Se microorganismos celulares invadem um organismo imune, antígenos superficiais das células são reconhecidos pelos anticorpos presentes, havendo a formação do complexo antígeno-anticorpo. A fixação de um complemento ao anticorpo do complexo causa a lesão celular destes microorganismos invasores.

Somente os anticorpos humanos IgM, IgG1 e IgG3 são bons fixadores de complemento, mas todos antígenos podem formar com estes anticorpos, complexos Antígeno-Anticorpo fixadores de complemento.

As hemácias ou eritrócitos quando sofrem lesão celular (hemólise) liberam hemoglobina. Pode-se medir facilmente a intensidade desta hemólise através da medida da hemoglobina liberada, em um espectrofotômetro.

Por essa facilidade com que se pode quantificar a extensão da hemólise, o sistema Hemácia-Anticorpo é o sistema revelador padrão das reações de Fixação de Complemento.

Antígenos podem ser fácil e reprodutivelmente ligados artificialmente à hemácias. O contato destas hemácias com anticorpos específicos para estes antígenos, em presença de complemento, determina a formação do complexo Antígeno-Anticorpo,

a fixação do complemento e a hemólise das hemácias.

Para se evitar esta etapa de conjugação artificial de antígenos à hemácias, pode ser usado como sistema revelador ou indicador-padrão da reação de fixação de complemento, hemácias de carneiro conjugadas a um anticorpo denominado hemolisina que é sintetizado em coelhos, pelo estímulo de componentes da superfície da hemácia de carneiro (Anticorpo Anti-hemácia).

Deste modo o sistema contendo cinco componentes: antígeno, anticorpo, complemento, hemácia e hemolisina, permite quantificar anticorpos ou antígenos presentes no soro, quando se tem perfeitamente padronizados os demais elementos.

Quando se deseja conhecer a concentração de determinado anticorpo de um soro (teste quantitativo), faz-se uma diluição em série deste soro (a próxima sempre o dobro da última) e adiciona-se a cada diluição uma quantidade fixa do antígeno correspondente e uma quantidade conhecida e fixa de complemento. Faz-se a incubação por 2 horas a 4°C, para a formação do complexo Antígeno-Anticorpo-Complemento.

Adiciona-se então a cada diluição do soro uma quantidade do sistema indicador hemácia-hemolisina. Incuba-se a 37°C por 15 a 30 minutos.

O complemento que não foi fixado pelo complexo Antígeno-Anticorpo formado, se fixará ao sistema indicador provocando a lise das hemácias e a liberação de hemoglobina (Figura 2.13).

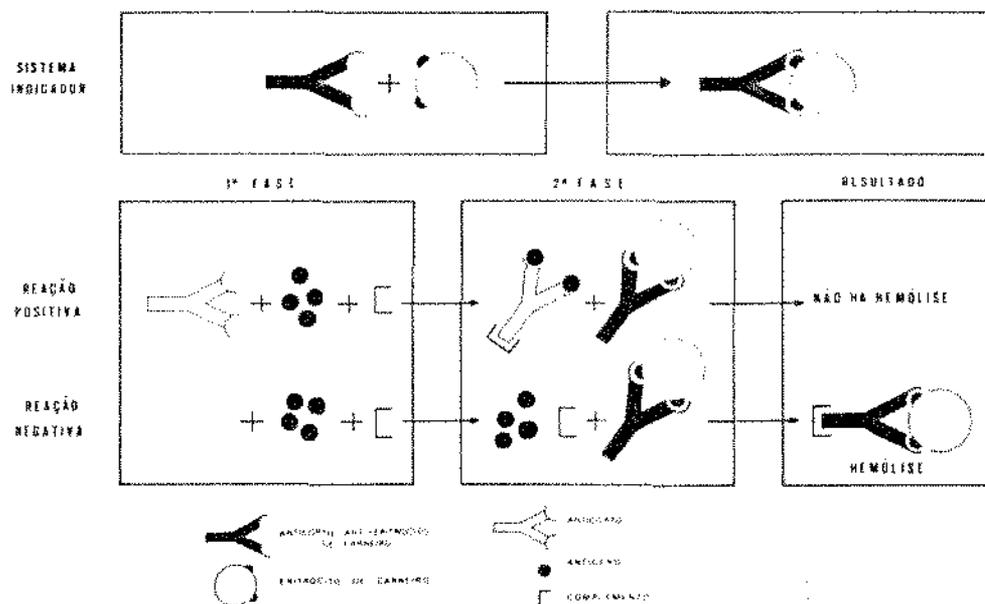


Figura 2.13 - Reação de Fixação do Complemento (3)

Após a centrifugação da suspensão faz-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 540 nm, das soluções sobrenadantes.

A absorvância lida estará relacionada através de uma curva-padrão à porcentagem de hemólise. Normalmente o valor do título do soro será dado pela diluição que provocar 50% de hemólise, mas varia de acordo com o sistema antígeno-anticorpo testado e a interpretação clínica.

Atualmente o soro-diagnóstico da sífilis e outras infecções como Doença de Chagas, numerosas viroses com Influenza, Caxumba, Poliomielite, Rubéola, etc, têm sido realizado por reações de fixação de complemento.

A desvantagem deste teste sorológico reside na rigoro-

sa padronização dos vários reagentes biológicos usados, inclusive de antígenos, que têm processos de purificação muito difíceis.

### 2.3. Testes Sorológicos Não-Convencionais para Determinação Quantitativa de Anticorpos e Antígenos

Os testes sorológicos não-convencionais realizados já em rotinas de laboratórios, que foram desenvolvidos mais recentemente, apresentando uma alta sensibilidade em relação à quantificação da proteína de interesse num soro (antígeno ou anticorpo), não subjetividade na leitura dos resultados e possibilidade de automação são o Radioimunoensaio com Imunosorvente (5, 6) e o Teste Imunoenzimático ELISA<sup>(7, 8, 9)</sup>.

Uma descrição detalhada de cada uma das técnicas será feita a seguir:

#### 2.3.1. Radioimunoensaio<sup>(5)</sup>:

Historicamente, anticorpos e antígenos marcados com iodo radiativo, foram primeiramente utilizados no estudo de reações antígeno-anticorpo em 1950, por Pressman e Eisen<sup>(10)</sup>.

Berson e Yalow<sup>(11)</sup> em 1958 foram os primeiros a chamar a atenção para a expressiva sensibilidade na determinação de antígenos, que podia ser obtida a partir da competição para formação do complexo antígeno-anticorpo, que se estabelece entre antígenos não-marcados e antígenos marcados com isótopo radiativo, quando ~~uma~~ mistura deles é colocada em contato com anticorpos específicos.

Devido a anticorpos ou antígenos marcados com isótopos radioativos poderem ser detectadas em quantidades muito pequenas, da ordem de picogramas por mililitro, as reações sorológicas que os utilizam são muito sensíveis. Por isso o Radioimunoensaio é utilizado atualmente para dosagem de hormônios em geral e de imunoglobulinas que existem em baixos níveis no soro, como a IgE.

Como principais marcadores são usados os iodos radioativos:  $^{125}\text{I}$ , com meia-vida de 57,5 dias e  $^{131}\text{I}$ , com meia-vida de 8 dias, pela facilidade de marcação e pelo restrito metabolismo do iodo.

Portanto, o princípio básico do Radioimunoensaio está assentado na competição entre a proteína marcada (antígeno ou anticorpo) e a mesma proteína, não marcada, na formação de um complexo antígeno-anticorpo e a posterior medida de sua radioatividade.

Quanto mais antígeno original é adicionado a um sistema contendo anticorpos e antígeno marcado em quantidade constante, um maior número de sítios de combinação dos anticorpos reagirá com o antígeno não-marcado, formando o complexo antígeno-anticorpo, cuja radioatividade medida após a separação dos elementos que não reagiram será cada vez menor, embora maior quantidade de complexo possa ser formada.

Existe uma relação de reciprocidade entre a quantidade de proteína não-marcada adicionada a um sistema e a quantidade de radioatividade medida no complexo formado.

Já que uma série de quantidades conhecidas de proteína não-marcada, podem ser adicionadas a um sistema contendo an

anticorpos e proteína marcada, pode-se construir uma curva padrão que relaciona cada quantidade padrão presente de proteína não-marcada, à radioatividade medida do complexo formado.

A Figura 2.14 relaciona quantidades-padrão de antígeno não-marcado adicionadas, com a % de radioatividade remanescente que é medida no complexo formado, comparando-se com a radioatividade medida do complexo formado para uma quantidade de antígeno de referência tomada como 100%.

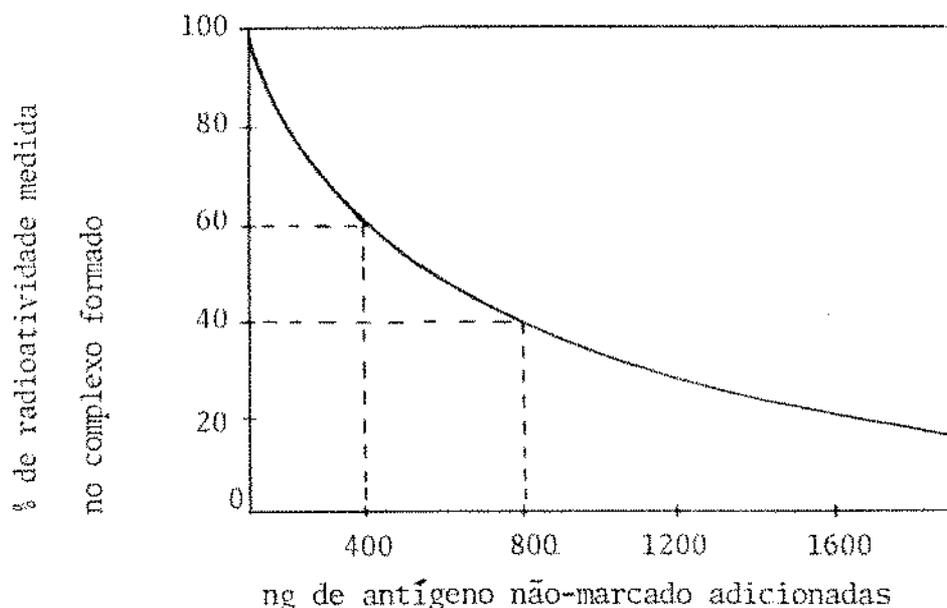


Figura 2.14 - Exemplo de Curva Padrão para Radioimunoensaio<sup>(5)</sup>

Como se vê na Figura 2.14, quando se coloca uma quantidade padrão de 400 ng de antígeno não-marcado, na solução padrão com anticorpos e antígeno marcado, a competição da proteína não-marcada pelos sítios de combinação dos anticorpos, resultou na manutenção de 60% da radioatividade em comparação com a referência. Quando 800 ng de antígeno não-marcado (proteína "fria") são colocados na mesma solução padrão, ocorre maior substituição do antígeno marcado nos anticorpos do complexo for

mado, resultando em 40% da radioatividade de referência.

Após a construção da curva padrão, para a medida da concentração de antígeno no soro de um paciente, coloca-se uma amostra do soro na mesma solução padrão de anticorpos e antígeno-marcado usada para construir a curva padrão. Após a reação dos componentes separa-se o complexo formado e se lê a sua radioatividade. Caso apenas 40% da radioatividade lida para a referência seja obtida, a quantidade de antígeno na amostra desconhecida será de 800 ng.

A etapa de separação do complexo antígeno-anticorpo formado, dos componentes que não reagiram, principalmente da proteína marcada, para posterior leitura da radioatividade é uma etapa muito importante. A separação deve ser rápida, simples, barata e completa para evitar introdução de erros no procedimento. Para facilitar a separação do complexo formado, Wide e Porath<sup>(6)</sup> em 1966 introduziram a utilização de imunosorventes, que são suportes insolúveis, normalmente poliméricos, onde antígenos ou anticorpos de interesse podem ser imobilizados por ligação covalente ou adsorção. Proteínas marcadas e não-marcadas presentes na solução em teste onde o imunosorvente é imerso, competirão pelos sítios de combinação da proteína do imunosorvente formando o complexo antígeno-anticorpo que ficará imobilizado no suporte insolúvel. Após a reação, o imunosorvente é facilmente separado, lavado para retirada de resíduos e a radioatividade pode ser lida diretamente no imunosorvente.

Wide e Porath<sup>(6)</sup>, na determinação quantitativa de antígenos, utilizaram antígenos marcados com  $^{125}\text{I}$  e anticorpos fi

xados covalentemente em celulose ou sephadex (gel de dextrana) em pó, separados depois da reação por centrifugação.

Uma série de outros suportes foram em seguida testados e usados como: tubos de polietileno, polipropileno e poliestireno, discos de teflon, nylon em pó, silicone, etc.<sup>(5)</sup>.

O Radioimunoensaio apresenta entretanto como desvantagens:

1. A utilização de reagentes caros e instáveis, impróprios para estocagem, que exigem pessoal qualificado para preparação;

2. Necessidade de aparelhagem sofisticada para contagem de radioatividade ;

3. Problemas de Segurança Pessoal no Trabalho, pelo manuseio de substâncias radioativas.

### 2.3.2. Teste Sorológico ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Teste Sorológico com Anticorpo Marcado com Enzima e Imunosorvente)

Os primeiros imunoensaios do Tipo ELISA foram relatados simultaneamente por Engvall e Perlmann<sup>(7)</sup> e Van Weemen e Bohman<sup>(8)</sup>, em 1971 e desde que foram desenvolvidos tornaram-se um dos testes sorológicos para diagnóstico laboratorial mais importantes.

A aplicação do Teste ELISA se estende ao diagnóstico de Infecções Bacterianas, tendo sido primeiramente aplicado neste campo para quantificação de anticorpos contra antígenos "O" de Salmonella, por Carlsson et al<sup>(12,13)</sup> em 1972 e 1975. O Teste ELISA se presta também ao diagnóstico de Doenças Para

sitárias tendo sido aplicado primeiramente na detecção de anticorpos contra Trichinella spiralis por Ljungstrom et al<sup>(14)</sup> e Ruitenberg et al<sup>(15)</sup> em 1974.

Em seguida várias outras parasitoses, foram e continuam a ser estudadas, incluindo a Doença de Chagas<sup>(16, 17)</sup>, a Toxoplasmose<sup>(16, 18)</sup>, a Malária<sup>(16)</sup>, a Esquistossomose<sup>(16)</sup>, a Leishmaniose<sup>(19)</sup> e outras.

A aplicação do Teste ELISA se estende também ao campo da virologia, sendo introduzido para o diagnóstico da Rubéola por Voller e Bidwell<sup>(20)</sup> em 1975, sendo depois aplicado à Hepatite B<sup>(21)</sup>, Herpes<sup>(21)</sup>, etc.

O Teste ELISA utiliza os mesmos princípios e metodologia das técnicas de Radioimunoensaio com Imunosorventes-Técnicas RIST, introduzidas por Wide e Porath<sup>(6)</sup>.

O Radioimunoensaio embora seja muito sensível e de simples execução, apresenta as desvantagens de requerer equipamento sofisticado para medida de radioatividade, empregar reagentes instáveis (radioisótopos, principalmente <sup>125</sup>I), cujo uso prolongado pode causar danos ao pessoal de laboratório<sup>(9)</sup>.

O Teste ELISA, entretanto, ao invés de isótopos radioativos utiliza enzimas ativas para marcar antígenos e anticorpos, através de uma reação de conjugação, produzindo os chamados conjugados enzimáticos: anticorpo-enzima (normalmente uma anti-imunoglobulina humana produzida em carneiro) ou antígeno-enzima.

Anticorpos marcados com enzimas já eram usados anteriormente, na detecção e localização de antígenos celulares em estudos de microscopia de luz e eletrônica, como descrito por

Nakane e Pierce<sup>(22)</sup> em 1966 e Avrameas e Uriel<sup>(23)</sup> em 1966, tendo sido sugeridos para imunoenaios quantitativos por Miles e Hales<sup>(24)</sup>, em 1968.

Estes conjugados anticorpo-enzima puderam substituir com vantagem os conjugados anticorpo-isótopo radioativo usados nos ensaios do tipo RIST, pois são mais estáveis, podendo ser estocados por longo tempo, sendo necessário para as leituras dos resultados dos testes um equipamento muito mais simples que um contador de radioatividade. Com um simples espectrofômetro na faixa do visível faz-se a leitura do resultado do teste, dada pela absorvância da solução final colorida, após a reação da enzima com seu substrato específico.

Como ficou depois demonstrado pelos primeiros TESTES ELISA desenvolvidos<sup>(7,8)</sup>, a sensibilidade e especificidade do Ensaio ELISA são comparáveis às do Radioensaio.

Os métodos ELISA que apresentam maior valor potencial, são aqueles que empregam anti-imunoglobulinas humanas marcadas com enzima.

Nestes testes antígenos são ligados a suportes sólidos, por exemplo tubos ou placas de poliestireno, formando o chamado Imunosorvente. Incuba-se então este imunosorvente com uma amostra do soro em teste e após a separação do imunosorvente e sua lavagem para retirada de componentes do soro que não reagiram, os anticorpos que se ligaram ao antígeno imobilizado no suporte sólido, são revelados por anti-imunoglobulinas marcadas com enzimas que reagem especificamente com os anticorpos, seguindo-se então uma reação da enzima com seu substrato. A mudança de coloração da solução de substrato será proporcional à

quantidade de anticorpos no soro em teste.

Anti-imunoglobulinas humanas são anticorpos produzidos em certos animais, especialmente o carneiro, sob o estímulo da inoculação das várias classes de imunoglobulinas humanas: IgG, IgM, etc., que no animal funcionarão como antígenos. As anti-imunoglobulinas humanas: anti-IgG, anti-IgM, etc. são específicas a cada classe de imunoglobulina humana, e podem ser produzidas e purificadas em quantidades razoáveis, sem grandes dificuldades.

Portanto, a eficiência do Teste ELISA depende da qualidade e adequação do suporte sólido que será utilizado na preparação do imunosorvente e da adequação da enzima escolhida tanto para a reação com o substrato, como para a reação de conjugação a que ela é submetida, na formação do conjugado anti-imunoglobulina-enzima.

A estabilidade e reatividade do conjugado anti-imunoglobulina-enzima são fundamentais para a reprodutibilidade e sensibilidade do Teste ELISA, portanto a revisão que será feita a seguir, a respeito da escolha da enzima, do método de conjugação desta enzima à anti-imunoglobulina e dos suportes usados para preparação de imunosorventes para Testes ELISA é relevante.

#### 2.3.2.1. A Escolha da Enzima para a Formação de Conjugados Anti-imunoglobulina-enzima que são usados em Testes ELISA<sup>(9)</sup>

Para poder ser usada na produção dos conjugados enzimáticos (imunoproteína-enzima), a enzima deve preencher os seguin

tes requisitos:

a. sua determinação deve ser feita através de espectrofotometria, isto é, sua reação com um substrato adequado deve resultar em desenvolvimento de cor;

b. deve ser detectável em pequenas quantidades;

c. deve ser estável;

d. deve ser disponível comercialmente na forma purificada;

e. não deve ser abundante nos materiais biológicos a ser ensaiados, que também não devem conter inibidores à enzima.

Duas enzimas que atendem a estas qualificações se tornaram mais populares: fosfatase alcalina e a peroxidase.

A fosfatase alcalina apresenta o inconveniente de que certos soros contaminados contêm bactérias, que produzem fosfatase alcalina dando leituras positivas falsas.

A peroxidase é extraída de uma raiz e coexiste na forma de 5 ou 6 isoenzimas, todas com peso molecular 40000, com cerca de 300 resíduos de aminoácidos e 18% de carboidrato<sup>(29)</sup>.

A peroxidase é a enzima mais usada. É mais barata e fácil de se obter em grande quantidade, embora seu substrato seja instável (Água Oxigenada) e a determinação da enzima se dê através de uma reação redox de múltipla etapa.

#### 2.3.2.2. Revisão dos Métodos Utilizados para Preparação de Conjugados Enzimáticos (antiimunoglobulina-enzima) para Uso em Testes ELISA

Quando uma enzima é ligada a um anticorpo ou antígeno,

tanto a atividade da enzima como da imunoproteína deve ser mantida. A perda durante o procedimento de conjugação da atividade da enzima, bem como da capacidade do anticorpo de reagir com seu antígeno e vice-versa, resultará numa imunoproteína marcada com enzima, se comportando como se nenhum antígeno ou anticorpo estivesse presente, resultando em uma falsa leitura negativa<sup>(25)</sup>.

As imunoproteínas usadas para marcação com enzima devem ser purificadas, para evitar as reações cruzadas.

Nakane e Pierce<sup>(22)</sup> usaram 1-etil-5-(3-dimetil amino-propil) carbodiimida, para ligar fosfatase alcalina ao anticorpo.

Para conjugação de peroxidase a anticorpos se utilizou inicialmente agentes bifuncionais<sup>(22, 23, 26, 27)</sup>, mas devido à maioria dos grupos  $\alpha$  e  $\epsilon$  - amino e algumas hidroxilas da peroxidase comercial serem bloqueadas durante a sua extração e purificação, por um composto chamado aloisotiocianato, a eficiência da reação de conjugação era muito baixa, produzindo-se mais polímeros de anticorpos, que conjugado anticorpo-peroxidase.

Nakane e Kawaoi<sup>(28)</sup> em 1974, desenvolveram um novo método que é hoje o mais aplicado.

A porção de carboidrato da molécula de peroxidase (18%) é oxidada por metaperiodato de sódio, obtendo-se grupos aldeído (peroxidase-aldeído) sem perda significativa da atividade enzimática. Bloqueia-se completamente os grupos  $\alpha$  e  $\epsilon$  - amino e hidroxilas da peroxidase com fluorodinitrobenzeno, para evitar a formação de polímeros de peroxidase. A peroxidase-aldeído rea-

ge então com qualquer proteína que tenha grupos  $\alpha$  e  $\epsilon$  - amino, com grande eficiência (99%) . Usa-se boroidreto de sódio para estabilizar a ligação formada, tornando-a covalente.

O conjugado considerado ótimo para Teste ELISA tem 2 moles de peroxidase/mol de anticorpo. Não há perda significativa das atividades imunológica do anticorpo e enzimática da peroxidase (o carboidrato não está envolvido nesta atividade).

### 2.3.2.3. Revisão dos Imunosorventes Utilizados em Teste ELISA. Caracterização do Imunosorvente Ideal

O Imunosorvente utilizado em Testes ELISA e Radioimunoensaios constitui-se de uma fase insolúvel, denominada Suporte, Matriz ou Carreador, em cuja superfície são imobilizadas proteínas (antígenos, anticorpos ou componentes destes) que na rotina do teste reagirão com outras proteínas específicas presentes no soro que se pesquisa. Muitas vezes este suporte com proteínas imobilizadas é chamado de Imunoadsorvente, pois a reação a que ele se presta, ou seja, a captação de proteínas no soro em teste por outras proteínas específicas nele fixadas, se dá por Adsorção Física .

O uso da Imunosorventes é extremamente vantajoso porque permite a separação das moléculas que não reagiram das que estão nele fixadas, apenas pela retirada da fase sólida da solução em que estava imersa, com posterior lavagem de resíduos. Evita-se desta maneira métodos de separação muito mais difíceis, ineficientes e passíveis de erro, como a imunoprecipitação.

O Imunosorvente ideal para Testes ELISA deve apresen

tar certas características<sup>(9)</sup> ; a) ser altamente insolúvel; b) ligar toda proteína específica, impedindo a adsorção inespecífica de outras proteínas; c) ser estável em relação ao tempo (pelo menos durante a realização do teste, a proteína deve permanecer ligada); d) ser de fácil preparo e manipulação; e) ser de fácil separação e lavagem; f) deve possibilitar a automatização do método.

Para uso em Testes Imunoenzimáticos do tipo ELISA vários tipos de Imunosorventes e Suportes que os constituem, têm sido relatados.

Engvall e Perlmann<sup>(7,29,30)</sup> em 1971, utilizaram tubos ocos de Nylon recobertos com antígenos e anticorpos e celulose ativada com brometo de cianogênio, ligada covalentemente a anticorpos.

Em 1975, Voller et al<sup>(21)</sup> introduziram as superfícies de poliestireno no formato de placas de microtitulação, onde antígenos e anticorpos são imobilizados por adsorção.

Em 1977, Kato et al<sup>(31)</sup> descreveram a utilização de tubos ocos de silicone na preparação de imunosorventes, pela ligação de anticorpos por adsorção.

Em 1980, Marcipar et al<sup>(32)</sup> descreveram a utilização de fitas da poliamida Nylon 6,6, em que antígeno de Doença de Chagas é ligado covalentemente através de uma reação a 4 componentes.

Também em 1980, Hendry e Herrmann<sup>(33)</sup> relataram a utilização da poliamida Nylon no formato de pérolas e pó, na preparação de imunosorventes em que anticorpos são ligados covalentemente à superfície do Nylon após uma hidrólise parcial ácida,

através de glutaraldeído ou carbodiimida.

O suporte atualmente mais utilizado na preparação de Imunosorventes para uso em Testes ELISA, são superfícies de poliestireno no formato de placas de microtitulação com cavidades, introduzidas por Voller et al<sup>(21)</sup>. Estas placas são as mesmas utilizadas para outros Testes Sorológicos Clássicos (Figura 2.9).

A ligação de proteínas, glicoproteínas, lipossacarídeos, etc., às superfícies plásticas se dá por simples adsorção, à custa de forças hidrofóbicas e depende da difusão das moléculas na solução, da área disponível para adsorção, do volume e concentração da solução, do tempo de contato, da temperatura e do pH do meio reacional<sup>(9)</sup>.

Então, a adsorção de proteínas em superfícies plásticas traz como desvantagem a não covalência da reação, que faz com que as moléculas desprendam-se mesmo durante o ensaio, diminuindo a sua precisão, afetando a sensibilidade, além de oferecer uma capacidade limitada de adsorção<sup>(9)</sup>.

O uso destas placas de poliestireno em contrapartida, proporciona grande facilidade de separação de fases após a reação, bem como uma automação cada vez maior pelo desenvolvimento de instrumentos sofisticados e sensíveis especialmente projetados, como espectrofotômetros desenvolvidos para leitura de absorvância diretamente nas cavidades das placas, acoplados a microprocessadores programados para interpretar os resultados e imprimi-los diretamente.

O suporte escolhido para compor o imunosorvente afeta profundamente o resultado do Teste ELISA, sendo responsável mu

tas vezes pela inconsistência dos resultados obtidos.

Os suportes são obtidos geralmente de fontes comerciais e ocorrem variações na quantidade de anticorpos ou antígenos ligada como 1<sup>a</sup> camada entre uma cavidade e outra da mesma placa, e de diferentes lotes de placas. As fontes comerciais de suportes têm procurado implementar essa consistência, para aumentar a confiabilidade e apresentam às vezes, vários tipos de placas preparadas por processos ou tratamentos diferentes. Escolhe-se a placa mais adequada a cada tipo de aplicação através de testes empíricos.

Encontram-se também bastante difundidos, "Kits" de análise para Testes ELISA, como os comercializados pela ABBOTT Laboratories (USA) (34 , 35) para a identificação da Rubéola : Rubazyme-M<sup>®</sup> (para IgM) e Rubazyme<sup>®</sup> (para IgG), em que pérolas de poliacrilamida revestidas com diferentes antígenos, são fornecidas juntamente com todos reagentes necessários ao teste , incluindo conjugados enzimáticos, soros de controle, solução cromôgena, sendo muitas vezes acompanhados de aparelhos especiais (espectrofotômetros) programados para leitura e interpretação direta de resultados.

#### 2.3.2.4. Revisão dos Métodos Utilizados para Determinação de Anticorpos e Antígenos em Amostras e Soros Desconhecidos Usando Teste ELISA<sup>(9)</sup>;

A determinação de anticorpos em soros desconhecidos é feita através de um teste direto (Figura 2.15).

Um imunosorvente com antígeno fixado é incubado com o soro cuja concentração de anticorpos contra aquele antígeno

se deseja pesquisar.

Após a incubação o imunosorvente é separado do soro e lavado. A quantidade de anticorpos do soro que se liga ao imunosorvente é quantificada incubando-o novamente com uma solução de anti-imunoglobulina marcada com enzima, que tem reação específica com o anticorpo retirado do soro.

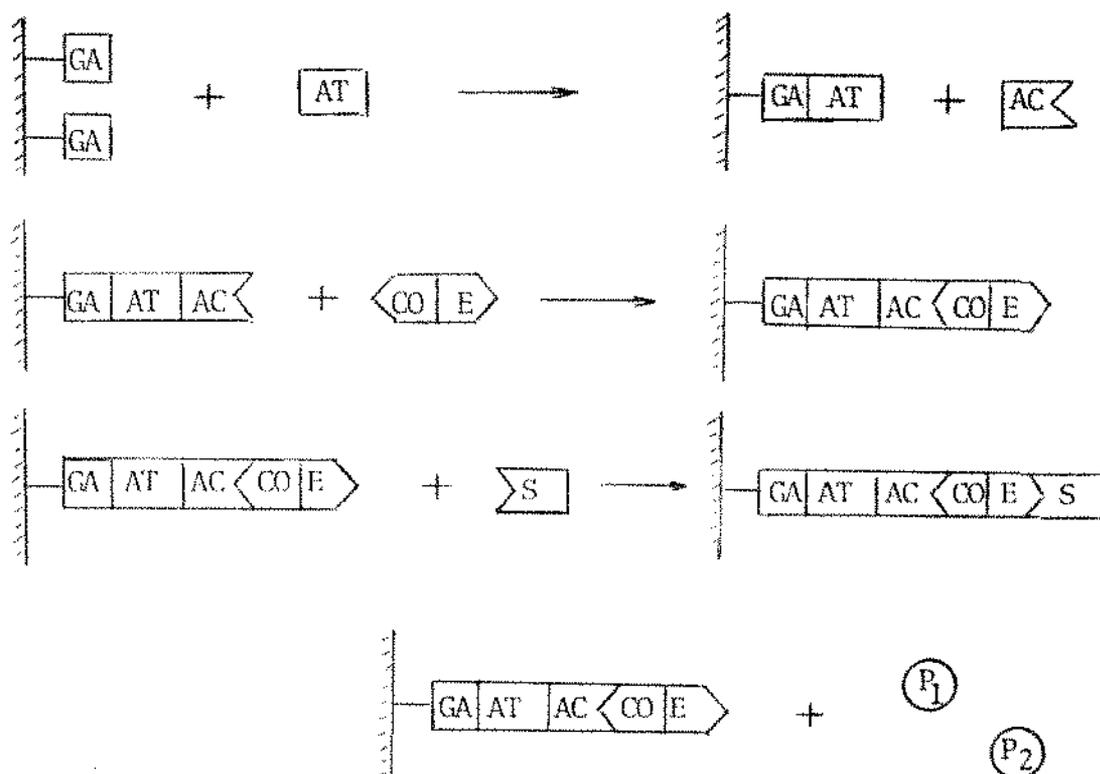
O complexo formado é mais uma vez separado e lavado. Segue-se então uma nova incubação com uma solução de substrato (solução cromógena) adequada à enzima presente no complexo, cuja ação sobre o substrato provocará o desenvolvimento de uma coloração proporcional à quantidade de enzima fixada e portanto ao conteúdo de anticorpos no soro. A leitura da coloração é feita como absorvância em espectrofotômetros simples.

O Teste ELISA para determinação de anticorpos dá apenas valores relativos das concentrações de anticorpos.

Utilizando-se conjugados enzimáticos específicos para cada classe de imunoglobulina: anti-IgG, anti-IgM, etc., anticorpos de cada uma das classes presentes no soro podem ser identificados e/ou quantificados independentemente.

A técnica mais usada para identificação de Antígenos em Testes ELISA é a indireta ou técnica do Sanduíche.

Anticorpo específico contra o antígeno que se deseja pesquisar imobilizado em um imunosorvente é incubado com soro ou amostra desconhecida. Se antígeno está presente ele fica retido pelo anticorpo imobilizado formando uma 2<sup>a</sup> camada. Após a separação e lavagem, pode-se incubar o complexo formado com o anticorpo idêntico ao usado para primeira camada, só que marcado com enzima.



[GA] - grupo ativo do suporte; [AT] - antígeno; [AC] - anticorpo ;  
 [CO] E - conjugado enzimático; S - substrato; (P<sub>1</sub>), (P<sub>2</sub>) - produtos

Figura 2.15 - Teste ELISA para determinação de anticorpos <sup>(36)</sup>

Após nova separação e lavagem, em presença de substrato adequado a enzima reage e a mudança de cor é medida (Figura 2.16).

Pode-se também formar uma terceira camada com um outro tipo de anticorpo contra o antígeno, produzido em uma espécie animal diferente da que produziu o anticorpo da primeira camada, mas sem marcação.

Esta etapa é seguida pela incubação com uma solução de anti-imunoglobulina marcada com enzima, produzida contra o anticorpo da 3<sup>a</sup> camada com o qual reage.

Segue-se então a revelação da reação pelo desenvolvimento de cor, na presença de substrato adequado. Esta técnica é chamada de Sanduíche Duplo (Figura 2.17). Este método é mais sensível.

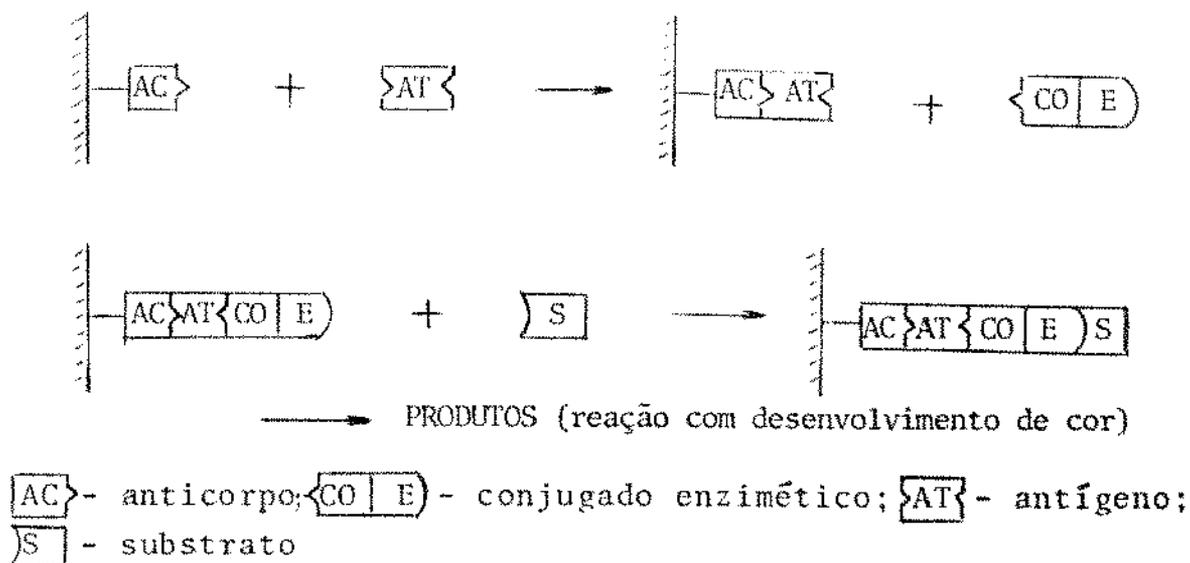


Figura 2.16 - Teste ELISA para determinação de antígenos - técnica do Sanduíche.

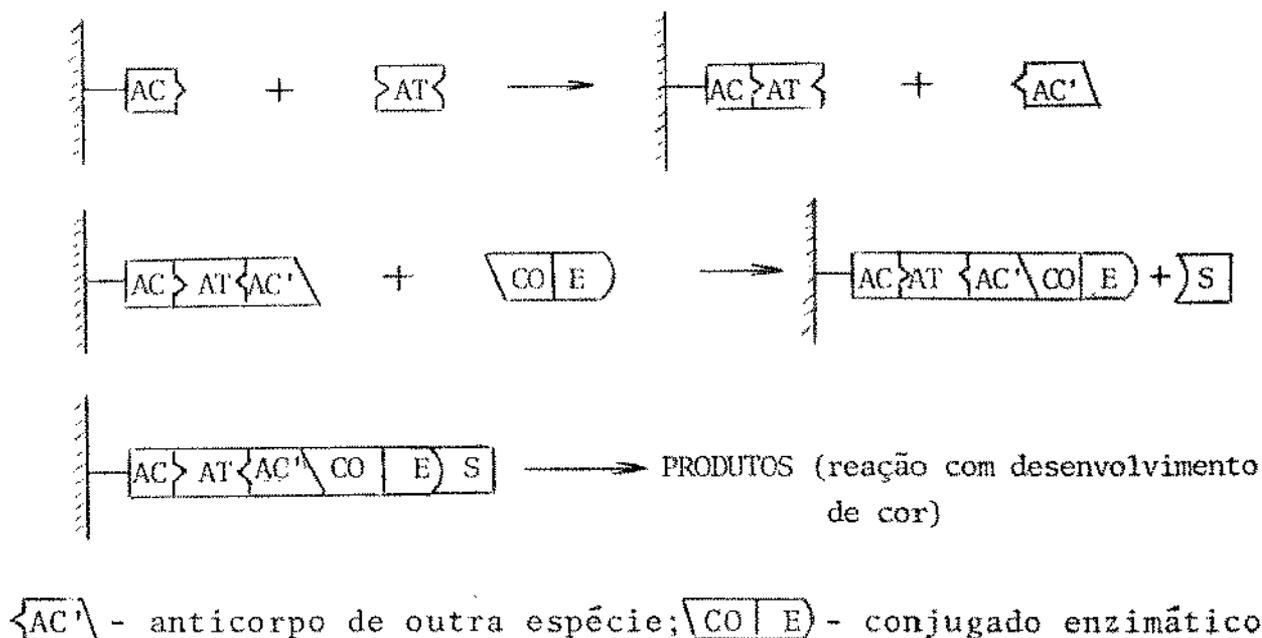


Figura 2.17 - Teste ELISA para determinação de antígenos - técnica do Sanduíche Duplo.

### 2.3.2.5. Sensibilidade e Reprodutibilidade do Teste ELISA

A sensibilidade do Teste ELISA é comparável à do radioimunoensaio : picogramas ( $10^{-9}$ g) de proteína/ml.

A reprodutibilidade é boa, apresentando variação intra-ensaios de 15% e baixa variação inter-ensaios realizados durante longo período de tempo<sup>(9)</sup>.

Um dos mais sérios problemas do Teste ELISA é o grande número de variáveis que o afetam. Naturalmente um grande número de controles: um soro com alto título positivo e um "pool" representativo de soros normais, devem ser ensaiados a cada experimento para assegurar a validade dos resultados. Todos os reagentes componentes do teste devem ser cuidadosamente titulados e testados a cada vez que o ensaio é feito. Adicionalmente o teste é afetado significativamente pela temperatura, umidade, tempos de reação, pH dos reagentes, tempos de lavagem e como já foi dito pelo suporte usado.

Para o Teste ELISA ser quantitativo e não depender de um "ponto final" de titulação, como ocorre com os testes sorol<sup>ó</sup>gicos clássicos em que uma série de diluições do soro é necesária para a identificação do seu título, isto é, permitir a quantificação do anticorpo no soro testando-se apenas uma diluição, o imunosorvente deve ligar covalentemente uma quantida de suficiente de antígenos na 1<sup>a</sup> camada, de modo a garantir um grande espectro de reatividade e a não liberação da proteína no decorrer do Teste.

Nos últimos anos o Teste ELISA tem sofrido inúmeras modificações e novas aplicações têm aparecido com frequências cada vez maiores.

cia<sup>(9 , 21 , 16 , 17)</sup>, tornando-o uma boa alternativa ou mesmo o substituto para os demais Testes Sorológicos Clássicos e o Radiomunoensaio. O futuro parece promissor para a aplicação do ELISA em inúmeros sistemas de diagnóstico laboratorial, pois o Teste é altamente adaptável a muitas situações especiais de diagnóstico ou de pesquisa, como ocorreu recentemente com o vírus da AIDS.

A grande melhoria a ser introduzida no Teste ELISA refere-se certamente ao desenvolvimento de suportes capazes de ligar covalentemente proteínas e que confirmam ao imunosorvente produzidas propriedades de fácil separação, alta capacidade e boa reprodutibilidade quanto à quantidade de proteína ligada, fácil manuseio, possibilidade de estocagem e que permita a automação do teste.

#### 2.4. Revisão dos Tipos de Suporte e Métodos de Preparação Utilizados na Obtenção de Imunosorventes

Os suportes normalmente usados para preparação de imunosorventes são materiais insolúveis em água, inertes, poliméricos ou inorgânicos, utilizados nos mais variados formatos como : pós, fibras, esferas, tecidos, fragmentos, etc. Na superfície destes suportes se fixam covalentemente ou por adsorção, as proteínas para obtenção dos imunosorventes.

Imunosorventes têm sido usados não apenas em Testes Imunoenzimáticos ou Radioimunoensaíais, mas principalmente no isolamento e purificação de anticorpos, antígenos e substâncias afins, onde a técnica que se usa é simples e está baseada

na insolubilização de anticorpos ou antígenos em suportes adequados para serem empacotados em colunas, por onde escoam soluções de misturas de proteínas, uma das quais específica à proteína ligada no suporte, se deseja separar e purificar (37, 38).

Após a adsorção da proteína de interesse pelo imunosorvente, circula-se pela coluna uma solução eluente capaz de desestabilizar a adsorção e provocar a liberação da proteína de interesse (Figura 2.18).

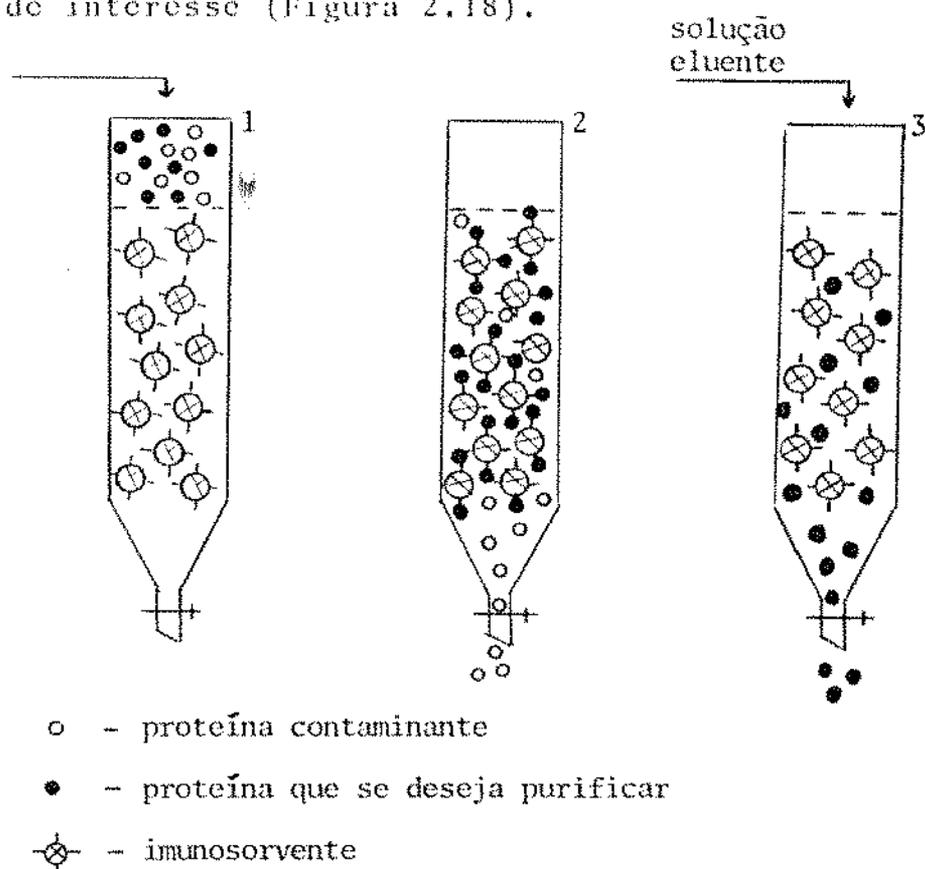


Figura 2.18 - Purificação de Misturas de Proteínas com Imunosorventes (37). 1-Colocação da Mistura de Proteínas na Coluna; 2-Retenção da Proteína de Interesse no Imunosorvente; 3-Eluição da Proteína de interesse

Em geral, na preparação de Imunosorventes três méto-

dos básicos para imobilização de proteínas são usados<sup>(37, 38)</sup> ;

a. Polimerização direta: É método menos usado. São formados polímeros de proteína insolúveis em água, pela ação de agentes reticuladores como o cloroformato de etila e principalmente o glutaraldeído<sup>(39)</sup>. Podem também ser imobilizadas dentro de géis e microcápsulas, desde que os poros sejam suficientemente grandes para dar acesso às proteínas que se deseja separar<sup>(37)</sup> (Figura 2.19.a).

b. Adsorção Física: dá-se por interações eletrostáticas entre a superfície do suporte e a proteína. Exemplos: poliacrilamida, poliestireno, bentonita, agarose, pérolas de vidro, látex, silicone, etc. (Figura 2.19.b).

c. Ligação Covalente: dá-se através da reação de grupos funcionais do suporte, originalmente presentes ou artificialmente introduzidos por tratamento denominado "ativação" e grupos funcionais das proteínas, principalmente os grupos amino, hidroxila e grupos - SH, (Figura 2.19.c).

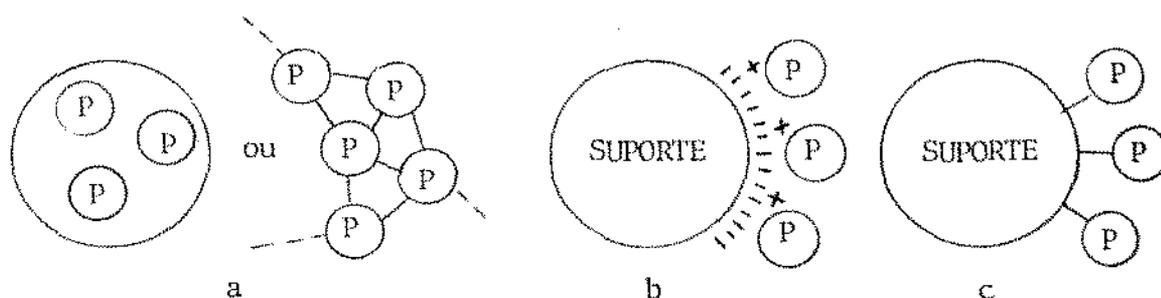


Figura 2.19 - Métodos de Preparação de Imunosorventes . a) inclusão em gel ou formação de polímero de proteína; b) ligação da proteína por adsorção; c) ligação covalente da proteína.

Quando uma proteína é covalentemente ligada a um suporte insolúvel, duas técnicas podem ser empregadas: uma é ativar a superfície do suporte, normalmente através de reações com determinados compostos químicos (por exemplo, oxidação ou hidrôlise) que geram grupos funcionais reativos, capazes de reagir diretamente com grupos funcionais de proteínas, ou então com outras substâncias intermediárias (geralmente compostos bifuncionais), que por sua vez reagem com as proteínas.

Outra técnica é reagir grupos funcionais já naturalmente existentes na superfície do suporte com determinados compostos químicos, sempre com funcionalidade 2 ou maior, que então reagem com as proteínas (diretamente, ou ainda com auxílio de outras substâncias intermediárias).

Estas substâncias intermediárias costumam também atuar como espaçadores entre o suporte e o sítio ativo da molécula de proteína imobilizada, a fim de torná-lo mais efetivo, permitindo a aproximação mais fácil das macromoléculas com as quais tem reação específica.

Uma terceira possibilidade seria ativar a molécula de proteína para se fixar ao suporte, como foi discutido por Srere e Uyeda<sup>(40)</sup> em 1976. Estas modificações devem ser feitas entretanto com muito cuidado, pois a proteína necessita manter a sua conformação ativa após a sua conjugação ao suporte. A configuração espacial de uma proteína é mantida por um conjunto de forças, fracas cada uma por si e por isso via de regra não se pode trabalhar a temperaturas maiores de 35°C e com soluções cuja acidez ou alcalinidade ultrapassem os limites de 3 e 4 e 9 e 10, respectivamente.

A primeira técnica utilizando imunosorvente foi descrita por Campbell et al, em 1951<sup>(41)</sup> e mais tarde melhorada por Gurvich et al, em 1961<sup>(42)</sup>. Eles utilizaram celulose tratada com a p-aminobenzila, a qual depois de sofrer a diazotação com ácido nitroso, forma um sal diazônico que reage extremamente bem com resíduos de lisina, tirosina e histidina de proteínas, formando as azoproteínas.

Em 1958, Sutherland e Campbell<sup>(43)</sup> relataram a adsorção de imunoproteínas em pérolas de vidro.

Jangerdorff et al em 1963<sup>(44)</sup> e Weetall e Weliky<sup>(45)</sup>, em 1965, trabalhando com adsorção em celulose e bromoacetilcelulose foram os primeiros a explorar o fato de que imunosorventes preparados com anticorpos podiam ligar antígenos reversivelmente, com possibilidade de reutilização.

Axén et al<sup>(46)</sup> e Porath et al<sup>(47)</sup>, em 1967, desenvolveram um método geral para acoplamento de proteínas a polissacarídeos insolúveis como a Sepharose (Agarose) e a Sephadex (gel de dextrana). O método é baseado no tratamento de pérolas de Agarose ou Sephadex usualmente com brometo de cianogênio, que reage com os grupos hidroxila do suporte convertendo-os em um derivado imidocarbonato, que reage então covalentemente com grupos amínicos livres de proteínas (Figura 2.20).

Como suportes insolúveis em água foram também utilizados:

- gel de acrilamida por Cuatrecasas<sup>(49)</sup>, em 1977 (por adsorção);

- bentonita por Carpenter e Reesberg<sup>(50)</sup>, em 1968, ativada com carbodiimida (ligação covalente);

- tubos ocos de silicone por Kato et al<sup>(31)</sup>, em 1977 ,  
por adsorção.

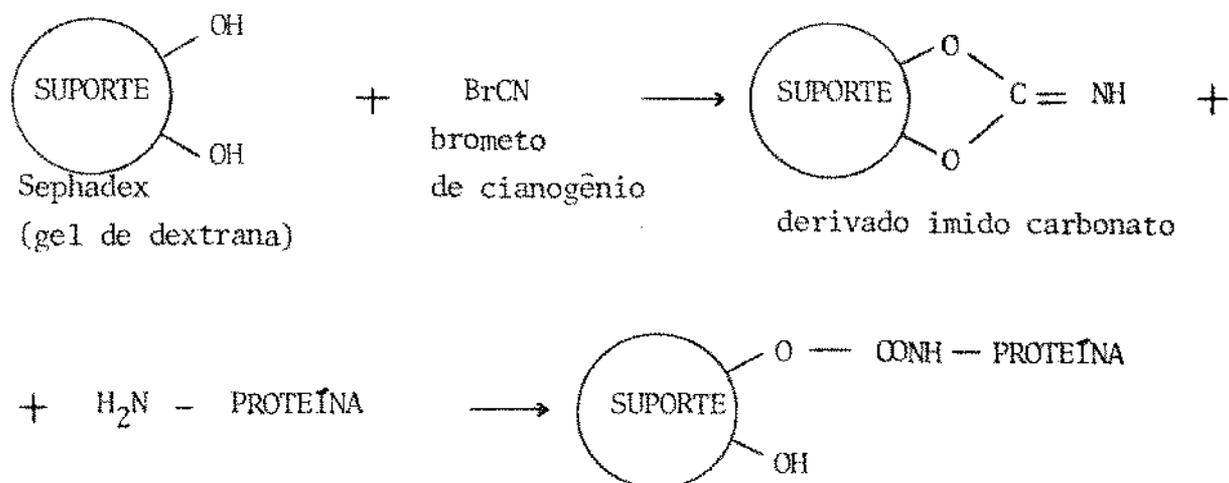


Figura 2.20 - Método de Preparação de Imunosorvente por Ligação Covalente, utilizando Sephadex (gel de dextrana) e Brometo de Cianogênio<sup>(37)</sup>

As superfícies de poliestireno na forma de placas de microtitulação introduzidas por Voller et al<sup>(20, 51)</sup>, em 1974 e na forma de tubos de ensaio<sup>(9)</sup>, são os suportes mais usados em Testes ELISA. A ligação da proteína na placa se dá por simples adsorção, apresentando como limitações a quantidade de proteína ligada ao plástico e o problema da eluição do que é adsorvido, durante o processo do imunoensaio, diminuindo a sensibilidade e reprodutibilidade do Teste.

A suportes que possuam grupos carboxílicos livres à superfície, como copolímeros acrílicos, pode-se ligar proteínas através de carbodiimidas que reagem com as carboxilas do supor

te, formando derivados O-acilisourêia reativos, que se combinam com grupos amínicos ou hidroxílicos da proteína, para formar amidas ou ésteres<sup>(37)</sup> (Figura 2.21 ).

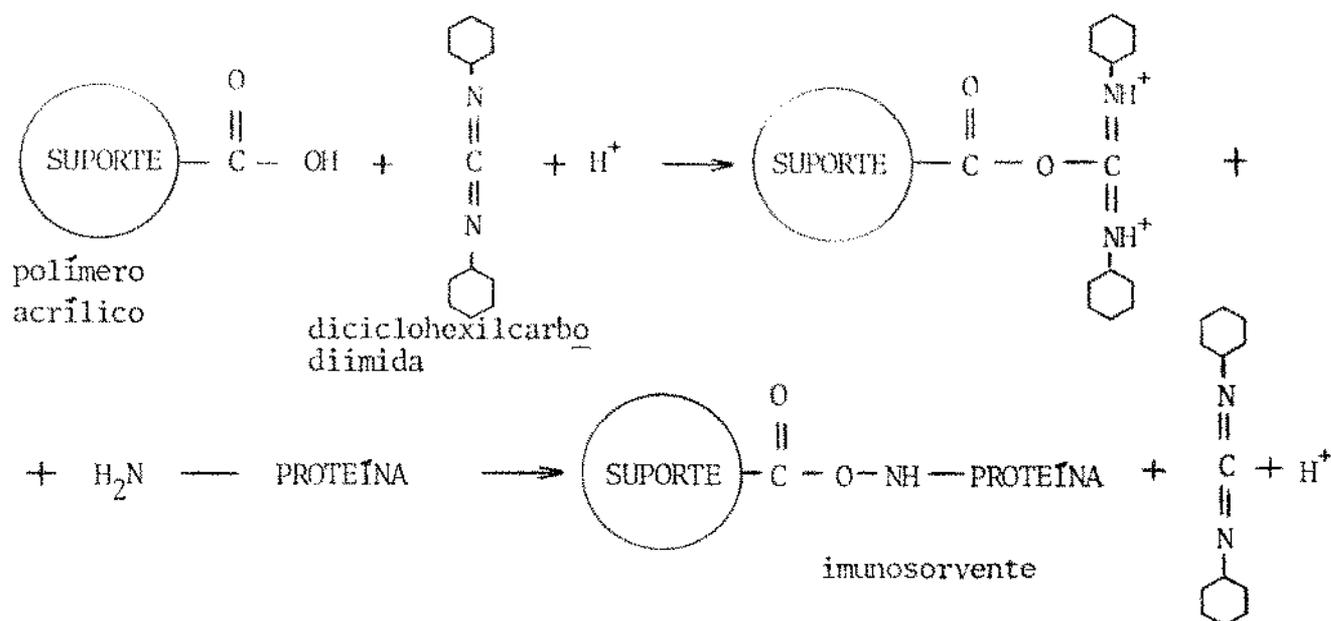


Figura 2.21 - Preparação de Imunossorvente com Polímero Acrílico e Carbodiimida através de Ligação Covalente<sup>(37)</sup>

Se o suporte contém aminas ou grupos amino-substituídos, então pode-se ligar a proteína através de um grupo carboxílico diretamente ao suporte na presença de carbodiimidas.

Ternyck e Avrameas<sup>(52)</sup>, em 1972, apresentaram um imunossorvente composto por pérolas de gel de poliacrilamida ativadas por glutaraldeído.

Wilson e Nakane<sup>(53)</sup>, em 1976, ligaram covalentemente proteínas a Sephadex (gel de dextrana), oxidada com metaperiodato de sódio ( $\text{NaHIO}_4$ ), com bons resultados.

Muitos destes suportes descritos mostraram-se bons, entretanto surgiram problemas como a adsorção inespecífica de

proteínas ao suporte e a baixa atividade específica (conseguiu-se ligar pequena quantidade de proteína, dando pouca confiabilidade ao teste). Outros problemas são alto custo e rígido controle da reação.

Nos últimos anos, muitos trabalhos foram publicados<sup>(54)</sup> sobre a utilização da poliamida Nylon 6,6 para imobilização de enzimas.

Vários autores como Engvall e Perlmann<sup>(28, 29)</sup> em 1971; Marcipar et al<sup>(32)</sup> em 1979 e Hendry e Herrmann<sup>(33)</sup> em 1980, adaptaram estes métodos desenvolvidos para enzimas, na preparação de imunosorventes para testes imunoenzimáticos ELISA, através da ligação covalente de proteínas ao Nylon 6,6, utilizado nas mais variadas formas como: fitas, pérolas, tubos ocos ou pós.

O Nylon 6,6 é uma poliamida sintética de elevado peso molecular que apresenta poucos grupos terminais livres, necessitando ser pré-tratado a fim de se gerar centros reativos capazes de reagir covalentemente com moléculas de proteína.

Os seguintes procedimentos podem ser adotados para efetuar esta "ativação" do Nylon:

1. Quebra da ligação Peptídica do Nylon<sup>(54)</sup>: 
$$- \underset{\text{O}}{\underset{||}{\text{C}}} - \overset{\text{H}}{\overset{|}{\text{N}}} -$$

O processo completo envolve 3 etapas:

a. Despolimerização parcial do Nylon, pela quebra de algumas das ligações peptídicas, geralmente através de uma hidrólise ácida parcial, resultando em grupos amino e carboxílicos livres.

b. Estes grupos reativos livres podem ser reagidos com diversas substâncias<sup>(55 , 56 , 57)</sup>, geralmente agentes bifuncionais, que permitem que a proteína se ligue ao Nylon.

Um dos métodos mais usados<sup>(33 , 54 , 57 , 58)</sup> é reagir o grupo aminoalifático com glutaraldeído, que é um dialdeído que reage muito bem com grupos  $\epsilon$ -amino, especialmente do resíduo de aminoácido lisina (Figura 2.22).

c. A proteína é reagida covalentemente com o Nylon "ativado".

A desvantagem deste método é a diminuição da resistência mecânica do suporte e a existência de resíduos de carboxilas ionizadas na superfície do suporte, já que a proteína se liga através dos grupos amino livres. Para evitar esta 2ª inconveniência, a quebra de ligações peptídicas pode ser feita através de N,N-dimetil - 1,3-propanodiamina, em condições não aquosas como descrito por Hornby et al<sup>(59)</sup>, o qual também bloqueia as carboxilas livres (Figura 2.22).

Um método simples envolvendo Nylon 6,6 e agentes bifuncionais foi descrito por Hendry e Herrmann<sup>(33)</sup>, em 1980, em que anticorpos foram fixados covalentemente a pérolas e pó de Nylon, submetidos à hidrólise parcial e ativados por glutaraldeído ou carbodiimida.

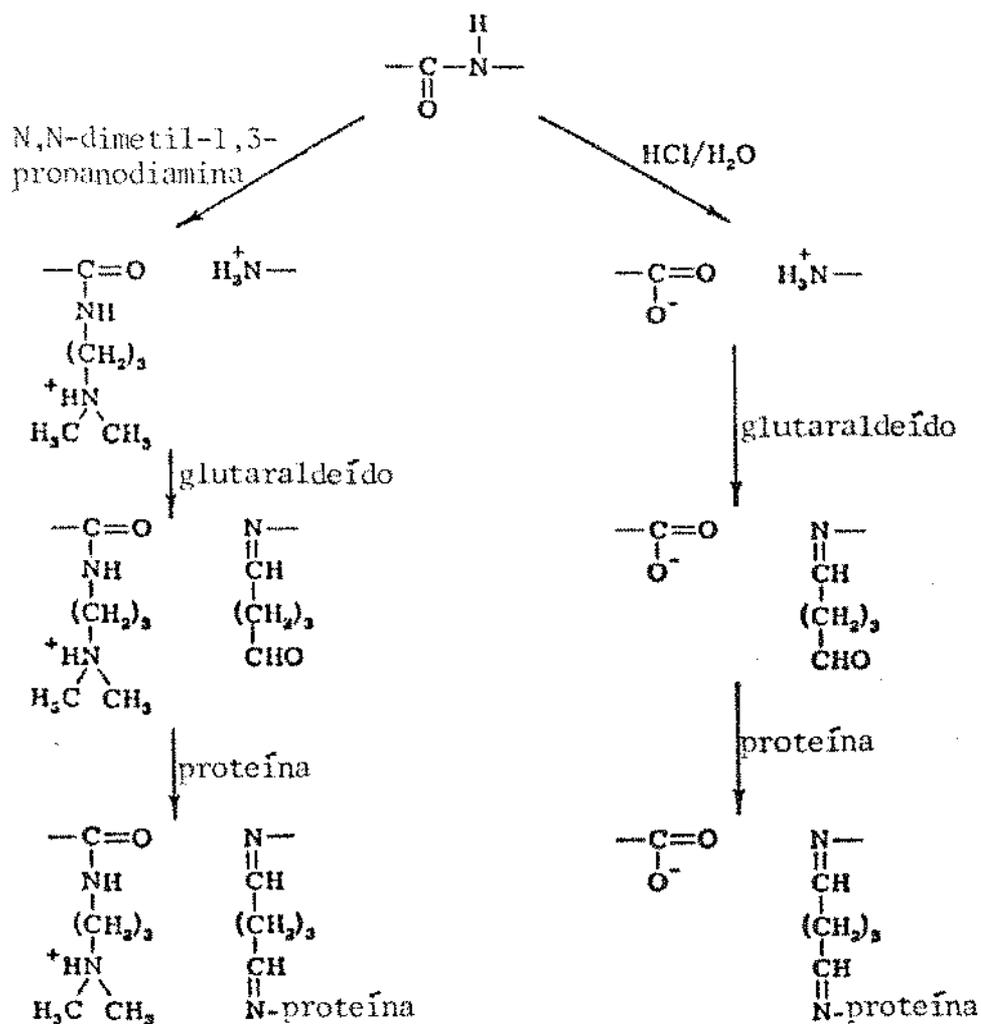


Figura 2.22 - Ligação Covalente de Proteínas ao Nylon 6,6, através de métodos envolvendo a quebra de ligações peptídicas<sup>(54)</sup>.

## 2. O-alkilação do Nylon<sup>(54)</sup>:

Pode-se gerar centros ativos na superfície do nylon sem debilitar o suporte com quebra de ligações, através da alquilação do oxigênio de algumas ligações peptídicas.

A O-alkilação é realizada preferencialmente por sais de trietiloxonium como o tetrafluorborato de trietiloxonium :  $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{O}^+ \text{BF}_4^-$  <sup>(58)</sup>, produzindo sais imidatos que são interme-

diários versáteis, permitindo a ligação covalente da proteína por várias rotas.

### 3. N-alquilação do Nylon<sup>(54)</sup> :

Cadeias laterais quimicamente reativas são introduzidas no Nylon, pela N-alquilação de algumas ligações peptídicas da cadeia do polímero, através das seguintes etapas:

a. Hidrólise ácida suave das ligações peptídicas :

-  $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{C} - \text{N} \\ || \\ \text{O} \end{array}$  - para gerar pares de grupos reativos -  $\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{C} - \text{OH} \end{array}$  e  $\text{NH}_2$ , na superfície.

b. Reação de condensação a 4 componentes (4CC) entre os pares de grupos vizinhos reativos do Nylon, um aldeído e um isocianeto, recuperando-se a integridade do suporte e deixando pendurado um grupo reativo (cadeia lateral). (Figura 2.23)

Liga-se então a proteína ao Nylon poliisonitrila obtido, através do grupo NC do polímero, novamente através de uma reação de condensação de 4 componentes. Proteínas se ligam ao suporte através de seus grupos amino, na presença de acetaldeído e acetato e através de suas carboxilas em presença de acetaldeído e uma amina.

Este foi o método utilizado por Marcipar et al<sup>(32)</sup> para imobilizar antígenos de Trypanosoma cruzi, em tiras de Nylon 6,6 de  $1 \text{ cm}^2$ , com bons resultados em Testes ELISA.

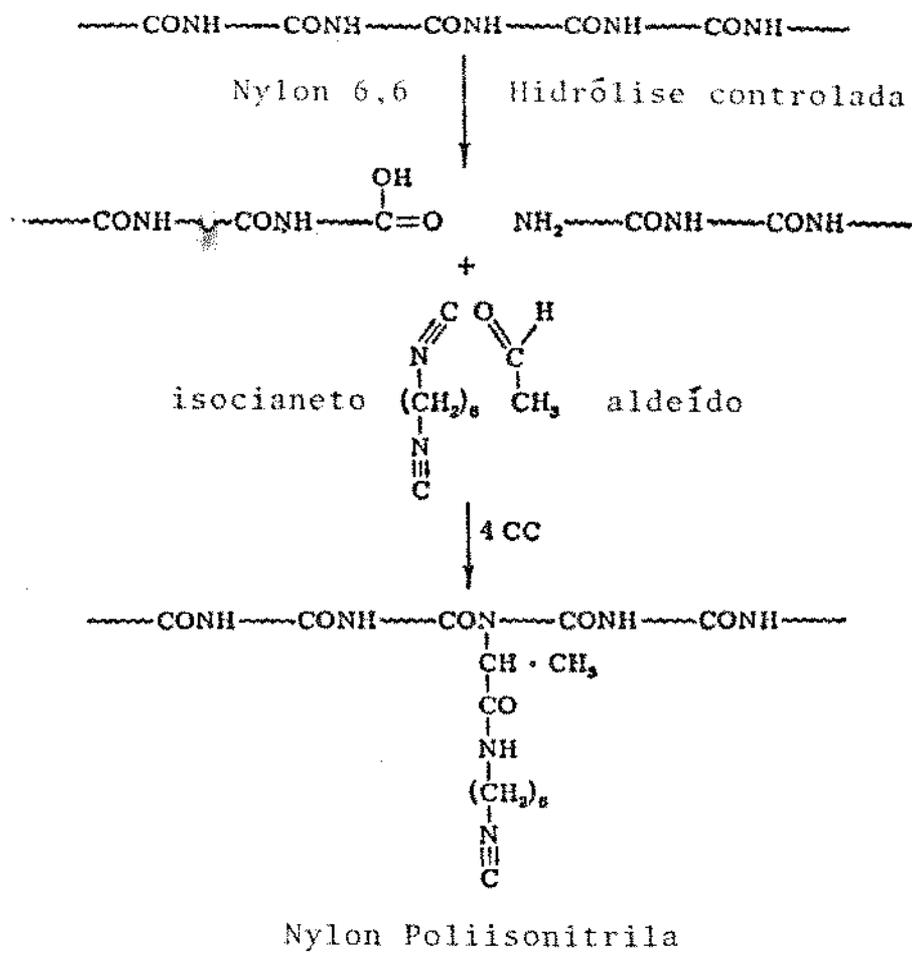


Figura 2.23 - N-alkilação da cadeia do Nylon, para gerar centros reativos ( $\text{N} \cong \text{C}$ ) para ligação de proteínas<sup>(54)</sup>

## 2.5. Materiais Usados na Preparação dos Suportes Estudados neste Trabalho

Observando-se os métodos de preparação de Imunosorventes descritos na literatura<sup>(46,47,32,53)</sup>, verifica-se que a ligação covalente de uma proteína ao suporte, dá-se através de um grupo funcional característico da proteína e um grupo funcional reativo presente na superfície do suporte, normalmente gerado através de um pré-tratamento específico.

Na maioria das vezes devido à baixa reatividade entre estes 2 grupos funcionais, utiliza-se um intermediário de reação, frequentemente o glutaraldeído<sup>(33,52,54)</sup>, que reage com o grupo funcional do suporte através de uma de suas 2 funções aldeído e com o grupo funcional da proteína com a outra. O glutaraldeído funciona também como um agente espaçador, distanciando a molécula ligada da superfície do suporte, amenizando do problemas estéricos.

Baseado neste mecanismo de ligação, imaginou-se que haveria viabilidade para um novo suporte, para preparação de Imunosorventes a serem usados em Testes ELISA e Radioimunoensaio, composto por tecidos formados por fibras sintéticas, recobertos por uma fina camada de resina polimerizada que, apresentasse grupos funcionais reativos característicos e compatíveis em termos de reação por covalência, com grupos funcionais livres de proteínas. Deste modo evitar-se-ia também, a necessidade de uma etapa adicional de reação do suporte, com um reagente intermediário.

Foram utilizados tecidos de Nylon e Poliéster, esco-





maldeído e N-metilolacrilamida, cujos processos de polimeriza  
ção característicos sobre os Tecidos Sintéticos, envolvem tam-  
bém a participação de outros reagentes denominados impropria  
mente de Catalisadores.

Para se realizar o recobrimento dos Tecidos Sintéti-  
cos com uma fina camada de resina, na preparação do Suporte-Re  
sina estudado neste trabalho ou em acabamentos têxteis in-  
dustriais, utiliza-se um equipamento denominado "FOULARD" com  
posto por 2 cilindros metálicos cobertos com borracha, que gi-  
ram em sentido contrário, cuja pressão que exercem sobre o  
tecido embebido com a solução de resina, quando este passa en-  
tre eles, é controlada.

Deve ser empregada uma pressão de rolos que garanta  
um recobrimento homogêneo do tecido. A quantidade de solução  
de resina que fica retida no tecido após a passagem pelo "FOU-  
LARD", que é dada em porcentagem em relação ao peso do tecido  
original, é denominada "pick-up" (retenção).

O "pick-up", que é característico para cada tecido a  
cada pressão de rolos, determina portanto a quantidade de sól  
idos que estarão depositados na superfície do tecido após a po  
limerização da resina, com a conseqüente evolução do solvente  
e outros componentes voláteis presentes na formulação usada.

Estabelecendo-se previamente o "pick-up" do tecido,  
conhecendo-se a porcentagem de sólidos da resina que será usa-  
da, formular-se-á então a solução que embeberá o tecido, a fim de  
se obter após a polimerização, a concentração final de sólidos  
depositada desejada.

A solução de resina formulada compõe-se geralmente da

resina, do catalisador específico, cuja quantidade usada é função do tipo de resina e condições de polimerização usadas, de um solvente ou diluente, geralmente água e de um agente umectante, comumente um detergente, cuja função é aumentar a molhabilidade do tecido, favorecendo a homogeneidade do recobrimento.

A porcentagem de retenção de sólidos no tecido é calculada pela seguinte relação :

$$\% \text{ Retenção de sólidos} = \frac{X - Y}{Y} \times 100$$

onde : Y = peso inicial do tecido;

X = peso do tecido com a resina polimerizada.

A caracterização do Suporte-Resina quanto à quantidade de resina nele contida, pode também ser feita em relação à massa de resina depositada por área de tecido, através da relação :

$$\frac{\text{g resina}}{\text{m}^2 \text{ de Suporte-resina}} = \frac{X - Y}{Y} \times G$$

onde : G = gramatura do tecido, dada em  $\frac{\text{g tecido}}{\text{m}^2 \text{ de tecido}}$

e X e Y, como acima

Esta última forma de caracterização é interessante, quando se compara Suportes-Resina constituídos por tecidos de gramaturas diferentes, pois embora possam apresentar % de retenção de sólidos idênticas, as quantidades de resina neles de

positadas serão diferentes.

A seguir será feita uma revisão a respeito dos materiais e processos utilizados na preparação dos Suportes-Resina estudados neste trabalho, para uma melhor compreensão de suas propriedades.

### 2.5.1. Resinas Amínicas

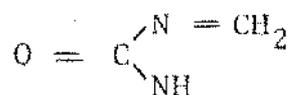
As principais matérias-primas para produção de resinas amínicas são a uréia e a melamina, que são compostos que contêm grupos amino, e o formaldeído.

O formaldeído reage inicialmente com os grupos amino formando grupos N-metilol :  $\text{>N} - \text{CH}_2\text{OH}$ , através de uma reação de adição. Segue-se então uma reação de condensação destes grupos entre si ou com outros grupos amino livres, com a liberação de água, promovendo-se o crescimento da molécula do polímero até sua reticulação completa.

Quando a resina amínica não está ainda polimerizada, ela é normalmente solúvel em água, sendo usada para acabamentos têxteis, recobrimentos para papéis, recobrimentos para madeiras, manufatura de adesivos, acabamentos de laminados e inúmeras outras aplicações<sup>(62)</sup>.

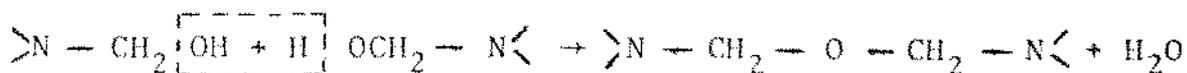
As reações de condensação que ocorrem entre os compostos N-metilol formados incluem<sup>(63)</sup> :

a. formação de metileno uréia:

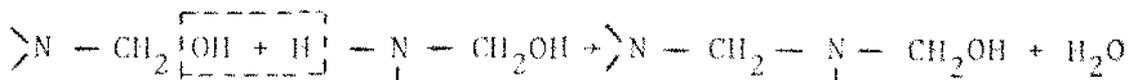


b. reações de reticulação:

b.1. entre 2 grupos metilol:



b.2. entre um grupo metilol e um grupo amino:



b.3. entre 2 grupos metilol, com a liberação de formaldeído:



A Figura 2.24, resume as reações possíveis da uréia com o formaldeído, formando as conhecidas Resinas Uréia-formaldeído.

Como se vê, devido à presença na uréia de 4 hidrogênios ativos e três locais possíveis para polimerização ( $-\text{C}=\text{O}$  e 2  $-\text{NH}_2$ ), dependendo da relação molar uréia : formaldeído (1:2; 1:3; 1:4, etc.) usada, das condições de pH, temperatura, tempo de reação e procedimento que se utiliza na síntese, pode-se obter na condensação da uréia com formaldeído, resinas com estruturas lineares: monometiloluréia e dimetiloluréia, ramificadas e cíclicas: triazonas e uronas, cada uma delas com pesos moleculares diversos e aplicações específicas, mas sempre apresentando grupos N-metilol em suas estruturas, que no nosso caso é o grupo funcional de interesse, podendo ser encontrado mesmo no polímero totalmente reticulado.

Quando se utiliza uma relação molar de 1:4 (uréia:for

maldeído), obtêm-se a chamada resina URONA, com moléculas de estrutura ciclíca, obtida da substituição total dos hidrogênios da uréia por grupos metilol, provenientes do formaldeído em meio alcalino. Sendo a tetrametiloluréia obtida extremamente instável, promove-se a sua desidratação e ciclização, ficando por molécula 2 grupos metilol (dimetilolurona). Esta resina parece ser por isso, adequada para os nossos propósitos.

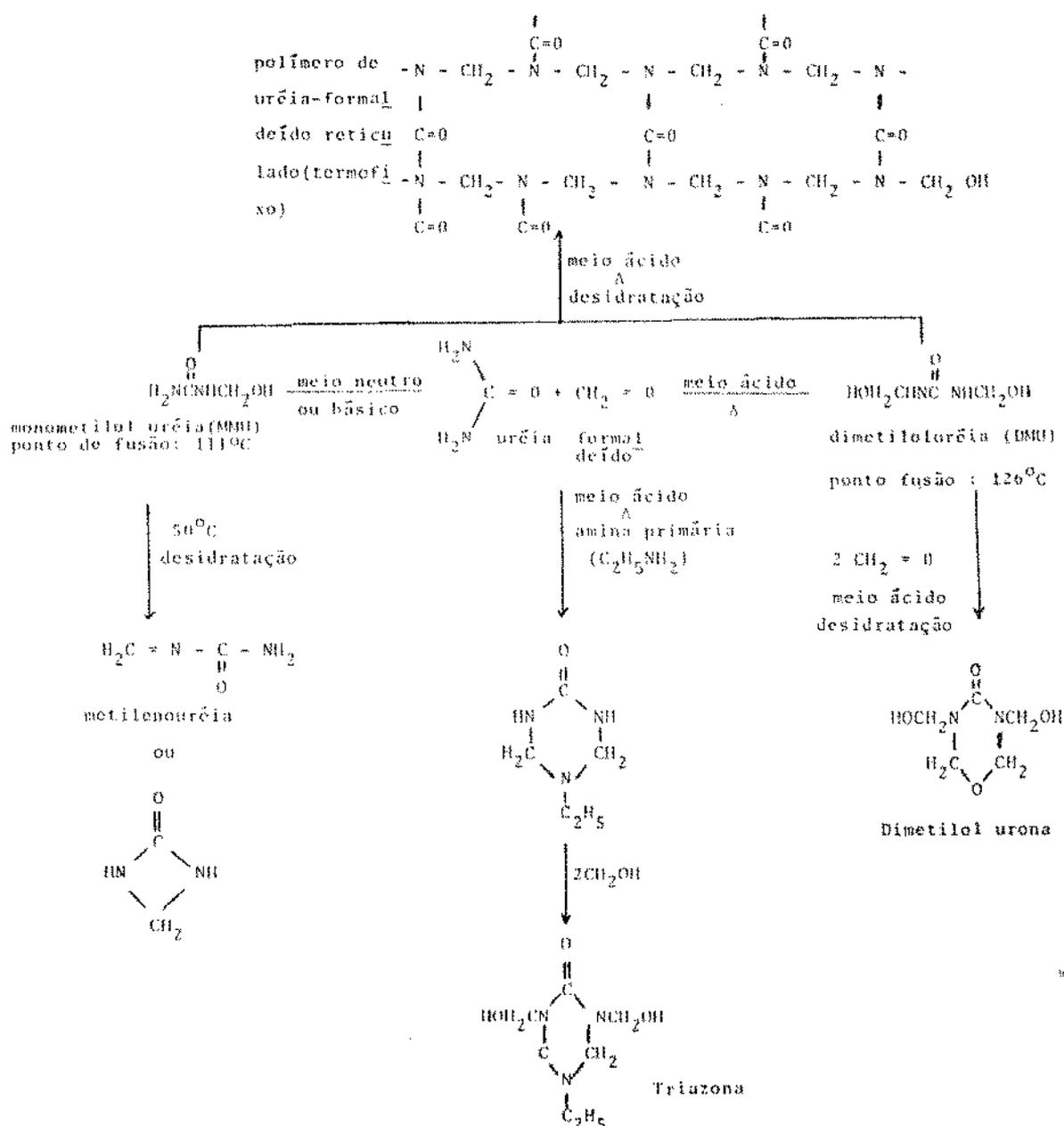


Figura 4.12 - Reações da Ureia com Formaldeído (62)

De Jong e De Jonge<sup>(64)</sup> estudaram a cinética da reação uréia-formaldeído a altas concentrações e concluíram como já havia feito Smythe<sup>(65,66)</sup>, que a reação é bimolecular e a taxa de reação é diretamente proporcional à concentração de íons hidroxila ou hidrogênio.

A Figura 2.25 mostra a influência do pH na constante da taxa da reação entre uréia e formaldeído a 35°C. A pHs maiores que 9 e menores que 4 a reação é muito rápida.

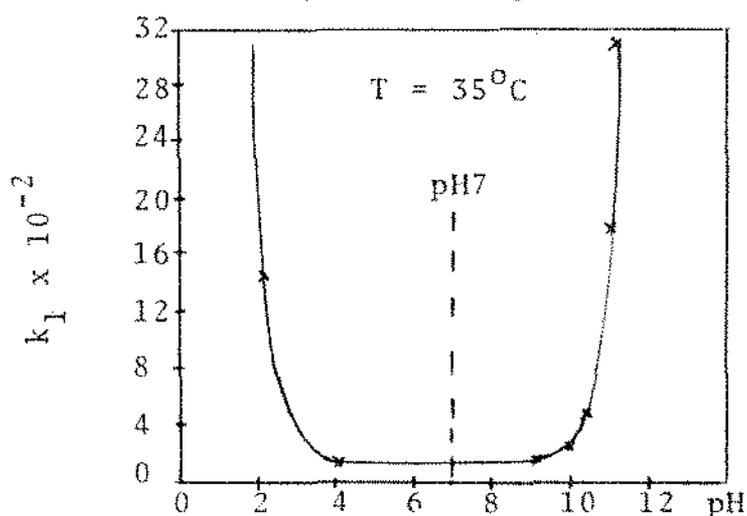


Figura 2.25 - Influência do pH na taxa da reação: uréia-formaldeído a 35°C<sup>(64)</sup>.

Portanto, a metilolação de grupos amino com formaldeído pode ser acelerada por álcalis ou ácidos, como se vê na Figura 2.26.

A metilolação de um amino-composto se dá através de mecanismo de substituição nucleofílica. A nucleofilicidade do átomo de nitrogênio é dada pelo seu par de elétrons disponível para se ligar à carbonila ( $\text{>C=O}$ ) do formaldeído.

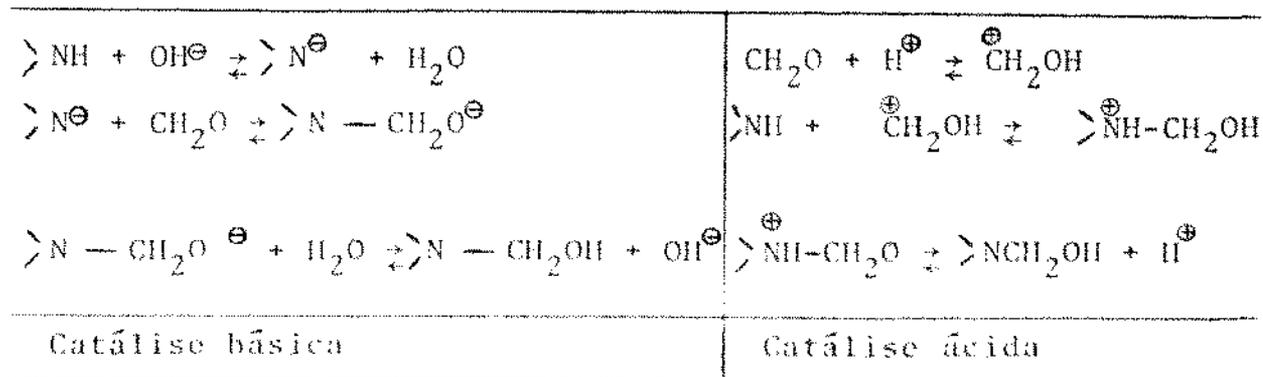


Figura 2.26 - Metilolação de grupos amino  $-NH^{(67)}$

A Figura 2.27, adiante, resume as reações possíveis da melamina com o formaldeído, formando as Resinas melamina - formaldeído .

A melamina é um reagente obtido da condensação da uréia ou da cianamida<sup>(62)</sup> e se caracteriza pela presença de um anel triazínico muito estável, com seis hidrogênios possíveis de serem substituídos por grupos metilol após a reação com formaldeído.

Dependendo da relação melamina : formaldeído usada, obtém-se di-, tri-, tetra-, penta- e hexametilolmelamina, em meio básico.

Através de reações de condensação entre os grupos metilol dos anéis triazínicos, formando ligações :

$>N - CH_2 - N<$  e  $>N - CH_2 - O - CH_2 - N<$  em meio ácido, forma-se um polímero insolúvel, com peso molecular infinito, mas que ainda apresenta grupos metilol livres, servindo portanto aos propósitos do trabalho.

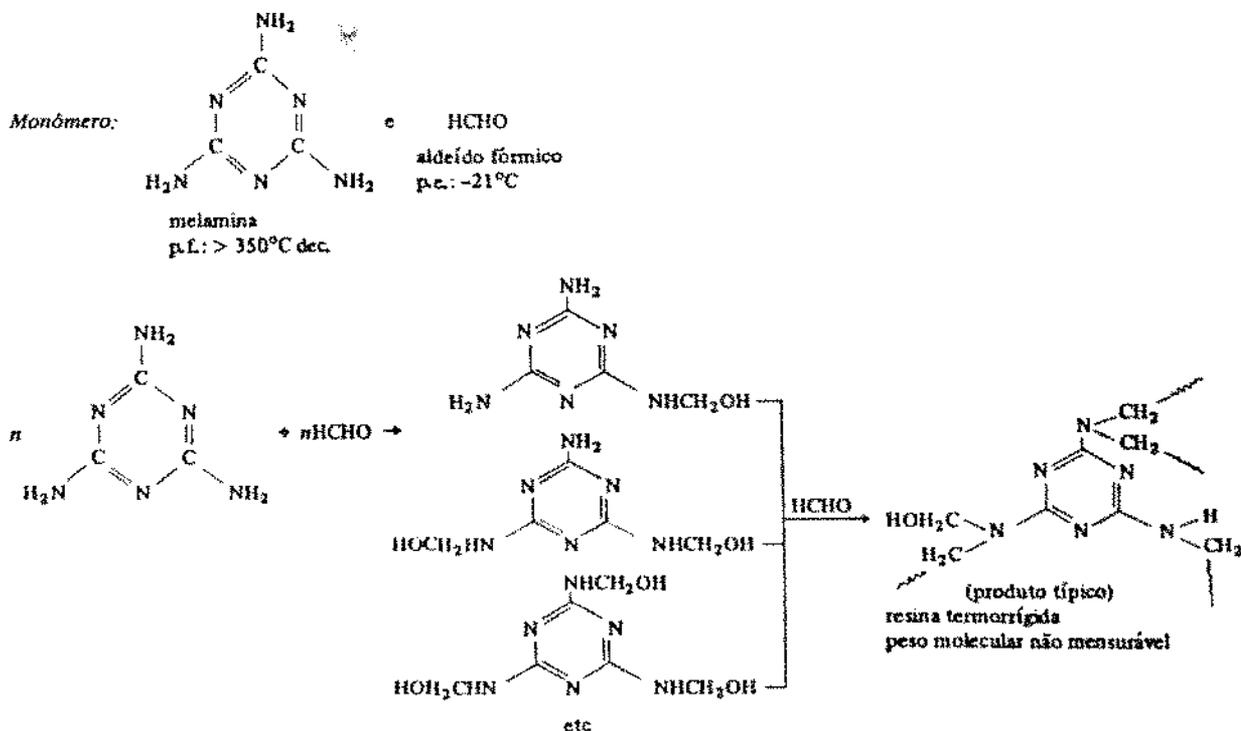
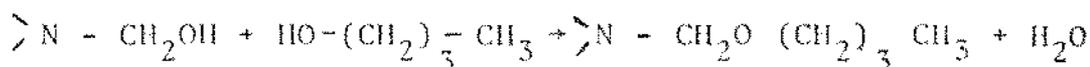
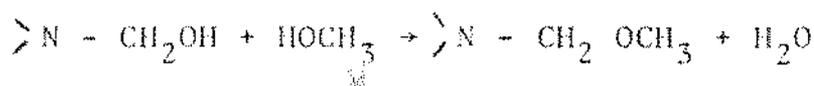


Figura 2.27 - Reações da melamina com formaldeído<sup>(72)</sup>

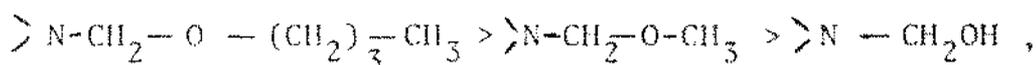
A melamina também é empregada em reações de condensação juntamente com a uréia, ou outros compostos amínicos, como a tiouréia, etilenouréia, etc., para produzir resinas com propriedades especiais.

Estas resinas amínicas descritas, que apresentam grupos N-metilol livres, quando utilizadas em acabamentos têxteis, apresentam o inconveniente da possibilidade de liberação durante a estocagem do tecido, bem como no contato com a pele, destes grupos N-metilol, na forma de formaldeído livre que é uma substância carcinogênica.

Para minimizar essa liberação, as resinas costumam ser submetidas durante o processo de síntese a mais uma etapa de reação, reagindo-se os grupos N-metilol com álcoois, principalmente o metanol e o butanol, obtendo-se os grupos metoxi -  $\text{CH}_2 - \text{O} - \text{CH}_3$  e butoxi: -  $\text{CH}_2 - \text{O} - (\text{CH}_2)_3 \text{CH}_3$ , respectivamente:



Em termos de estabilidade à hidrólise, com a consequente liberação de formaldeído para o meio ambiente, tem-se:



por isto estas resinas alquiladas, são preferidas para os acabamentos têxteis.

A Figura 2.28 apresenta o processo de síntese e metilação da Resina Urona.

Caso se use portanto, resinas amínicas alquiladas na preparação do Suporte-Resina, a reatividade da resina polimerizada em relação à ligação da proteína diminui, embora a reação possa ainda ocorrer com menor intensidade.

Por isso, para se testar a reatividade do Suporte-Resina com relação à presença de grupos metilol, resinas com grupo metilol bloqueados por metanol ou butanol podem ser usadas, para efeito de comparação.

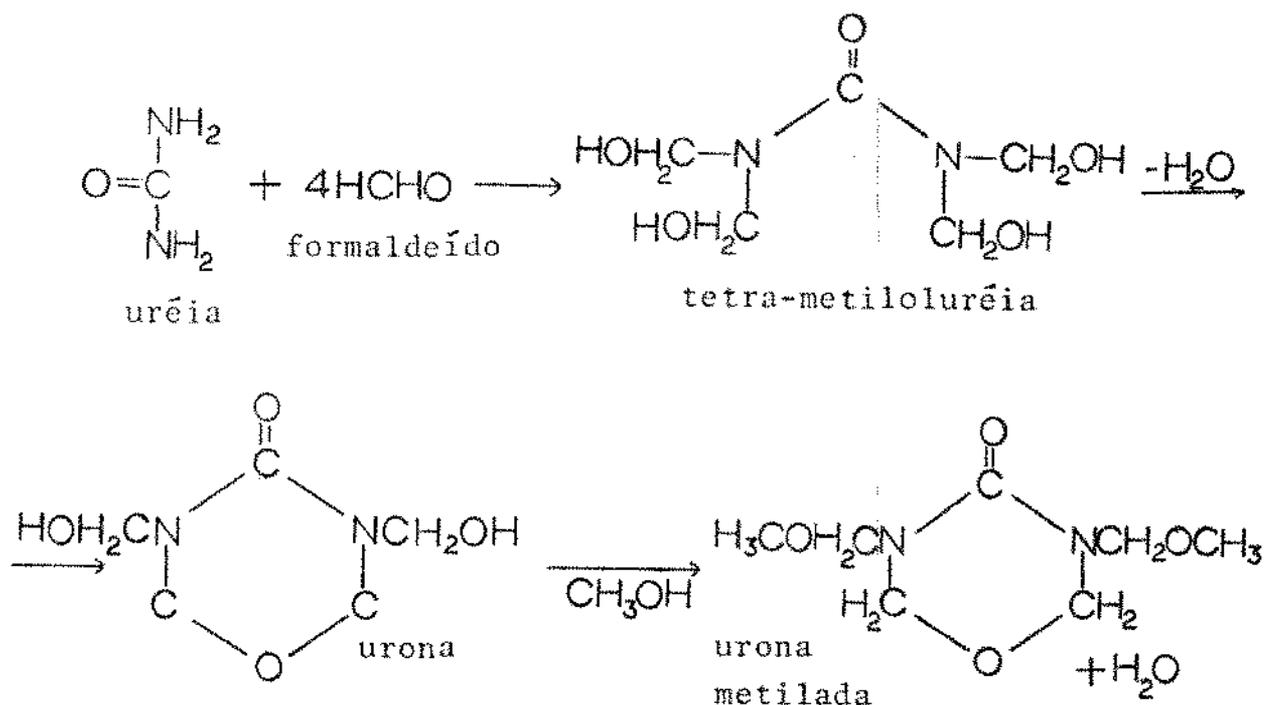


Figura 2.28 - Síntese e Metilação da Resina Urona<sup>(68)</sup>

### 2.5.2. N-metilolacrilamida(NMA)

A N-metilolacrilamida é um reagente obtido a partir da reação entre a acrilamida e o formaldeído, sendo comercializada e estocada como solução aquosa a 48% de sólidos (Figura 2.29).

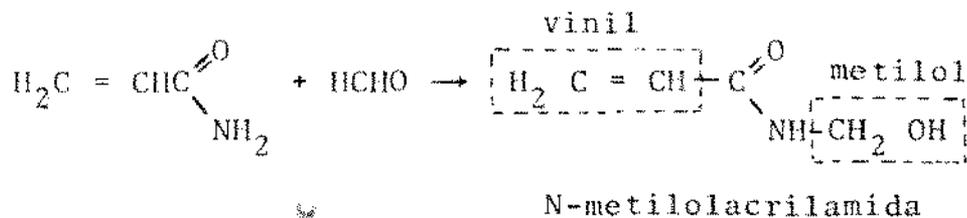
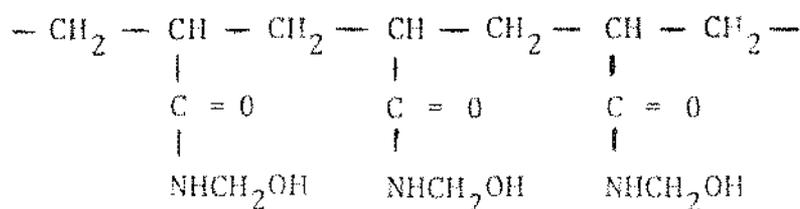
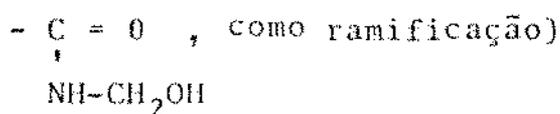


Figura 2.29 - Reação de síntese da NMA (em meio básico)

A N-metilolacrilamida (NMA) é um monômero extremamente reativo. É potencialmente um material perigoso, sendo necessários estocagem e manuseio apropriados.

A característica mais interessante da N-metilolacrilamida (NMA) é que a molécula possui 2 funcionalidades diferentes: uma vinil e outra hidroximetil ou metilol (Figura 2.29).

A NMA pode desta forma, ser copolimerizada com outros monômeros vinílicos ou ser polimerizada com um homopolímero, através de uma polimerização em cadeia ou por adição, iniciada por radical livre, utilizando-se sua função vinílica. (As insaturações ou ligações duplas são quebradas e as moléculas são adicionadas formando cadeias ramificadas com o grupamento:



Os grupos metilol ficam livres e disponíveis para uma polimerização posterior, pela ação de calor ou de um catalisador ácido<sup>(69)</sup>.

Portanto, através destes mecanismos polímeros formados por NMA podem reagir com eles próprios através dos grupos metilol livres ou com certos substratos reativos como a celulose, que apresenta hidroxilas aptas a reagir com grupos metilol<sup>(70)</sup>.

Alternativamente o monômero NMA pode ser quimicamente fixado a um substrato como a celulose, através dos grupos metilol e ser subsequentemente reticulado através de funções vinílicas pendentes, que também podem reagir com as hidroxilas livres do substrato<sup>(70)</sup>.

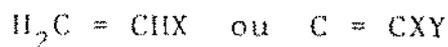
### 2.5.3. Catalisadores e Processos de Polimerização

As resinas amínicas do tipo uréia-formaldeído, melami-na-formaldeído, etc., pelas suas características de estrutura e composição química se polimerizam ou "curam" formando um polímero termofixo rígido, de peso molecular não mensurável, através de um processo de polimerização denominado por condensação ou etapa.

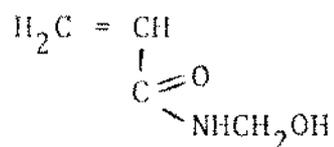
Normalmente em aplicações têxteis, a resina amínica ainda em sua maior parte constituída por unidades monoméricas (dimetiloluréia, tri-ou tetrametilolmelamina, etc.) ou moléculas de baixo peso molecular, é impregnada em tecidos dos mais variados tipos, em um banho. O processo de reticulação ou condensação desta resina sobre o tecido, para formar uma película insolúvel, é realizado parte pelo fornecimento de energia térmica e parte por uma substância de caráter ácido, chamada comumente de catalisador, mas que na verdade não é recuperado e tem sobretudo uma função aceleradora da transformação do monômero em polímero. O "catalisador" compõe parte da formulação da resina que é usada para impregnar o tecido<sup>(68)</sup>.

Em policondensações os reagentes mais usados como "catalisadores" são alguns sais metálicos de ácidos fortes e bases fracas, como o cloreto de magnésio :  $MgCl_2$  e o sulfato de amônio;  $(NH_4)_2SO_4$  ou também o cloreto de 2-amino-metil-propanol e o nitrato de zinco :  $Zn(NO_3)_2$ . Com estes catalisadores a temperatura de polimerização deve ser em torno de  $130^\circ C$  (68,71).

Monômeros vinílicos de fórmula geral :



onde: X e Y são grupamentos variáveis, (como Cl, , alquil), na classe dos quais a N-metilolacrilamida :



se enquadra, sofrem polimerização através das insaturações por um processo denominado polimerização em cadeia ou por adição, iniciada por radical livre<sup>(63)</sup>.

Radicais livres são intermediários de reações, que se caracterizam por possuir um elétron desemparelhado.

Radicais livres formados a partir de moléculas de monômero e que darão origem às moléculas de polímero, podem ser gerados de diferentes formas: através de agentes químicos que são adicionados ao meio reacional - iniciação química, ou através de radiações eletromagnéticas que geram radicais livres diretamente na massa reacional<sup>(63,72)</sup>.

A iniciação química é a mais aplicada industrialmente. Uma substância química capaz de formar radicais livres por decomposição térmica ou fotoelétrica é adicionada ao sistema contendo monômero. Cada espécie reativa formada por cisão homolítica (quebra da molécula em 2 radicais livres cada um com um elétron desemparelhado), reage com 1 molécula de monômero regenerando o radical livre, e iniciando o crescimento da molécula polimérica.

As substâncias químicas mais empregadas para produção de radicais livres por cisão homolítica são os peróxidos (peróxido de benzoila); os hidroperóxidos (hidroperóxido de cumila), os azocompostos ( $\alpha, \alpha'$ -azo-bis-isobutironitrila) e os persais (persulfato de amônio e de potássio), produzindo radicais acima de determinadas temperaturas (Figura 2.30).

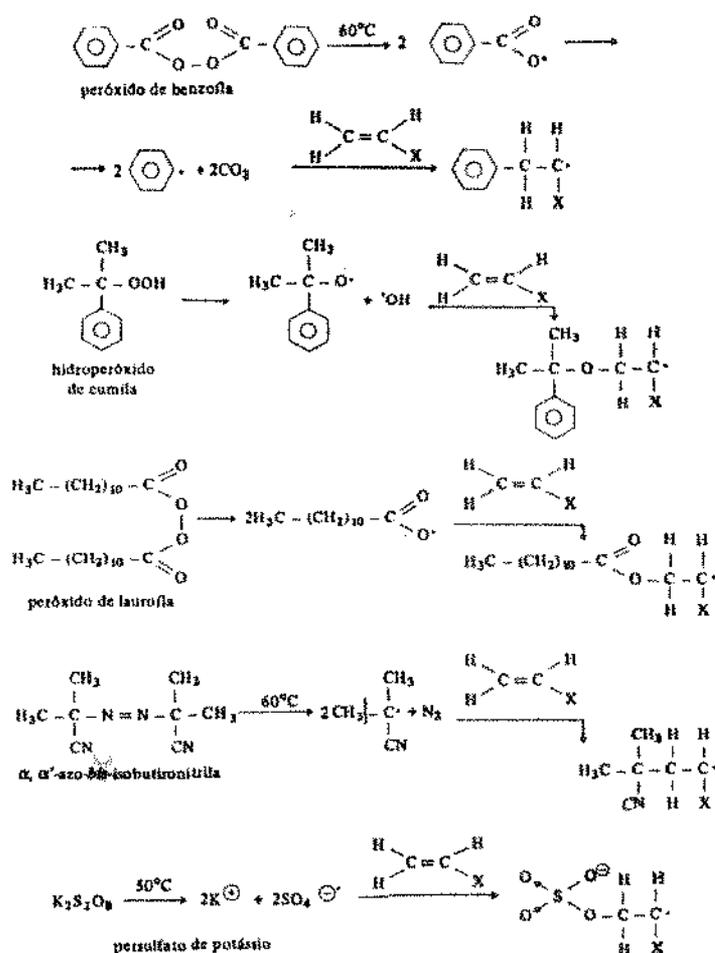


Figura 2.30 - Geração de radicais livres por decomposição térmica de iniciadores e sua reação com moléculas de monômero<sup>(72)</sup>

Outras substâncias se decompõem sob ação da luz ultra violeta <sup>(72)</sup>.

Estas substâncias químicas são chamadas de Iniciadores ou Fotoiniciadores, conforme o caso e entram na formulação junto com o(s) monômero(s), mas em pequena quantidade.

Também são chamados impropriamente de catalisadores, embora não tenham esta função específica.

No processo de polimerização por adição ou em cadeia atinge-se altos graus de polimerização logo no início da reação, mesmo a baixas conversões, tendo-se no meio reacional apenas moléculas de alto peso molecular e moléculas de monômero não reagido, não havendo subprodutos.

O crescimento da molécula polimérica se dá apenas pela adição de moléculas de monômero uma a uma, à cadeia em crescimento. Longos tempos de reação proporcionam altas conversões, mas alteram pouco o peso molecular <sup>(63,72)</sup>.

O monômero vinílico N-metilolacrilamida é portanto polimerizado através das insaturações, utilizando-se comumente como iniciadores o persulfato de amônio  $((\text{NH}_4)_2 \text{S}_2\text{O}_8)$ , que à temperaturas superiores a  $50^\circ\text{C}$ , produz radicais livres por decomposição térmica (Figura 2.31).

Fazendo-se polimerização da NMA com persulfato de amônio a uma temperatura mais alta, cerca de  $130^\circ\text{C}$ , como já foi discutido, pela ação do calor ocorre também a reação entre grupos metilol da NMA, formando-se um retículo tridimensional insolúvel :



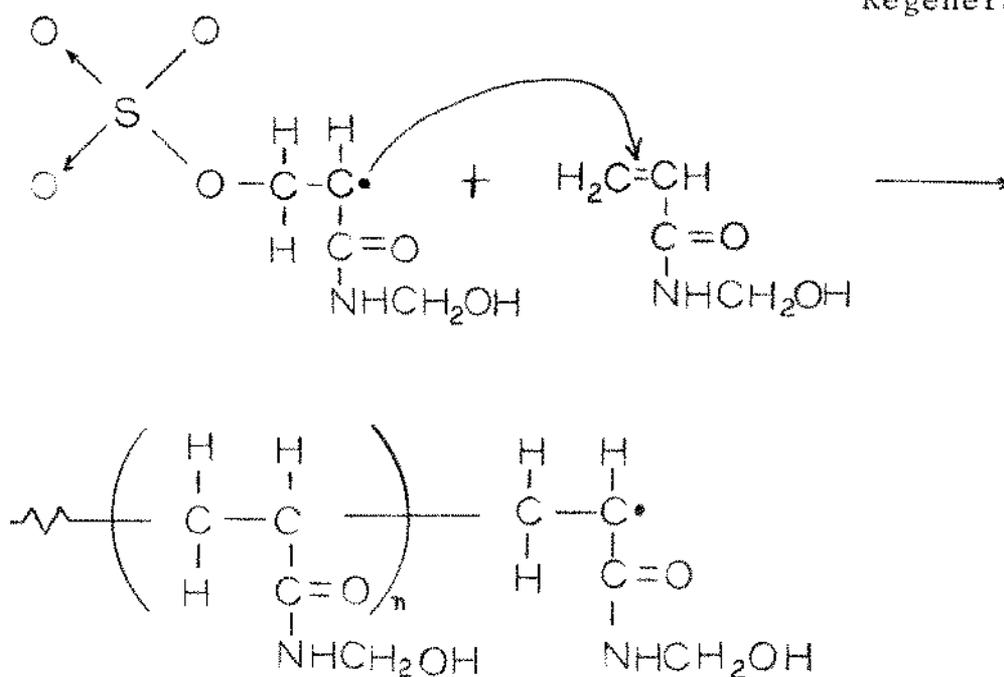
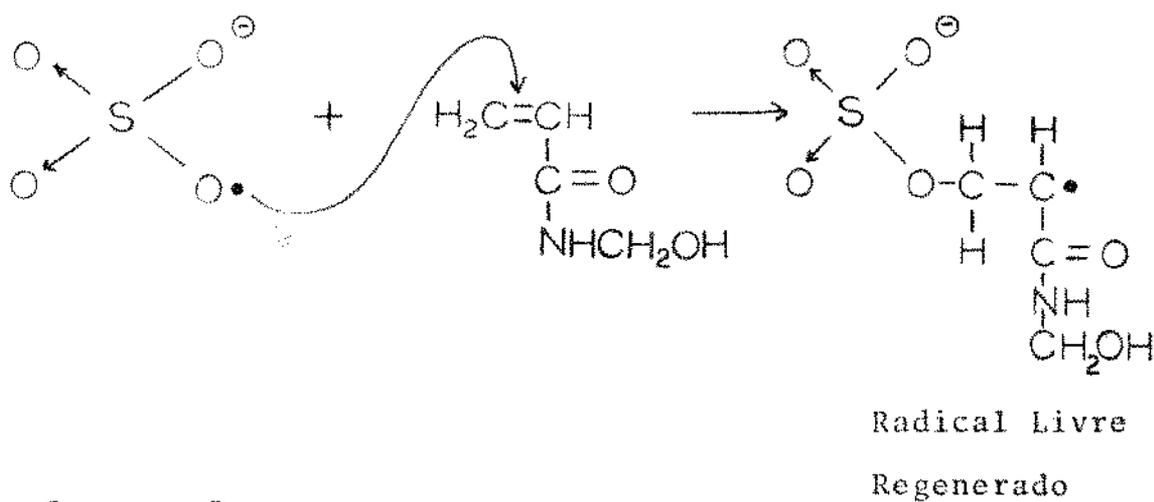
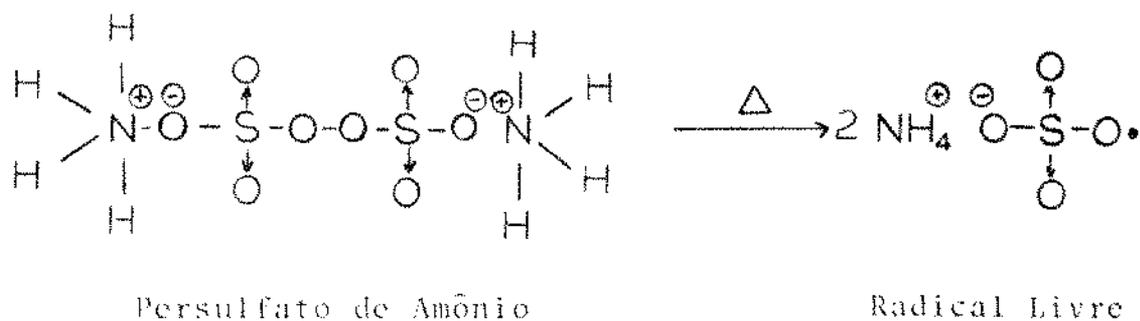


Figura 2.31 - Polimerização da NMA com Persulfato de Amônio

#### 2.5.4. Tecidos Sintéticos Utilizados:

Na preparação dos Suportes-Resina estudados neste trabalho para imobilização de proteínas, poderiam ser usados em princípio, diferentes tipos de suportes sólidos constituídos por materiais cerâmicos, vítreos ou poliméricos, nos mais variados formatos como pós, esferas ou pérolas, fibras ou tecidos formados por fibras em trama ou apenas coladas juntas.

Uma das características mais desejadas para o suporte que constituirá o imunosorvente é a disponibilidade de uma grande superfície em relação ao volume do suporte, para a ligação da proteína, que pode ser obtida quando se utiliza fibras têxteis em geral, tais como : poliéster, nylon, uretanas, celulósicas, celulósicas modificadas ou acrílicas . Além disso a facilidade de separação após as reações, também é muito importante.

Para uso em testes sorológicos do tipo ELISA, os suportes sólidos que oferecem melhores condições para obtenção de um imunosorvente com características próximas das ideais como: facilidade de preparação, de separação e de manuseio , inércia em relação à resina que recobre o suporte e às reações que se processam no teste e alta insolubilidade, são os tecidos formados por fibras de polímeros sintéticos tais como: Poliéster, especialmente o politereftalato de etileno - PET e Nylon 6,6, que são polímeros que têm grupos superficiais pouco reativos.

Este formato do Suporte apresenta uma maior relação área/volume, em comparação com uma esfera ou cavidade de placa

de poliestireno, suportes muito difundidos na preparação de Imu-  
nosorventes para Testes ELISA.

#### 2.5.4.1. Poliéster

Um poliéster é formado pela polimerização por conden-  
sação ou etapa de monômeros bifuncionais: principalmente diál-  
coois como o etilenoglicol e diácidos básicos, como o ácido te-  
reftálico ou ésteres destes diácidos como o dimetiltereftalato.  
Durante a polimerização há a eliminação de água ou outras molé-  
culas como o metanol, dependendo dos monômeros usados<sup>(63)</sup>.

O PET apresenta as seguintes propriedades físicas:  
peso molecular : 15000 - 20000; densidade : 1,38; temperatura  
de fusão =  $T_m = 265^{\circ}\text{C}$ ; temperatura de transição vítrea =  $T_g =$   
 $= 70^{\circ}\text{C}$ ; material amorfo, mas orientável sob tração acima de  
 $80^{\circ}\text{C}$ .

O grupamento que caracteriza os poliésteres fazendo a  
ligação entre as unidades de repetição que compõem a unidade  
estrutural básica do polímero é :  $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{O}-$ .

Este é um grupamento pouco reativo, tornando portanto  
o polímero bastante inerte a possíveis reações químicas. A au-  
sência de grupos reativos como hidroxilas, que desfavorece a  
formação de ligações como pontes de hidrogênio, bem como a pre-  
sença de grupos volumosos  na cadeia do polímero, tor-  
nam a adsorção de macromoléculas mais difícil (problemas esté-  
ricos).

O poliéster tem ainda a característica de absorver  
quantidades mínimas de água.

#### 2.5.4.2. Nylon 6,6

Nylon é o termo genérico que designa as poliamidas

sintéticas.

Poliâmidas são polímeros que possuem o grupamento amida :



como grupo característico da cadeia polimérica, ligando as unidades de repetição.

Os nylons são classificados por um sistema numérico, que indica o número de átomos de carbono das cadeias dos monômeros de que são sintetizados (63,72).

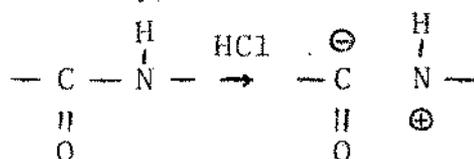
A poliamida produzida a partir da condensação da caprolactama, que possui 6 carbonos em sua molécula, é chamado de Nylon 6.

Nylons sintetizados a partir de diaminas e diácidos básicos são designados por 2 números, o primeiro representando a amina, como o Nylon 6,6, formado pela hexametilenodiamina e ácido adípico.

Na confecção de fibras e tecidos o Nylon 6,6 é o mais usado.

As poliamidas são produtos típicos de polimerização por etapa ou condensação (63).

O grupamento característico das poliamidas apresenta a chamada ligação peptídica e pode ser quebrada através de uma hidrólise ácida, para liberar grupos superficiais reativos :



capazes de reagir com outras moléculas.

O Nylon 6,6 tem boa resistência a solventes; resistência moderada à umidade; densidade relativamente baixa : 1,14 ; Temperatura de fusão =  $T_m = 250 - 260^{\circ}\text{C}$  e Temperatura de transição vítrea =  $T_g = 50^{\circ}\text{C}$ .

## 2.6. Formas de Formaldeído Encontradas em Resinas Amínicas e em Tecidos Tratados com essas Resinas<sup>(73)</sup>.

Como já foi dito, o suporte estudado neste trabalho para uso em Testes ELISA, é composto por um tecido sintético, revestido por uma camada de resina polimerizada, na qual se fixará proteínas para obtenção de Imunosorventes.

As principais resinas usadas são as amínicas e o monômero N-metilolacrilamida , cuja característica comum é possuir em sua formulação o formaldeído e em suas moléculas o grupo N-metilol.

Este formaldeído está presente na resina e após a sua polimerização no retículo resinoso, sob várias formas:

### a. Formaldeído Livre:

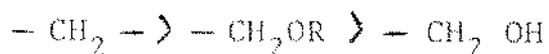
Refere-se ao formaldeído encontrado na resina ou monômero em si após a síntese, ou no retículo insolúvel formado após a sua polimerização, que não está combinado ou ligado às moléculas de resina ou ao retículo resinoso.

### b. Formaldeído Combinado:

Refere-se a todo formaldeído que está incorporado através de reação química às moléculas de resina ou monômero ou ao



Em termos da estabilidade dessas Formas em relação à hidrólise, com a conseqüente liberação de formaldeído, tem-se a seguinte ordem :



ou seja, sob condições pouco enérgicas de temperatura (<40°C) e umidade (ambiente de estocagem do produto polimerizado) pode haver quebra essencialmente da ligação do grupo Metilol - CH<sub>2</sub>OH, ocorrendo a liberação de formaldeído livre.

#### c. Formaldeído Total

Refere-se a todo o formaldeído contido na resina ou no retículo resinoso, ou seja, o formaldeído livre mais o combinado (50).

Na Indústria Têxtil, que utiliza largamente resinas à base de formaldeído no acabamento dos tecidos, o estudo das formas de formaldeído encontradas na resina visa a minimização da liberação de formaldeído.

Desde alguns anos, é grande a preocupação dos organismos ligados à Saúde Pública e Toxicologia, nomeadamente nos países como Estados Unidos, Japão e da Comunidade Européia, a respeito do contato dos consumidores e trabalhadores industriais com o formaldeído liberado de tecidos, devido às evidências de propriedades carcinogênicas do mesmo.

Estes organismos têm pressionado as indústrias através de leis, visando a manutenção dos índices de formaldeído livre ou possível de ser liberado como o Metilol, nos menores níveis praticáveis em seus produtos, o que tem sido conseguido

pelo uso de resinas com baixo formaldeído livre, grupos metilol bloqueados por álcoois e uso de reagentes sequestradores, ou "acceptors" de formaldeído<sup>(74,75)</sup>.

Neste trabalho o estudo das formas de formaldeído presentes visa o correlacionamento da reatividade do Suporte-Resina Desenvolvido na reação de fixação da proteína e da estabilidade dessa reação a longos períodos de estocagem, com a presença e concentração de certas formas formaldeído existentes no Suporte-Resina principalmente o Metilol e o Metilol Alquilado.

## 2.7. Métodos Analíticos para Determinação das Várias Formas de Formaldeído

Há um grande número de métodos de análise descritos na literatura, para a determinação direta ou indireta das diferentes formas de formaldeído encontradas nas resinas amínicas ou monômeros sintetizados a base deste reagente e em tecidos tratados com estas resinas.

Os métodos para formaldeído livre são os mais estudados e discutidos, dado ao controle exercido pelos Organismos ligados à Saúde Pública.

### 2.7.1. Determinação de Formaldeído em Resinas Amínicas

#### 2.7.1.1. Formaldeído Total:

O método mais utilizado é o desenvolvido por Bricker e Johnson<sup>(76)</sup> em 1945 e modificado por Morath e Woods<sup>(73,77)</sup> e se baseia na leitura colorimétrica da intensidade da cor roxa,

resultante da reação do ácido cromotrópico com uma alíquota de uma solução diluída da resina, em presença de ácido sulfúrico 5N. A absorvância da solução colorida resultante é medida a 570nm e o conteúdo de formaldeído total presente na resina, é obtido a partir de uma curva de calibração previamente preparada.

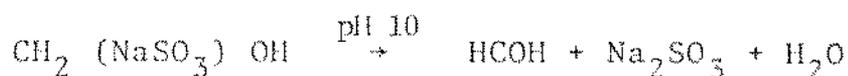
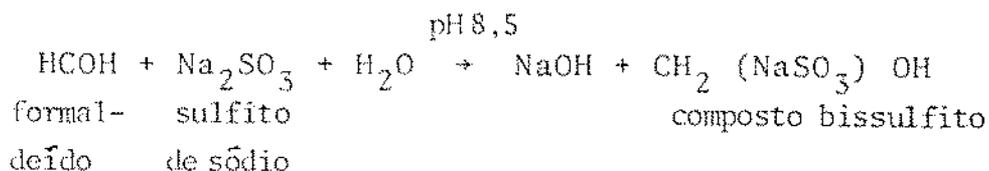
Mesmo a forma menos reativa de formaldeído presente na resina: pontes metilênicas  $\text{>N} - \text{CH}_2 - \text{N}<$  é liberada, permitindo a determinação da relação formaldeído/amina, que é informação importante em termos de propriedades desejadas, formulação e processo de fabricação.

#### 2.7.1.2. Formaldeído Livre

Os métodos mais usados são os que utilizam o sulfito de sódio a frio, existindo em 2 variações :

A variação descrita por De Jong e De Jonge<sup>(64,78)</sup> usa sulfito de sódio para formar com o formaldeído um complexo em meio alcalino suave (pH 8,5), à temperatura de 4°C, durante curto período de tempo. A reação é interrompida pela acidificação do meio. Forma-se o produto de adição do bissulfito. O excesso de sulfito que foi adicionado é reagido com solução de  $\text{I}_2$ , em presença de amido como indicador. O produto de adição do bissulfito formado ( $\text{CH}_2(\text{NaSO}_3)\text{OH}$ ) é então destruído pela adição de uma base, liberando o sulfito, que é titulado com solução de  $\text{I}_2$  padronizada. Esta última reação é usada para calcular a quantidade de formaldeído livre.

Reações Envolvidas:



A baixa temperatura utilizada no procedimento, minimiza a hidrólise dos grupos metilol e outros presentes na resina, que daria valores mais altos que os reais.

A variação descrita por Morath e Woods<sup>(73)</sup> do método do sulfito a frio, propõe uma modificação do Método descrito por Walker<sup>(79)</sup>, em 1953.

Neste método também ocorre a formação do produto de adição do bissulfito, e a modificação consiste na adição de uma alíquota de HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> padronizada e em excesso, em relação à quantidade de NaOH formada pela reação entre o formaldeído e o sulfito adicionado.

Portanto, a reação se processa em presença de ácido que vai imediatamente neutralizando o NaOH formado. No final o excesso de ácido é titulado com solução padronizada de NaOH.

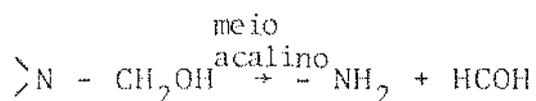
A diferença entre os equivalentes de ácido adicionados e os consumidos, é usada para o formaldeído livre.

A reação deve ocorrer à temperatura de 0 a 4°C para minimizar a hidrólise da resina, quando o excesso de ácido é titulado pela base.

A presença da base como produto no início da reação, sem a neutralização imediata com o ácido, pode causar a hidrólise dos grupos metilol e outros, dando resultados superiores aos reais e pode também catalisar a reação do formaldeído livre na amostra com grupos amino da resina.

### 2.7.1.3. Formaldeído Metilol

Grupos Metilol incorporados em resinas amínicas são ligados a átomos de nitrogênio  $\text{>N} - \text{CH}_2\text{OH}$  e estas ligações sofrem uma quebra quantitativa em meio alcalino, mesmo à temperatura ambiente, produzindo formaldeído livre<sup>(77)</sup>:



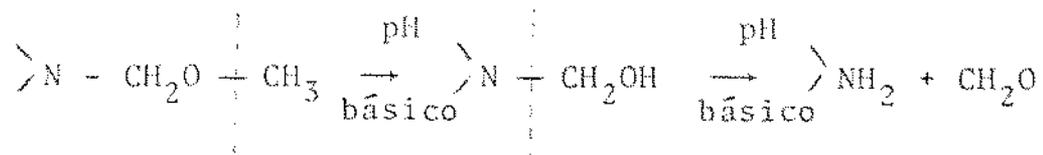
Portanto grupos Metilol podem ser determinados usando os mesmos métodos empregados para formaldeído livre, no qual reagentes alcalinos são empregados. Para se obter o conteúdo de grupos Metilol, deve-se descontar do resultado o formaldeído livre, medido previamente por outros métodos, que é determinado concomitantemente.

De Jong<sup>(80)</sup> e De Jonge e De Jong<sup>(64,78)</sup> desenvolveram 2 métodos para determinação de Formaldeído Metilol, envolvendo a liberação dos grupos Metilol sob condições alcalinas.

Um dos métodos é iodimétrico<sup>(64,78)</sup> e não pode ser usado em presença de substâncias redutoras e o outro utiliza cianeto de potássio alcalino<sup>(80,77)</sup>, sendo adequado a todas as circunstâncias.

Um outro problema que surge na utilização destes método

dos é que parte, senão todos, dos grupos Metilol esterificados (metilados ou butilados) presentes na resina, são também liberados sob as condições do teste e medidos como grupos Metilol dando resultados errôneos.



Portanto estes métodos se prestam apenas à resinas não esterificadas.

Para evitar este problema, Morath e Woods<sup>(73)</sup> propõem um método para medir apenas os grupos Metilol e se baseia na metilação dos grupos Metilol da resina com metanol, contendo ácido clorídrico anidro como catalisador. Um mol de água é liberado para cada mol de grupos metilol reagido :



O total da água liberada é medida no final da reação pelo método padrão de Karl Fisher. Corrige-se o valor descontando-se a água já presente originalmente na amostra, também determinada por Karl Fisher.

#### 2.7.1.4. Formaldeído Metilado<sup>(73)</sup>

Esta forma é melhor calculada através do valor de metanol combinado obtido das análises do metanol total e livre.

Metanol Total:

É obtido através da oxidação, sob refluxo, com dicroma-

to. O método envolve a oxidação do metanol e outros grupos oxidáveis, que devem depois ser descontados.

#### Metanol Livre:

No caso de resinas não-metiladas, usa-se o método que envolve a liofilização da resina, seguida da determinação do metanol total no resíduo seco. A diferença entre o metanol total antes e depois da liofilização é igual ao metanol livre da resina.

Para resinas metiladas usa-se o método Siggia modificado<sup>(73)</sup>.

O metanol é esterificado por anidrido ftálico, em piridina a 0°C. O excesso de anidrido é convertido em ácido, pela adição de água no final da reação. O metanol livre é calculado da diferença dos resultados de titulações com alcali da amostra e de uma prova em branco com anidrido ftálico. A conversão da reação é de 90,6%.

#### 2.6.1.5. Formaldeído Metilênico:

É calculado da diferença entre os valores do formaldeído total menos o livre, metilol e metilado.

#### 2.6.2. Determinação de Formaldeído em Tecidos Tratados com Resinas ou Monômeros à Base de Formaldeído

Em termos de Tecido Tratado os Métodos de Análise de maior aplicabilidade são os do Formaldeído Livre e do Formal-

deído Metilol.

#### 2.6.2.1. Formaldeído Livre em Tecidos Tratados

Para a medida de formaldeído livre em Tecidos Tratados, vários métodos estão descritos na literatura<sup>(68,81,82,83)</sup>.

Estes métodos tentam simular condições de ambiente de estocagem e utilização dos produtos recobertos por resinas, que são essencialmente produtos têxteis.

Visando o controle da liberação do formaldeído na forma livre, existe grande debate<sup>(81,84,85)</sup> a respeito do melhor método para medida de formaldeído livre em tecidos tratados.

Do mesmo modo que para formaldeído livre em resinas, existem discrepâncias entre as quantidades medidas através de cada método. Estas diferenças originam-se da severidade com que cada método provoca a possível quebra de ligações de grupos Metilol ou da presença de resíduos ou grupos funcionais interferentes no método, resultando em análises imprecisas.

Os métodos mais utilizados são :

##### 1. Método do Sulfito a Frio<sup>(82)</sup> :

É o método menos severo de todos, para formaldeído livre em tecidos tratados e é considerado o teste para o "verdadeiro" formaldeído livre em tecidos, pelo curto período de tempo (7 minutos) e a baixa temperatura (0-10°C), que são usados na reação para a formação do produto de adição do formaldeído com o sulfito de sódio - o bissulfito. Estas condições obscurecem o efeito do alto pH de incubação proveniente do pH do sul

fito de sódio, que causaria a hidrólise dos grupos Metilol.

As duas variações deste método propostas para resinas por De Jong e De Jonge<sup>(64,78)</sup> e por Morath e Woods<sup>(73)</sup> já descritas anteriormente são utilizadas também para medida de formaldeído livre em tecidos, adaptando-se apenas as concentrações e os volumes dos reagentes usados, para a medida de concentrações de formaldeído da ordem de ppm.

As duas variações apresentam entretanto interferências indesejadas.

A de Morath e Woods sofre a influência da presença de catalisador ácido no recobrimento resinoso, principalmente em tecidos não lavados, sendo portanto necessária uma maior quantidade de NaOH para a titulação do ácido colocado em excesso, dando um resultado em termos de formaldeído livre, abaixo do real.

A variação de De Jong e De Jonge sofre a influência relevante de outros grupos reativos distintos do formaldeído presentes no recobrimento. Muitos compostos que contêm a função aldeído reagem com o sulfito. A presença do cloro positivo  $Cl^+$ , também interfere, pois o iodo é mais eletropositivo que o cloro podendo substituí-lo em cloroamidas, consumindo-se mais iodo, dando um resultado de formaldeído maior que o real.

## 2. Método do Frasco Selado da AATCC - Método 112-1978 (AATCC Sealed Jar Method)<sup>(83)</sup>.

Este método mede o formaldeído liberado como vapor de um tecido tratado, incubado sobre água (em um suporte) por 20

horas a 40°C, dentro de um frasco hermeticamente fechado. Este método foi desenvolvido para medir a propensão que um tecido tratado com resina (tecido acabado) tem para liberar formaldeído, sob condições de temperatura e umidade enérgicas prolongadas.

### 3. Método Japonês Modificado<sup>(68)</sup> (Japanese Law 112-1973)

Extrai-se o formaldeído, através da incubação do tecido tratado com resina em uma solução tampão de fosfato biácido de potássio - hidróxido de sódio 0,1N, pH 6,0, à temperatura de 40°C por 1 hora.

Reage-se numa alíquota deste extrato com acetilcetona em meio tamponado e lê-se então espectrofometricamente a absorvância entre 412 e 415 nm. A concentração de formaldeído é obtida de uma curva de calibração de concentração de formaldeído x absorvância previamente obtida.

### Comparação entre os Métodos para Formaldeído Livre<sup>(84,85)</sup>

Os resultados de todos estes métodos descritos, são indiscriminadamente referidos como conteúdo de formaldeído livre.

Formaldeído livre como foi anteriormente definido (formaldeído extraível que não está quimicamente ligado ao nitrogênio), é provavelmente melhor determinado através do método sulfito a frio, utilizando-se iodo como titulante, já que utilizando-se este método não se espera forçar o formaldeído de outras fontes potenciais do acabamento (resina).



descritos por De Jong e De Jonge<sup>(64,78)</sup> e De Jong<sup>(77,80)</sup> para medidas destes grupos em resinas. Apenas pequenas modificações foram introduzidas, já que se trata de tecido tratado em pedaços e não de resina líquida. É usada uma massa de aproximadamente 5,0g de tecido tratado cortado em pedaços de 1 a 2 cm<sup>2</sup> e volumes de reagente e água destilada como diluente, para uma ótima molhabilidade e imersão do tecido. O tempo de reação de hidrólise para o método iodimétrico foi aumentado para 2 horas, em vez de 1 hora.

O método iodimétrico<sup>(64,78)</sup> consiste da incubação da amostra de tecido acabado cortado em pedaços, com solução de iodo em presença de NaOH, por 2 horas a 4°C.

A amostra é então acidificada e o excesso de iodo titulado com solução de tiosulfato de amônio, em presença de amido.

O método do cianeto<sup>(77,80)</sup> consiste na incubação da amostra de tecido acabado cortada em pedaços com solução de KCN em presença de NaOH, por 2 horas à temperatura ambiente. Após neutralização, adiciona-se piridina e neutraliza-se novamente com ácido. Titula-se então com nitrato mercúrico  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ .

Para se ter a concentração apenas de grupos metilol deve-se descontar o formaldeído livre (previamente medido), que é concomitantemente determinado por estes métodos.

## 2.8. Caracterização da Natureza da Ligação que Ocorre Entre a Proteína e o Suporte-Resina na Preparação de Imunossorventes

Na preparação de imunossorventes, a natureza da ligação que se consegue entre o suporte e a proteína que se imobiliza é muito importante, pois ela pode conferir ao imunossorvente, propriedades de interesse como possibilidade de estocagem por longos períodos, se a ligação for covalente.

No caso do Suporte-Resina estudado neste trabalho, a presença dos grupos N-metilol em sua superfície, indica a possibilidade de ocorrência de ligação covalente com grupos característicos de proteínas, como descrito na literatura<sup>(61)</sup>.

Contudo, a ocorrência ou não dessa ligação covalente deve ser testada e questionada, dada a possibilidade de ocorrência de adsorção física, como resultado de ligações secundárias, como discutido a seguir.

Quando uma superfície sólida inerte é colocada em contato com um fluido: gás ou líquido, certas moléculas deste fluido se acumulam preferencialmente sobre esta superfície.

A interação destas moléculas com a superfície poderá ocorrer de diferentes maneiras: por Adsorção Física apenas, onde forças fracas estão envolvidas ou por Adsorção Química onde há interação de forças de natureza química, com modificações na distribuição eletrônica das moléculas. A Adsorção Química pode ser considerada uma verdadeira reação química, havendo evidências de que os três tipos de ligação química: iônica, covalente e coordenativa, podem ser formadas entre a superfície

do suporte e as moléculas que ali se fixam, dependendo da natureza da superfície e das moléculas envolvidas<sup>(89,90)</sup>.

Ligações covalentes podem ser formadas somente se o adsorvente possuir orbitais com elétrons solitários, capazes de entrar em covalência.

No caso do Suporte-Resina tem-se a presença na superfície de grupos metilol, aptos a reagir com as proteínas em solução, covalentemente. Na prática não se consegue diferenciar uma ligação química, da Adsorção Química.

Os mesmos critérios usados para a diferenciação entre Adsorção Física e a Adsorção Química, no caso do Suporte-Resina estudado neste trabalho, podem ser utilizados para questionar se a ligação da proteína se dá apenas por adsorção física ou se ocorre ligação química.

A Tabela 2.4, apresenta resumidamente os principais critérios usados para diferenciação entre Adsorção Física e Adsorção Química.

Tratam-se de critérios indiretos, pois os métodos experimentais que existem para se estudar diretamente a interação eletrônica adsorbato (molécula que se liga à superfície) - adsorvente (superfície onde a molécula se liga):

- potencial elétrico à superfície;
- condutividade elétrica à superfície.

exigem equipamentos sofisticados, sendo de difícil aplicação devido à pequena quantidade de moléculas adsorvidas em relação ao tamanho da amostra<sup>(89)</sup>.

Portanto, procura-se fazer a distinção através de um

Tabela 2.4 - Critérios para Diferenciação entre Adsorção Química e Adsorção Física<sup>(89)</sup>

	Critério	Adsorção Química	Adsorção Física
1	Calor de Adsorção	Em geral > 20Kcal/mol exceções com menores valores frequentes. Raramente é endotérmica.	2 - 6 Kcal/mol, Quase sempre < que o calor de condensação
2	Energia de Ativação	É necessária tanto para a adsorção quanto para a dessorção > 20 Kcal.mol <sup>-1</sup> para a dessorção (da ordem de uma reação química). Raramente a adsorção é não ativada	Nula para adsorção 2 - 6 Kcal/mol para a desorção (valor aproximado do calor de condensação)
3	Intervalo de Temperatura	Ocorre a temperaturas muito superiores ao ponto de ebulição (em geral) Controlada cineticamente pela temperatura	Ocorre à temperaturas próximas do ponto de ebulição
4	Especificidade	Específica, como no caso de reações químicas	Não-específica
5	Tipo de Cobertura	Monocamada	Camada Múltipla

conjunto de critérios indiretos, cada um deles por si são insuficiente para caracterizar o tipo de interação<sup>(89)</sup>.

A ocorrência simultânea de Adsorção Física e Química deve ser levada em consideração, quando se analisa dados experimentais sobre adsorção<sup>(89,90)</sup>.

Observando-se a Tabela 2.4, entretanto, verifica-se que mesmo estes critérios indiretos de diferenciação são de difícil medida como o calor de adsorção e energia de ativação, principalmente quando se trabalha com soluções de moléculas, que se deseja fixar em superfícies como as do Suporte-Resina desenvolvido, que apresentam grupos reativos livres.

Para analisar e descrever os resultados experimentais de adsorção, resta ainda o recurso das Isotermas de Adsorção.

#### 2.8.1. Isotermas de Adsorção<sup>(89,90)</sup>

A experiência mostra que uma vez atingido o estado de equilíbrio no processo de adsorção, as concentrações de EQUILÍBRIO das moléculas na fase fluida e na superfície do adsorvente, dependem da concentração inicial de moléculas (chamadas sorativo), da temperatura, da natureza das moléculas e da superfície do adsorvente.

A Isoterma de Adsorção é a função que traduz a variação da quantidade de moléculas fixadas no adsorvente no estado de equilíbrio, em função da concentração de equilíbrio das moléculas no meio reacional, à temperatura constante.

Na Tabela 2.5 apresenta-se as equações das isotermas mais empregadas no estudo da adsorção, no caso descrevendo o

fenômeno para fase gasosa. As variáveis que aparecem nas equações são :

$V$  = volume adsorvido,  $\text{cm}^3$

$V_m$  = volume requerido para cobrir a superfície do adsorvente, com uma camada monomolecular do adsorbato;

$\theta$  = grau de cobertura, ou fração da monocamada coberta à pressão de equilíbrio  $P$ ;

$P_o$  = pressão de vapor de saturação do adsorbato.

Os demais símbolos são constantes.

Tabela 2.5 - Isotermas de Adsorção <sup>(90)</sup>

Nome	Equação da Isoterma	Aplicabilidade
Henry	$V = k P$	Adsorção Física e Química
Langmuir	$\frac{V}{V_m} = \theta = \frac{kP}{1+kP}$	Adsorção Física (Monocamada) e Química
Freundlich	$V = k P^{1/n} \quad (n>1)$	Adsorção Física e Química
Temkin	$\frac{V}{V_m} = \theta = \frac{1}{a} \ln CP$	Adsorção Química
Brunauer, Emmett e Teller (BET)	$\frac{P}{V(P_o - P)} = \frac{1}{V_m \cdot C} + \frac{C-1}{V_m \cdot C} \cdot \frac{P}{P_o}$	Adsorção Física em Multicamada

No caso de se ter adsorção a partir de moléculas em solução, pode-se substituir estas variáveis por outras:

V por  $X/W$  = quantidade de material adsorvido por unidade de área ou peso de adsorvente (no equilíbrio);

P por C = concentração de equilíbrio da solução em contato com o adsorvente;

$V_m$  por  $N_m$  = quantidade de material necessário para formação da monocamada, por peso ou área do adsorvente,

$P_0$  por  $C_0$  = concentração de equilíbrio da solução, em que se dá a saturação do adsorvente.

$\theta = \frac{X/W}{N_m} = \frac{\text{quantidade de material adsorvido}}{\text{quantidade de material necessário para formar a monocamada}}$

Na Figura 2.32, apresenta-se os cinco tipos de Isoterma de Adsorção típicas:

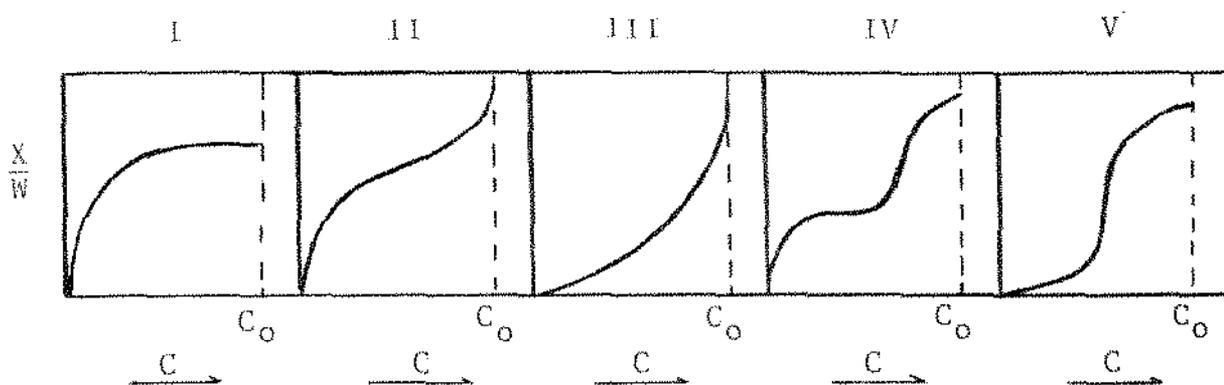


Figura 2.32 - Isotermas Típicas de Adsorção<sup>(91)</sup>

As Isotermas de Langmuir e de BET são as mais importantes e usadas.

### Isoterma de Langmuir:

É baseada no Modelo de Langmuir que se assenta nas seguintes hipóteses simplificativas:

1. a superfície do adsorvente é energeticamente uniforme;
2. a adsorção dá-se em MONOCAMADA;
3. as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras.

Quando usada para adsorção de moléculas em solução, a forma mais simples da equação da Isoterma de Langmuir é dada por:

$$\frac{X}{W} = \frac{N_m K C}{1 + K C} \quad (2.1)$$

com  $K$  = constante de equilíbrio para adsorção.

A Isoterma de Langmuir tem o formato I, apresentado na Figura 2.32.

Testa-se a aplicabilidade do Modelo de Langmuir a um conjunto de dados de equilíbrio, linearizando-se a equação 2.1, obtendo-se :

$$\frac{C}{X/W} = \frac{1}{N_m K} + \frac{C}{N_m} \quad (2.2)$$

Para que o Modelo de Langmuir, válido para Adsorção Física em Monocamada e Adsorção Química, represente com eficiência o fenómeno estudado, graficando-se os dados experimen

tais, segundo a equação 2.2:

$$\frac{C}{X/W} \times C,$$

deve-se obter uma reta. Determina-se então os parâmetros  $N_m$  e  $K$ , a partir dos coeficientes angular e linear da reta, respectivamente.

A validade do Modelo de Langmuir só pode ser estabelecida com segurança, quando as seguintes condições forem satisfeitas :

a. A equação da Isoterma de Langmuir deve ser uma aproximação significativa dos dados experimentais para todo intervalo do grau de cobertura :

$$\theta = \frac{X/W}{N_m} \text{ (varia de 0 a 1)}$$

b. Os valores dos parâmetros  $N_m$  e  $K$  obtidos devem ser fisicamente significativos :  $N_m$  deve ser independente da temperatura e  $K$  deve decrescer exponencialmente com a temperatura.

Os desvios do Modelo de Langmuir são explicados pela heterogeneidade energética da superfície e pela existência de interações entre as moléculas de adsorbato, principalmente no caso da Adsorção Física, onde ocorre a formação de camadas múltiplas.

Mais frequentemente, o Modelo de Langmuir é aplicado apenas para faixas limitadas do grau de cobertura ( $\theta$ ).

#### Isoterma de B.E.T. (Brunauer, Emmett e Teller)

Emprega as mesmas considerações iniciais feitas para

a Equação de Langmuir, assumindo além disso, que o tratamento da monocamada pode ser estendido para diversas camadas. Cada espécie da 1ª camada serve como sítio para adsorção da 2ª camada, e assim por diante.

Despreza-se interações laterais e assume-se uma superfície homogênea.

Antes do desenvolvimento da Teoria BET em 1938, não existia nenhuma equação que explicasse a forma de  $S$ , encontrada na Isoterma do tipo II, da Figura 2.32. A Teoria BET leva a uma equação com 2 constantes, que quando aplicada à adsorção a partir de soluções tem a forma :

$$\frac{\frac{C}{X} (C_0 - C)}{W} = \frac{1}{N_m \cdot K} + \frac{K-1}{N_m \cdot K} \cdot \frac{C}{C_0} \quad (2.3)$$

que se reduz a Equação 2.1 de Langmuir quando  $C/C_0$  é muito baixo ou  $K$  é muito grande.

Fazendo-se  $C/C_0 = Y$ , obtêm-se :

$$\frac{1}{\frac{X}{W} (1 - Y)} = \frac{1}{N_m} + \frac{1}{N_m K} \cdot \frac{(1-Y)}{Y} \quad (2.4)$$

Se a Teoria BET é aplicável aos dados experimentais, então o gráfico:

de  $\frac{1}{\frac{X}{W} (1-Y)}$  contra  $\frac{(1-Y)}{Y}$  será uma reta e o

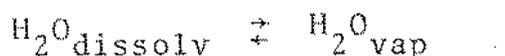
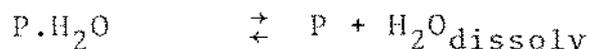
coeficiente linear desta reta corresponderá ao recíproco de  $N_m$ , ou seja, a quantidade necessária de material para formar a mo-

nocamada.

De acordo com os resultados obtidos experimentalmente, em termos de quantidade de imunoproteína ligada ao Suporte-Resina, para determinadas concentrações de imunoproteína de equilíbrio, que serão apresentados no Capítulo 4, ítem 4.5, parece interessante apresentar também a teoria desenvolvida por Hailwood e Horrobin<sup>(95)</sup>, para a sorção de umidade em fibras.

Eles consideram que as primeiras moléculas de água se ligam com unidades definidas (sítios) da molécula de polímero da fibra, formando hidratos, enquanto que as demais formam uma solução ideal no polímero.

É assumido que a água dissolvida, o polímero não-hidratado e o polímero hidratado, formam uma única fase sólida. Nesta fase haverá um equilíbrio entre a água combinada com a unidade P da molécula de polímero, que forma o hidrato, e a água presente como água dissolvida no polímero. Haverá também um equilíbrio entre a água dissolvida e o vapor d'água na atmosfera.



Pela Lei de Ação de Massas tem-se:

$$\left[ P.H_2O \right] = K_1 \left[ H_2O_{\text{dissolv}} \right] \left[ P \right] \quad (2.5)$$

e

$$\left[ H_2O_{\text{dissolv}} \right] = K_2 \left[ H_2O_{\text{vap}} \right] \quad (2.6)$$

onde  $K_1$  e  $K_2$ , são constantes de equilíbrio.

Sendo a concentração de vapor d'água dada pela umida de relativa H%, tem-se:

$$\left[ \text{H}_2\text{O}_{\text{vap}} \right] = H/100 \quad (2.7)$$

ou seja:

$$\left[ \text{H}_2\text{O}_{\text{dissol}} \right] = KH, \text{ com } K = \frac{K_2}{100} \quad (2.8)$$

Assumindo-se uma solução ideal, as concentrações dos 3 tipos de moléculas envolvidas no equilíbrio são obtidas de suas frações molares.

O ganho em massa de água da fibra é dado por:

$$r = \text{ganho} = \frac{\text{massa de água no polímero}}{\text{massa de polímero seco}} \quad (2.9)$$

ou seja,

$$r = \frac{n^\circ \text{ de moles de água no polímero} \times 18}{n^\circ \text{ de moles do polímero seco} \times M} \quad (2.10)$$

onde: M = peso molecular da unidade do polímero

18 = peso molecular da água

Determinando-se os números de moles envolvidos na equação 2.10, obtém-se ao final a expressão:

$$\frac{Mr}{1800} = \frac{KH}{1-KH} + \frac{K K_1 H}{1+K K_1 H} \quad (2.11)$$

que é a equação de Hailwood e Horrobin, relacionando o ganho, r, com a umidade relativa da atmosfera, H. Pela escolha ade-

quada das constantes  $K$ ,  $K_1$  e  $M$ , obtêm-se um bom ajuste de dados experimentais, que apresentem uma curva no formato sigmoidal (em S). Na Figura 2.33, mostra-se a comparação entre resultados experimentais e calculados por Hailwood e Horrobin, para algodão e lã a  $25^{\circ}\text{C}$ , mostrando a divisão da água retida, pelo algodão, na forma de hidratos e em solução.

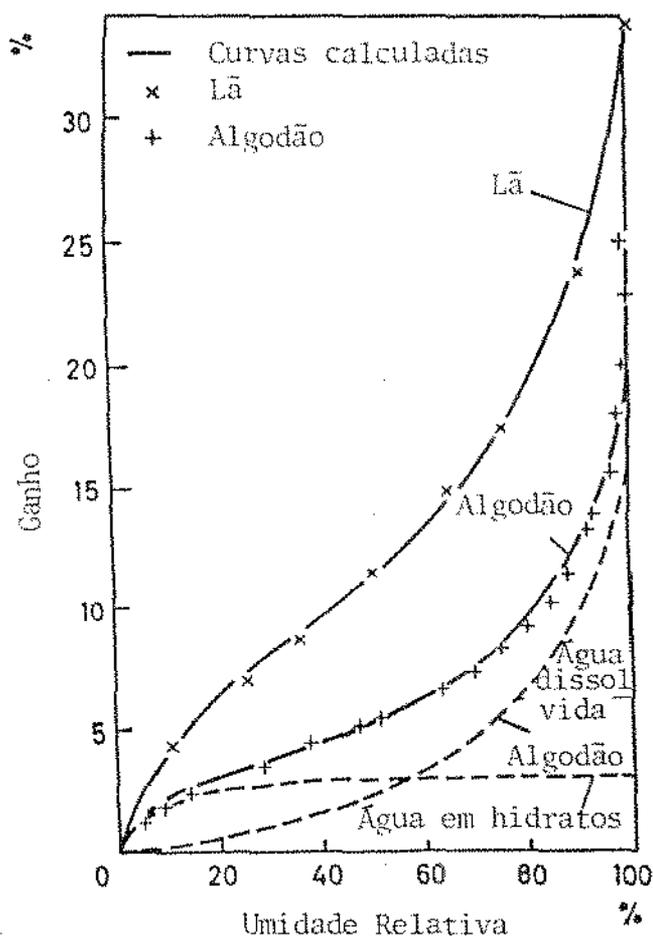


Figura 2.33 - Comparação da Equação de Hailwood e Horrobin , com resultados experimentais para lã e algodão<sup>(95)</sup>

Dillman e Miller<sup>(92)</sup> realizam estudos de adsorção de albumina, gamaglobulina e fibrinogênio, em várias membranas de polímeros, incluindo resinas de troca catiônica e caracterizam 2 tipos de adsorção: um relativamente hidrofílico, exotér

mico e facilmente reversível, com calor de adsorção de -10 Kcal/mol e outro aparentemente irreversível (fortemente ligado), hidrofóbico e endotérmico, com calores de adsorção variando de 5 a 20 Kcal/mol. Kemp e Rideal<sup>(93)</sup> relataram que proteínas são adsorvidas em sólidos, de acordo com a Adsorção de Langmuir, o que também foi observado por Kim e Lee<sup>(94)</sup> na adsorção de proteínas do sangue em vários materiais poliméricos (polidimetilsiloxano, teflon e copolímero éter-uretano-uréia).

O estudo da adsorção de proteínas a polímeros sintéticos é de grande interesse, por causa de seu envolvimento, nos estágios iniciais de interação entre o sangue e materiais poliméricos implantáveis<sup>(94)</sup>.

### CAPÍTULO 3

#### Materiais e Métodos

NOTA: Todos os Métodos e Procedimentos descritos neste Capítulo, que envolvem a imobilização de proteínas em discos de Suporte-Resina ou placas de poliestireno, e sua utilização em testes imunoenzimáticos ELISA e Radiomunoensaio, bem como a preparação e purificação das imunoproteínas e conjugados enzimáticos e radioativos que foram utilizados, foram realizados no Instituto de Medicina Tropical, IMT, e no Laboratório de Análises e Pesquisas Clínica Gastão Fleury S.C. Ltda.

### 3.1. Preparação do Suporte-Resina

#### MATERIAIS

##### Tecidos Sintéticos

- Malhas de Poliéster (politereftalato de etileno) de gramaturas 179 e 292 g/m<sup>2</sup>, fornecidas pela Rhodia S.A., Divisão Têxtil-Santo André - São Paulo;
- Tecido de Nylon 6,6, adquirido no mercado.

##### Resinas

- Uréia-formaldeído concentrada, fornecida gentilmente pela Ashland Resinas Sintéticas Ltda.;
- Urona, Permatron XP, fornecida gentilmente pela Inpal;
- N-metilolacrilamida, fornecida gentilmente pela Cyanamid e pela Hoechst.

##### Catalisadores

- Sulfato de amônio, p.a., fornecido pela Carlo Erba S.A.;
- Persulfato de amônio, p.a., fornecido pela Reagen.

##### Agente Umectante

- Fluidol a 10%, fornecido pela Henkel S.A. Indústrias Químicas.

### EQUIPAMENTOS

- Foulard de Laboratório, marca Wuppertal, Modelo FL, largura útil de 40 cm e pressão entre os rolos ajustável até 20 Kgf/cm<sup>2</sup>;
- Máquina para Polimerização de Resinas em Tecidos, tamanho Laboratório, marca Werner Mathis A.G. - Textilmaschinen Laborapparat, modelo CA-8155 - Niederhasli/Zwisch; Switzerland. Controles automáticos de temperatura e tempo de polimerização;
- Estufa com circulação forçada marca Fabbe - Temperatura: 50 a 250°C;
- Balança Analítica, marca Micronal;
- Prensa Hidráulica Siwa para 20 toneladas, fabricada pela Schwing Siwa Equipamentos Industriais Ltda.

### PROCEDIMENTO

Retira-se o acabamento superficial do tecido a ser usado (óleos de fiação ou gomas), colocando-o numa solução de carbonato de sódio e detergente ou numa solução de amilase no caso do recobrimento ser de goma de amido, por 30 minutos a 70°C. Lava-se e seca-se.

Corta-se o tecido em pedaços de tamanho adequado, que são estabilizados em ambiente com temperatura e umidade controladas e em seguida pesados.

Embebe-se cada pedaço de tecido na solução de resina que se deseja polimerizar sobre ele, formulada de acordo com quantidade de resina que se quer nele depositar.

Passa-se o tecido entre os rolos de um "Foulard", a determinada pressão que forneça a % de retenção da solução de resina ou "pick-up" desejado para o tecido.

Estende-se o tecido impregnado com a solução de resina em um bastidor apropriado e coloca-se numa Máquina de Polimerização, onde a resina é polimerizada a temperatura de 130°C durante o tempo de 5 minutos. Alternativamente pode-se usar uma estufa com circulação forçada, para realizar a polimerização.

Após a polimerização da resina, o tecido é exaustivamente lavado com água corrente e destilada para retirada de materiais que não reagiram (depósitos solúveis, excesso de catalisadores, etc.). Seca-se o tecido em estufa com circulação forçada a 70°C.

Estabiliza-se novamente o tecido no mesmo ambiente com temperatura e umidade controladas por 1 hora, e pesa-se.

Corta-se então o tecido recoberto com resina polimerizada, que já constitui o Suporte-Resina, no formato de discos de aproximadamente 8 milímetros de diâmetro, com o auxílio de uma ferramenta especialmente desenhada, para ser usada numa prensa hidráulica.

Para uso posterior os discos podem ser estocados a 4°C em refrigerador.

Cálculos:

$$\% \text{ Retenção de Sólidos} = \frac{X - Y}{Y} \times 100$$

onde Y = Peso do Tecido Original sem resina

X = Peso do Tecido recoberto com a resina polimerizada

ou

$$\text{Concentração de Resina no Suporte-Resina} = \frac{X - Y}{Y} \times G \quad \left( \frac{\text{g resina}}{\text{m}^2} \right)$$

com X e Y ídem acima e G = gramatura do tecido, g/m<sup>2</sup>  
(massa por área do tecido)

### 3.2. Preparação de Discos de Suporte-Resina Sensibilizados

(Reação de Imobilização de proteínas ou Reação de Sensibilização)

#### MATERIAIS

- discos de 8,3mm de diâmetro do Suporte-Resina, com concentrações de resina variáveis;
- soluções aquosas dos componentes que se deseja imobilizar no Suporte-Resina: antígenos, anticorpos ou fragmentos destes;
- tampão fosfato 0,1M, pH7,2 (PBS);
- formaldeído p.a., fornecido pela Merck;
- gelatina, fornecida pela Difco.

#### EQUIPAMENTOS

- equipamento para agitação composto de um motor e um eixo que gira a velocidades variáveis;
- estufa para incubação marca Fanen, a 37°C;
- liofilizador, fornecido pela Edwards;
- refrigerador comum.

#### PROCEDIMENTO

Discos de 8,3mm de diâmetro de Suporte-Resina sofrem uma "ativa

ção" prévia de sua superfície através de contato com uma solução aquosa de formaldeído a 7%, sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas. Este tratamento visa restituir ao Suporte-Resina grupos reativos Metilol que possam ter sido liberados na forma de formaldeído livre durante a estocagem. São então lavados exaustivamente.

Coloca-se então um certo número de discos em contato com uma solução do componente que se deseja fixar, antígeno ou anticorpo, à uma diluição conveniente, executada com uma solução salina tamponada, neutra, alcalina ou ácida conforme os testes prévios sobre o melhor pH para reação indiquem.

Normalmente se utiliza tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 ou 7,5 (PBS). Os discos são incubados primeiramente à 37°C por 2 horas e em seguida sob lenta rotação, em "overnight" (18 horas) à temperatura ambiente ou a 4°C.

Após a "sensibilização" lava-se os discos por 3 vezes com tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 (PBS).

Incuba-se então os discos em uma solução de 2% de gelatina em PBS, durante 2 horas sob agitação e à temperatura ambiente. A gelatina é uma proteína imunologicamente inativa, cuja função é bloquear possíveis grupos funcionais ou sítios de ligação remanescentes do Suporte-Resina, para evitar nas fases seguintes do teste ELISA onde vai ser usado, possíveis reações inespecíficas.

Lava-se novamente com PBS como descrito, e seca-se então os discos "sensibilizados".

Para a manutenção das propriedades do imunossorvente durante uma possível estocagem, os discos devem ser liofiliza

dos e embalados a vácuo em frascos, ou devem ser secos entre papel de filtro e estocados em frascos com boa vedação sobre envelopes de sílica-gel. Armazena-se os discos sensibilizados em refrigerador a 4°C.

### 3.3. Metodologia do Teste Imunoenzimático ELISA, utilizando discos de Suporte-Resina sensibilizados como Imunosorvente

#### MATERIALS

- discos de 8,3mm de Suporte-Resina sensibilizados com antígeno ou anticorpo;
- tampão fosfato 0,1M, pH 7,2 (PBS);
- detergente Tween 20, fornecido pela Sigma Chemical Co.;
- gelatina, fornecida pela Difco;
- soros sanguíneos para dosagem ou identificação de anticorpos ou antígenos;
- conjugado enzimático: anti-imunoglobulina humana G - peroxidase, preparado pelo método de Nakane e Kawaoi<sup>(28)</sup>;
- ortofenilenodiamina, p.a., fornecida pela Sigma Chemical Co.;
- peróxido de hidrogênio, p.a., fornecido pela Merck;
- ácido 5-aminosalicílico, p.a., fornecido pela Sigma Chemical Co.;
- ácido clorídrico, p.a., fornecido pela Merck;
- hidróxido de sódio, p.a., fornecido pela Merck.

#### EQUIPAMENTOS

- estufa de incubação, marca Fanen, 37°C;
- trompa de vácuo para lavagens;

- espectrofotômetros marca Bausch & Lomb, modelo Spectronic 21 UVD e marca Incibrás modelo MF 340.

### PROCEDIMENTO

Incuba-se cada disco sensibilizado em um tubo de ensaio, com um volume de solução do soro a testar de 0,5 a 1,0 ml, diluído como desejado em PBSTG (PBS, pH 7,2, com Tween 20 e gelatina nas concentrações finais de 0,05 e 0,5%, respectivamente) por 30 minutos a 37°C. Como prova em branco um disco é incubado apenas com o diluente PBSTG.

Estando por exemplo o disco "sensibilizado" com um antígeno, este em contato com uma solução de um soro positivo (isto é, que contém anticorpos específicos contra este antígeno) reage com seu anticorpo específico presente no soro, formando o complexo: Suporte-Resina-antígeno-anticorpo.

Depois da Incubação lava-se o disco 3 vezes por 5 minutos, com PBST (PBS, pH 7,2, com Tween 20 na concentração de 0,05%).

As soluções de incubação e de lavagem são removidas por sucção (trompa de vácuo), inclusive da trama de fios do disco.

O disco é então incubado com cerca de 0,25 a 1 ml de solução de conjugado enzimático: anti-imunoglobulina humana IgG - peroxidase, à determinada diluição em PBSTG. Este conjugado-enzimático reage especificamente com o anticorpo ligado ao disco, formando o complexo: Suporte-Resina-antígeno-anticorpo-conjugado enzimático.

Após a incubação por 30 minutos a 37°C, o disco é no-

vamente lavado com PBST. 3 vezes por 5 minutos, sendo então transferido para um novo tubo de ensaio, para reduzir a reação de fundo que poderia ocorrer, pela adsorção das imunoproteínas nas paredes do 1º tubo de ensaio usado.

Adiciona-se então cerca de 0,5 ml de solução cromôgena, preparada a não mais de 60 minutos.

Como soluções cromôgenas pode-se usar;

- ortofenilenodiamina a 0,04% e peróxido de hidrogênio a 0,02% (10 mg de ortofenilenodiamina e 10 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, em 25 ml de tampão citrato-fosfato de pH 5,0);
- ácido 5-aminosalicílico 0,005M e peróxido de hidrogênio 0,0015M.

A incubação é feita por cerca de 15 a 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro.

Para interromper a reação da enzima com a solução cromôgena, adiciona-se 2 ml de HCl 1N ou NaOH 1N, conforme a solução cromôgena usada.

A intensidade da coloração amarronzada resultante é medida como ABSORVÂNCIA, em espectrofotômetro para luz visível, no comprimento de onda de 492 nm para o sistema com ortofenilenodiamina e 450 nm para o ácido 5-aminosalicílico. Utiliza-se para zerar o espectrofotômetro como solução de referência a solução da prova em branco (todos os reagentes menos o soro).

Pode-se também usar como referência, apenas a solução cromôgena mais o ácido ou base usados para interromper a reação.

O procedimento completo para o teste ELISA com discos de Suporte-Resina Sensibilizados como Imunosorvente demora cerca de 3 horas.

A figura 2.15, mostra esquematicamente as reações do Teste ELISA, aqui descrito.

### 3.4. Preparação de Placas de Poliestireno Sensibilizadas

Com  $\mu\text{l}$  de solução da imunoproteína que se deseja imobilizar (antígeno ou anticorpo), diluída a determinada concentração com tampão carbonato 0,06M, pH 9,6, são colocados em cada uma das cavidades de placas de poliestireno fornecidas pela NUNC, Denmark. Incuba-se a  $4^{\circ}\text{C}$ , em "overnight" (18 horas).

As cavidades são então drenadas e preenchidas com solução de gelatina (fornecida pela Difco) a 2% em tampão carbonato 0,06M, pH 9,6 e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. As cavidades são novamente drenadas e lavadas 3 vezes com tampão fosfato pH 7,2, com Tween 20 a 0,02% (PBST). As placas podem ser usadas de imediato ou conservadas em geladeira por períodos variáveis, de acordo com o produto fixado, protegidas contra a umidade.

### 3.5. Metodologia do Teste Imunoenzimático ELISA, utilizando Placas de Poliestireno Sensibilizadas como Imunosorvente

Volumes de 100  $\mu\text{l}$  de soluções de soro a várias diluições em PBSTG (tampão fosfato 0,1M pH 7,2, com Tween 20 a 0,05% e gelatina a 0,5%) são colocados em cada cavidade sensibilizada. Incuba-se por 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Drena-se as cavidades e lava-se 3 vezes com PBST. Adiciona-se então a cada cavidade 100  $\mu\text{l}$  de solução de conjugado enzimático: anti-imunoglobulina G humana -peroxidase, diluído em PBSTG, incuba-se e lava-se novamente nas mesmas condições acima descritas.

Coloca-se então em cada cavidade, 100 µl de solução cromógena (ortofenilenodiamina e água oxigenada) que inicia a reação de enzima.

Após 30 minutos a reação é interrompida pela adição de 30 µl de HCl 1M e as Absorvâncias das soluções coloridas de cada cavidade são lidas diretamente na placa a 492 nm, em um espectrofotômetro especialmente desenvolvido para este fim, um Minireader Photometer, fornecido pela Dynatech Laboratories Inc. Alexandria, Va, EUA.

### 3.6. Preparação do Traçador IgG - $^{125}\text{I}$ , para uso em Radioimunoensaio

O método utilizado para marcação de Imunoglobulina G humana, com o isótopo radioativo  $^{125}\text{I}$ , foi o da Cloromina-T<sup>(5, 86,87)</sup>.

### 3.7. Determinação da Quantidade de Proteína Ligada por Disco de Suporte-Resina por Radioimunoensaio

Para a ligação das imunoproteínas aos discos, utiliza-se a mesma metodologia usada na preparação de discos sensibilizados.

Entretanto, são usadas soluções de sensibilização de Imunoglobulina G humana à várias diluições em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 (PBS), sempre com uma quantidade constante de IgG -  $^{125}\text{I}$  como traçador. As condições de reação, quanto à temperatura, tempo de reação, pH do meio reacional, etc. variam de ensaio para ensaio, dependendo do tipo de influência que se deseja estudar, na quantidade de proteína ligada por disco.

Após a reação de sensibilização, cada disco tem sua radioatividade medida num Contador de Radiação Gama, marca Beckman Modelo Gamma 4000, a qual está relacionada com a quantidade de proteína ligada.

### 3.8. Preparação das Proteínas (antígenos e anticorpos) utilizadas para Sensibilização dos Discos de Suporte -Resina e de Placas de Poliestireno

#### 3.8.1. Antígeno da Doença de Chagas

Como antígeno da Doença de Chagas é usado um extrato proteico de Trypanosoma cruzi preparado de acordo com um método modificado descrito por Peres<sup>(88)</sup>, a partir de culturas do parasita.

#### 3.8.2. Antígeno de Toxoplasmose

Como antígeno de Toxoplasmose é usado um extrato de Toxoplasma gondii, a partir de parasitas colhidos na cavidade peritoneal de camundongos infectados, como descrito por Camargo et al<sup>(18)</sup>.

#### 3.8.3. Antígeno da Rubéola

Antígeno de Rubéola é preparado a partir do vírus da Rubéola como descrito por Voller e Bidwell<sup>(20)</sup>.

#### 3.8.4. Imunoglobulina G humana (IgG)

A Imunoglobulina G humana é obtida da fração gamaglobulínica, das proteínas que compõem o soro sanguíneo humano

(ou seja o sangue, já separado das células que o compõem: glóbulos vermelhos, brancos, etc.).

De um pool de soros humanos a fração gamaglobulínica é purificada por precipitações sucessivas com sulfato de sódio a 18% e 12%.

### 3.8.5. Anti-Imunoglobulina G humana

A anti-IgG humana é obtida pela inoculação de IgG humana em carneiros.

A fração gamaglobulínica do anti-soro de carneiro, que contém a anti-IgG humana, é separada através de precipitações sucessivas com sulfato de amônio a 40%.

Em seguida, para purificação, procede-se a uma cromatografia de afinidade em uma Coluna de Adsorção recheada com IgG humana ligada covalentemente à Sepharose, funcionando como imunosorvente. Após a adsorção da anti-IgG pela IgG ligada à Sepharose, a eluição da anti-IgG é realizada através do tampão glicina-HCl 0,1M NaCl 0,15M, pH 2,8; sendo depois o pool de frações obtidas a cada eluição, neutralizado por diálise em tampão fosfato 0,1M pH 7,2.

### 3.9. Preparação do Conjugado Enzimático: anti-imunoglobulina G humana - peroxidase

O método de Preparação de Conjugado Enzimático utilizado foi o descrito por Nakane e Kawaoi<sup>(28)</sup>, já comentado em detalhe no item 2.3.2.2, deste trabalho.

Usa-se anti-imunoglobulina humana produzida em carneiros e purificada como descrito no item 3.8.5 e peroxidase fornecida pela Sigma Chemical Co.

### 3.10. Determinação de Formaldeído Livre no Suporte-Resina

Para determinação de Formaldeído Livre no Suporte-Resina foi utilizado o método do Sulfito a frio, na variação proposta por De Jonge e De Jong<sup>(64,78)</sup>, ligeiramente modificada para tecidos tratados conforme descrito por Bille e Peterson<sup>(81)</sup>.

Todos reagentes usados eram p.a., fornecidos pela Merck, Carlo Erba e Reagen, sendo usada vidraria normal de laboratório e Balança Analítica para as pesagens.

Em 50 ml de água destilada gelada ( $8^{\circ}\text{C}$ ), coloca-se cerca de 1000-1500 mg de Suporte-Resina, cortado em pedaços de  $1\text{ cm}^2$ .

Adiciona-se então 1 ml de sulfito de sódio 2N e 3-4 gotas de timolftaleína (caso a solução se torne azul, adiciona-se algumas gotas de carbonato de sódio 2N e neutraliza-se a mistura com ácido clorídrico 0,3N).

Deixa-se repousar por 7 minutos em banho de gelo ( $0^{\circ}\text{C}$ ).

Adiciona-se então 5 ml de ácido acético 1N e algumas gotas de solução de amido.

O excesso de sulfito de sódio usado é titulado com solução de iodo 0,1N.

O composto de adição formado entre o formaldeído livre presente e o sulfito: formaldeído-bissulfito, é decomposto pela adição de 10 ml de carbonato de sódio 2N e o sulfito livre é titulado com solução de iodo 0,1N ou 0,01N padronizada.

O volume de solução de iodo usada nesta última titulação deve ser anotado.

Em paralelo deve ser conduzida uma prova em branco com tecido não recoberto com resina.

Cálculos: % de formaldeído livre = A - B %

$$\text{onde } A = \frac{3 \times \text{volume (ml) usado de solução de iodo 0,1N}}{20 \times \text{peso da amostra de tecido tratado, em g}}$$

$$B = \frac{3 \times \text{volume (ml) usado de solução de iodo 0,1N}}{20 \times \text{peso da amostra de tecido sem resina, em g}}$$

### 3.11. Determinação da Concentração de Grupos Metilol no Suporte-Resina

Para determinação do formaldeído Metilol no Suporte-Resina, 2 métodos foram utilizados. Estes métodos foram descritos por De Jonge e De Jong<sup>(64,78)</sup> e De Jong<sup>(77,80)</sup> para medida de formaldeído metilol em resinas e adaptados aqui para medida de metilol em Tecidos tratados. Deve-se levar em conta que estes métodos medem concomitantemente o formaldeído livre, devendo o mesmo ser descontado do resultado do teste para se ter formaldeído Metilol.

Todos os reagentes usados eram p.a., fornecidos pela Merck, Carlo Erba e Reagen, sendo utilizada Balança Analítica para as pesagens e vidraria normal de laboratório.

#### A) Método Iodimétrico<sup>(64,78)</sup>

Em um erlenmeyer de 250 ml coloca-se 50 ml de água destilada e de 1500 a 3000 mg de Suporte-Resina cortados em pedaços de 1 cm<sup>2</sup>.

Adiciona-se 10 ml de NaOH 2N, e 25 ou 50 ml de solução

de iodo 0,1N, padronizada, gota a gota e com agitação.

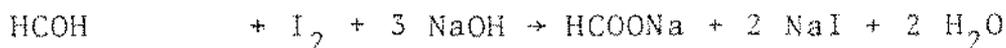
Deixa-se em repouso por 2 horas em geladeira ou banho de gelo, para se processar a hidrólise da resina com a liberação dos grupos metilol na forma de formaldeído.

Acidifica-se o meio com  $H_2SO_4$  2N (aproximadamente 10 ml) até o aparecimento de uma coloração marrom (coloração do iodo).

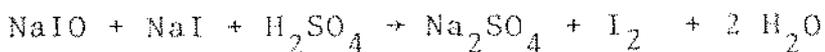
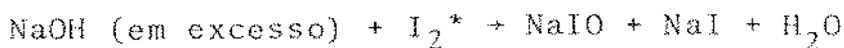
O excesso de iodo ( $I_2$ ) que é liberado pela adição de ácido, é então titulado com solução de tiosulfato de sódio 0,1N, padronizada, até o aparecimento de uma coloração amarelo-pálida.

Adiciona-se então algumas gotas de solução de amido e continua-se a titular até o desaparecimento da coloração azul.

Reações Envolvidas:



formaldeído



\*  $I_2$  que não participa da reação com formaldeído.

Cálculos

$$\% \text{ formaldeído} = \frac{(N_1 \times V_1) - (N_2 \times V_2)}{\text{massa da amostra, g}} \times 1,5$$

Metilol (e livre)

$N_1$  = Normalidade da solução de  $I_2$ ;

$N_2$  = Normalidade da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ;

$V_1$  = Volume da solução de iodo colocada no início, ml;

$V_2$  = Volume de solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , gastos na titulação, ml.

B) Método do Cianeto <sup>(77,80)</sup>

Em um erlenmeyer de 250 ml coloca-se 30 ml de água des  
tilada e adiciona-se cerca de 1500 mg de Suporte-Resina corta  
do em pedaços.

Adiciona-se em seguida 15 ml de cianeto de potássio  
0,1N e 5 ml de NaOH 2N. Deixa-se reagir por 2 horas ã tempera  
tura ambiente.

Neutraliza-se então com  $\text{HNO}_3$  2N, em presença de algu  
mas gotas de defenilcarbazona-azul de bromofenol, até o apare-  
cimento de uma cor amarelada.

Adiciona-se 10 ml de solução de piridina a 10% e neu  
traliza-se com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5N até aparecer uma cor amarelada.

Titula-se então com nitrato mercúrio 0,1N padroniza-  
do, até o aparecimento de uma cor violeta persistente.

Uma prova em branco é ensaiada em paralelo com tecido  
sem recobrimento.

Cálculos

$$\% \text{ formaldeído metilol} = \frac{3,103 (V_1 - V_2) \times N}{\text{massa da amostra, g}}$$

(e livre)

onde:

$V_1$  = Volume de solução de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  gasto com o Suporte-Resina,  
ml,

$V_2$  = Volume de solução de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  gasto com a prova em branco, ml;

$N$  = Normalidade da solução de  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ .

CAPÍTULO 4  
Resultados e Discussões

#### 4.1. Introdução

Iniciou-se este trabalho, pela seleção dos materiais e condições de preparação mais adequados, a partir da idéia de se produzir um suporte para imobilização de proteínas, composto por tecidos sintéticos recobertos por resinas com grupos N-metilol reativos, quando também se demonstrou a viabilidade de imobilização nestes suportes de diferentes antígenos, com possibilidade de determinações quantitativas em testes ELISA.

Realizou-se, a seguir, a caracterização do Suporte-Resina desenvolvido quanto à concentração de grupos N-metilol e a sua área superficial disponível para imobilização de proteínas, e a correlação destas propriedades com a capacidade de imobilização do Suporte-Resina, em termos de quantidade de proteína (antígeno ou anticorpo) imobilizada.

Visando a utilização prática de discos de Suporte-Resina com proteínas imobilizadas (discos sensibilizados), como imunosorvente em Testes ELISA, verificou-se a influência na quantidade de proteína imobilizada no Suporte-Resina, de certas condições da reação de imobilização consideradas relevantes em tal tipo de reação. As variáveis estudadas foram: pH do meio reacional, presença de eletrólitos, temperatura, tempo de reação e concentração da proteína.

Para obtenção de elementos para a discussão da natureza da ligação que ocorre entre o Suporte-Resina e a proteína, que pode ou não conferir estabilidade ao imunosorvente, tentou-se aplicar Modelos e Isotermas de Adsorção a dados ex

perimentais obtidos, em termos de concentração de equilíbrio da solução de sensibilização e quantidade de proteína ligada por disco de um Suporte-Resina selecionado, e para efeito de comparação, a dados de equilíbrio do mesmo tipo obtidos para superfícies de poliestireno. Ao mesmo tempo, realizou-se ensaios experimentais para testar a estabilidade da ligação à temperatura, tempo de estocagem, e presença de soluções com elevada tensão iônica (soluções eluentes).

Avaliou-se então, imunossorventes preparados a partir de um Suporte-Resina selecionado, com várias quantidades do anticorpo Anti-IgG ligadas, quanto à capacidade de captação de IgG em soluções a várias concentrações, com vistas à aplicação prática de discos sensibilizados em determinações quantitativas em Testes ELISA.

No Instituto de Medicina Tropical foi realizado por Markus Michael um estudo sistemático do desempenho de discos de Suporte-Resina com 35 g NMA/m<sup>2</sup> preparados pela autora, com antígeno de Trypanosoma cruzi imobilizado, em Testes ELISA para Doença de Chagas. Os resultados, discussões e figuras obtidas, que foram previamente apresentados por Michael et al<sup>(101)</sup> estão mostrados no item 4.7. deste Capítulo apenas a título de complementação da tese e mostram que o Teste ELISA com discos apresenta os mesmos níveis de especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade do Teste ELISA com placas de poliestireno.

Demonstrou-se ainda, a viabilidade de determinações quantitativas de anticorpos em Teste ELISA com disco, usando-se apenas uma diluição do soro em teste.

#### 4.2. Ensaio Preliminares visando a Seleção de Resinas, Condições de Polimerização e Tecidos Sintéticos para Preparação do Suporte-Resina

A utilização do Suporte-Resina estudado neste trabalho na preparação de imunossorventes para uso em testes imunoenzimáticos do tipo ELISA é original, tendo sido primeiramente descrita em 1983 por Bittencourt et al<sup>(103)</sup>. Neste trabalho o Suporte-Resina foi então investigado quanto as suas características de aplicação prática em tais testes.

Com o objetivo de demonstrar-se a viabilidade do uso do Suporte-Resina desenvolvido, composto por um tecido recoberto com resina, em testes imunoenzimáticos do tipo ELISA e de selecionar-se os sistemas (tecidos, resinas e condições de polimerização), que apresentassem resultados iniciais mais promissores para com eles desenvolver um estudo sistemático e aprofundado, foram realizados Ensaio Preliminares.

Suportes-Resina preparados com diversos tecidos: Nylon, Poliéster e Algodão, diversas resinas amínicas :urêia-formaldeído, melamina-formaldeído, urêia-formaldeído metilada, triazona e com N-metilolacrilamida, utilizando-se condições variáveis de polimerização: temperatura, tempo, tipo e porcentagem de catalisador, foram testados em ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA.

Fitas de Suporte-Resina de 1 cm x 2 cm, foram sensibilizadas com antígeno de Trypanosoma cruzi e utilizadas como imunossorvente. Para cada tipo de Suporte-Resina preparado foram testados dois soros, um positivo (chagásico) e um negativo

(nãochagásico), sendo a absorvância da solução colorida final, lida em espectrofotômetro.

Os resultados de alguns destes ensaios preliminares estão apresentados na Tabela 4.1.

Na Tabela 4.1, estão também relacionados os índices de reatividade específica do imunosorvente (Suporte-Resina mais proteína ligada), que é definido pela relação entre as absorvâncias lidas para o soro positivo (+) e para o soro negativo (-):

$$\text{Índice de Reatividade Específica} = \frac{\text{Absorvância do soro}(+)}{\text{Absorvância do soro}(-)}$$

Para que o imunosorvente tenha utilização viável em testes imunoenzimáticos, este Índice deve ser o maior possível, pelo menos maior que 5. Um bom Índice de Reatividade Específica é conseguido quando se obtêm altas leituras de absorvância para o soro positivo e baixas leituras para o soro negativo. Se a leitura de absorvância para o soro negativo for alta, significa que o imunosorvente está sofrendo Reações Inespecíficas ou Cruzadas, também chamadas de Reações de Fundo. Uma alta reação de fundo inviabiliza o imunosorvente, mesmo que a leitura para o soro positivo também seja alta. Do mesmo modo, uma alta absorvância para o soro positivo é sempre desejável, mesmo que ele apresente baixa leitura do soro negativo, pois isto demonstra uma boa reatividade, tanto do Suporte-Resina na ligação da proteína (no caso, antígeno), como do imunosorvente no Teste ELISA.

Tabela 4.1 - Reatividade no Teste ELISA de Suportes-Resina, preparados utilizando-se diferentes Tecidos, Resinas e Condições de Polimerização. Antígeno: Extrato de *Trypanosoma cruzi*. Soro Chagásico (+) e Não-Chagásico (-). Fitas de Nylon de 1 cm x 2 cm. Ensaio Preliminares: Testes ELISA para Doença de Chagas, de Ferreira et al (71)

Tecido	Resina (Fornecedor)	Catalisador (% usada)	Condições de Polimerização		% Retenção de Sólidos*	Absorvância		Índice de Reatividade Específica
			Tempo (min)	Temperatura, °C		Soro (+)	Soro (-)	
Nylon	N-metilolacrilamida (Cyanamid)	Persulfato de Amônio (5%)	5	130	21,3	0,620	0,085	7,5
Nylon	Melamina-formol (Resinac)	Sulfato de Amônio (5%)	3	150	27,3	0,450	0,000	-
Nylon	Uréia-formol (Ashland)	Sulfato de Amônio (5%)	5	130	19,2	0,540	0,025	21,6
Nylon	Triazona (Inpal)	Sulfato de Amônio (5%)	5	130	11,5	0,270	0,025	10,8
Nylon	Uréia-formol metilada (Inpal)	Sulfato de Amônio (5%)	5	130	11,5	0,400	0,095	4,2
Poliéster	N-metilolacrilamida (Cyanamid)	Persulfato de Amônio (5%)	5	130	16,0	0,800	0,100	8,0
Poliéster	Uréia-formol (Ashland)	Sulfato de Amônio (5%)	5	130	22,7	0,720	0,120	6,0
Algodão	N-metiloacrilamida (Cyanamid)	Persulfato de Amônio (5%)	5	130	24,0	0,520	0,145	3,6
Algodão	Uréia-formol (Ashland)	Sulfato de Amônio (5%)	5	130	25,4	0,480	0,095	5,0

\* % Retenção de sólidos = (massa de resina depositada/massa inicial do tecido) x 100.

Dos resultados destes ensaios preliminares , verificou-se que muitos dos sistemas testados: tecido, resina e de terminadas condições de polimerização, apresentaram viabilidade de uso na preparação de imunosorventes para utilização em Testes ELISA, embora alguns tenham apresentado uma reação de fundo para o soro negativo relativamente alta.

Os sistemas selecionados para continuidade dos estudos foram :

Resinas : N-metilolacrilamida ;  
Uréia-formaldeído, nas formas de dimetiloluréia e urona.

Tecidos Sintéticos: Nylon 6,6 ;  
Poliester (Politereftalato de etileno - PET)

Catalisador : Sulfato de Amônio, para resinas amínicas;  
Persulfato de Amônio, para N-metilolacrilamida

Condições de Polimerização : Temperatura : 130<sup>o</sup>C, Tempo: 5 minutos, divididos em pré-secagem (1 minuto) e polimerização (4 minutos); Quantidade de Catalisador : 5% em peso da massa de sólidos da solução de resina usada para impregnar o tecido.

Estes sistemas apresentaram altas leituras de absorvância para o soro positivo e baixas leituras para o soro negau

tivo.

Tecidos sintéticos de Nylon 6,6 e Poliéster (PET) foram selecionados, devido à alta relação de superfície que apre  
sentam para a deposição da camada de resina e por serem iner-  
tes às reações que se processam no teste imunoenzimático.

Nylon e Poliéster não recobertos com resinas, foram testados em testes imunoenzimáticos ELISA e não apresentaram ao final, desenvolvimento de coloração, ou seja, foram inertes às reações com as proteínas envolvidas no teste, demonstrando que a fixação das imunoproteínas, se dá exclusivamente na resina.

As condições de polimerização escolhidas são utilizadas rotineiramente em aplicações industriais, para os tipos de resinas selecionadas, garantindo, quando conjugadas com o uso da porcentagem de 5% de catalisador, em relação à massa total de sólidos constituintes da solução de resina (resina menos o solvente e resíduos de reagentes voláteis), uma boa conversão na polimerização. A variação destas condições não resultou em alterações significativas na reatividade do Suporte-Resina.

Na Tabela 4.1, observa-se que a concentração de resina em cada Suporte-Resina testado é diferente. Um estudo sobre a influência da quantidade de resina depositada sobre o Suporte-Resina, na sua capacidade de imobilização de proteína na reação de sensibilização será relatado mais adiante, para alguns dos sistemas selecionados nestes ensaios preliminares.

Outros testes preliminares foram realizados para demonstrar a viabilidade da utilização do Suporte-Resina desen-

volvido para a imobilização de vários tipos de antígeno, além do de Trypanosoma cruzi. Utilizou-se neste estudo várias diluições do soro em teste, para verificação da proporcionalidade entre a absorvância lida e a concentração de anticorpos no soro.

Foram utilizados discos de 8,3 mm de diâmetro de Nylon revestidos com N-metilolacrilamida, com retenção de sólidos de 9% e antígenos de doenças de origem parasitária: Doença de Chagas e Toxoplasmose e de origem virótica: Rubéola. Após a sensibilização os discos foram usados em Testes ELISA, como imunosorvente.

#### a) Teste ELISA para Doença de Chagas

Foi utilizado como antígeno extrato de Trypanosoma cruzi, a 100 mg/ml; conjugado enzimático anti-IgG-peroxidase a 1/2500 e ácido 5-amino-salicílico e  $H_2O_2$ , como solução cromogênica.

Os resultados obtidos estão na Tabela 4.2. Observou-se reações intensas, para os soros chagásicos ( $P_1$  e  $P_2$ ) e de fraca intensidade para os não-chagásicos ( $N_1$  e  $N_2$ ). A reatividade observada mostrou estreita proporcionalidade com as concentrações de anticorpos, expressas pelas diluições.

#### b) Teste ELISA para Toxoplasmose

Foi utilizado como antígeno extrato de Trypanosoma gondii a 100 mg/ml e demais reagentes utilizados para o Teste ELISA, para Doença de Chagas,

Os resultados apresentados na Tabela 4.3, mostram boa

proporcionalidade entre a intensidade de reação, dada pela absorvância lida, e a concentração de anticorpos no soro, dada pela diluição. Foram testados um soro positivo (P) e um negativo (N), a várias diluições, já previamente classificados por imunofluorescência e hemaglutinação.

### c) Teste ELISA para Rubéola

Foi utilizado antígeno do vírus da Rubéola, a várias diluições, na sensibilização dos discos de Suporte-Resina e um soro positivo, por hemaglutinação e imunofluorescência, a várias diluições. Como solução cromógena utilizou-se ortofenilnodi<sub>2</sub>amina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A Tabela 4.4 traz os resultados obtidos, em absorvâncias medidas.

Para cada diluição de antígeno utilizada na sensibilização, verificou-se boa proporcionalidade entre a intensidade da reação e a concentração de anticorpos no soro, dada pela diluição crescente do mesmo.

Quanto menor é a concentração da solução de sensibilização dos discos (mais diluído é o antígeno), menos proteína se liga ao Suporte-Resina, dando leituras de absorvância menores. Portanto, deve-se utilizar na sensibilização a mais alta concentração viável, para uma reatividade completa.

Os resultados mostrados nas Tabelas de 4.1 a 4.4, foram anteriormente apresentados por Ferreira et al<sup>(71)</sup>, no XI Concurso Nacional do Invento Brasileiro, em 1983, onde recebeu o Prêmio Governador do Estado de São Paulo.

Tabela 4.2 - Teste Imunoenzimático para Doença de Chagas - Absorvâncias para Soros Positivos ( $P_1$  e  $P_2$ ) e Negativos ( $N_1$  e  $N_2$ ), de Ferreira et al<sup>(71)</sup>

Soros	Diluições do Soro						
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280
$P_1$	0,867	0,745	0,535	0,304	0,181	0,114	0,056
$P_2$	0,764	0,490	0,351	0,208	0,130	0,070	0,038
$N_1$	0,305	0,151	0,078	-	-	-	-
$N_2$	0,285	0,169	0,075	-	-	-	-

Tabela 4.3 - Teste Imunoenzimático para Toxoplasmose. Absorvâncias para um Soro Positivo (P) e um Negativo (N), de Ferreira et al<sup>(71)</sup>

Soro	Diluições do Soro							
	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/1028
P	0,720	0,630	0,620	0,440	0,190	0,110	0,056	0,040
N	0,090	0,082	0,034	0,018	-	-	-	-

Tabela 4.4 - Teste Imunoenzimático para Rubéola - Absorvâncias medidas para um Soro Positivo, de Ferreira et al<sup>(71)</sup>

Diluições do Antígeno	Diluições do Soro				
	1/100	1/200	1/300	1/400	1/500
1/100	0,820	0,540	0,479	0,292	0,156
1/200	0,654	0,441	0,439	0,261	0,152
1/400	0,539	0,446	0,284	0,174	0,110
1/800	0,425	0,314	0,222	0,136	0,069
1/1600	0,209	0,135	-	0,092	0,052

Estes estudos preliminares demonstraram que, diferentes resinas, todas contendo o grupo N-metilol, depositadas e reticuladas sobre suportes inertes, produziram sistemas de grande potencial para utilização em Testes ELISA, de acordo com os resultados obtidos, com os diversos antígenos mencionados anteriormente.

O comportamento dos Suportes-Resina aqui utilizados em Testes ELISA, sugere uma reação covalente entre a resina e os antígenos, possivelmente por reações descritas na literatura<sup>(60,61)</sup>, envolvendo grupos N-metilol e grupos que são parte integrante dos antígenos (-OH, -NH<sub>2</sub>, -NH, entre outros)..

#### 4.3. Caracterização do Suporte-Resina Desenvolvido

Na caracterização do Suporte-Resina, assumindo-se ligação covalente entre a resina e a proteína, duas de suas

propriedades que influenciam o seu desempenho na reação de imobilização de imunoproteínas, são a concentração de grupos N-metilol e a área superficial disponível para a reação ocorrer.

#### 4.3.1. Concentração de Grupos Metilol no Suporte-Resina

A determinação da concentração de grupos metilol, presentes no Suporte-Resina, foi realizada através dos métodos de análise de formaldeído na forma metilol de De Jong e De Jonge<sup>(64,78)</sup> e do Cianeto<sup>(77,80)</sup>, e na forma livre pelo método do sulfito a frio na variação de De Jong e De Jonge<sup>(78,82)</sup>, todos aplicados para tecidos tratados com resina<sup>(81)</sup>.

A determinação do formaldeído livre é necessária, pois os métodos de análise de grupos metilol determinam concomitantemente o formaldeído livre, que deve ser descontado.

Na preparação dos Suportes-Resina foram usados diferentes tipos de resina e de tecidos sintéticos, que trouxeram algumas dificuldades na utilização do método de determinação de formaldeído na forma metilol de De Jong e De Jonge, que é um método iodimétrico.

Para o tecido de Nylon ocorreu a adsorção nas fibras, do Iodo utilizado no método como reagente (mais intensamente no tecido em branco), interferindo nos resultados. Para o Poliéster este inconveniente não ocorreu. Esta diferença parece decorrer da constituição química dos dois polímeros, sendo o poliéster também mais inacessível ao Iodo.

Já quando se mediu a concentração de grupos metilol pelo método iodimétrico, em tecidos de poliéster recobertos com N-metilolacrilamida (NMA), obtiveram-se concentrações de gru-

pos metilol decrescentes com o aumento da quantidade de resina depositada no tecido (Figura 4.1). A medida de formaldeído livre para os mesmos Suportes-Resina, pelo método do sulfito a frio, apresentou valores ligeiramente crescentes com a quantidade de resina depositada e sempre em torno de 100 ppm.

Esperava-se, entretanto, obter concentrações crescentes de grupos metilol no Suporte-Resina, com o aumento da quantidade de NMA nele depositada. Este comportamento contrário ao esperado pode ter resultado de dificuldades de acesso dos reagentes aos grupos metilol livres inclusos no retículo, por um maior grau de reticulação, obtido à medida que se aumenta a concentração de resina no suporte.

Tentou-se então utilizar o Método do Cianeto , para quantificar os grupos metilol no Suporte-Resina com NMA, mas também este método não se mostrou adequado, por apresentar grandes desvios inter-ensaios.

Como foi mostrado no ítem 2.7 deste trabalho, na literatura a grande polêmica sobre medida de formaldeído em tecidos tratados com resinas, refere-se ao formaldeído livre, devido a seu potencial carcinogênico, sendo a medida de formaldeído na forma metilol de menor interesse, com poucos resultados apresentados e poucos métodos desenvolvidos e discutidos.

Portanto, a aparente inadequação dos métodos utilizados para medida de grupos metilol para a resina N-metilolacrilamida, exige um estudo mais aprofundado, que foge ao escopo deste trabalho.

Já o sistema formado por tecido de Poliéster e Resina Urona (Permatron XP - Inpal), foi analisado quanto à concentra

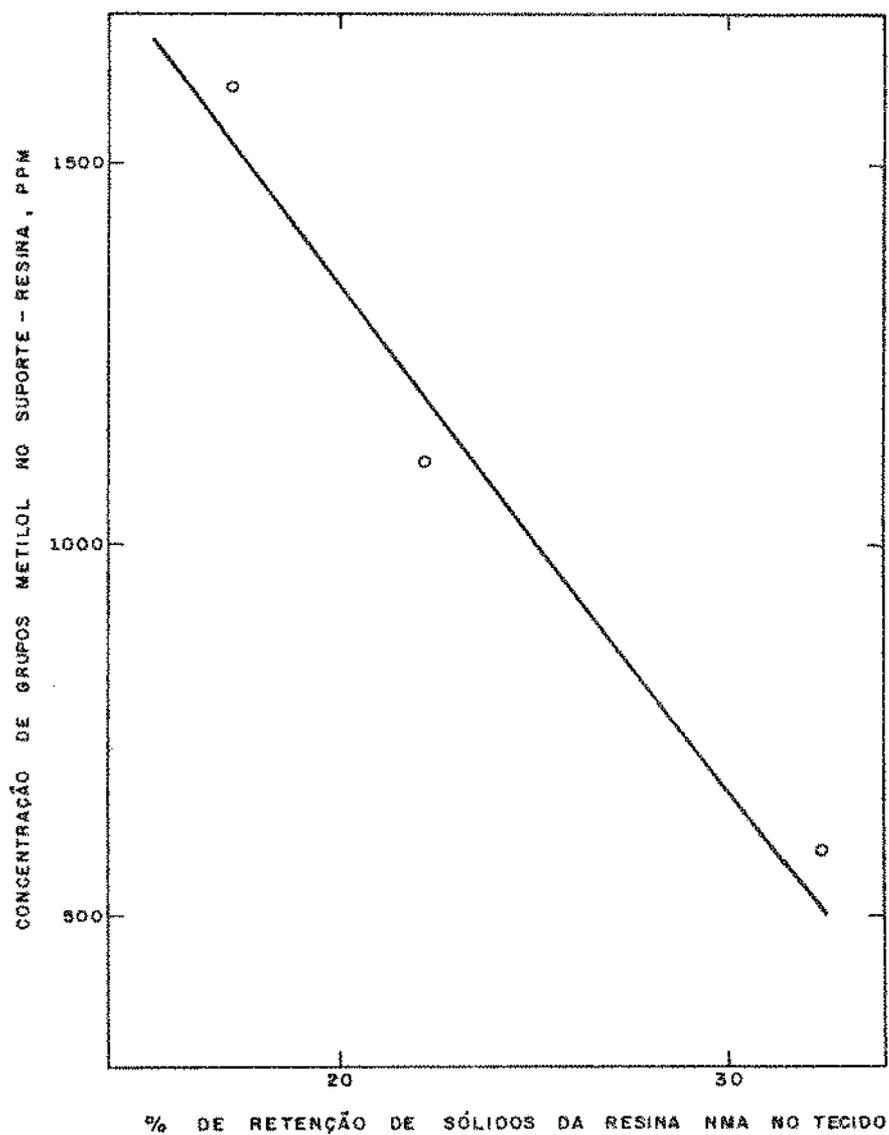


Figura 4.1 - Concentrações de Grupos Metilol, medidas pelo Método Iodimétrico de De Jong e De Jonge, em Malha de Poliester, com N-metilolacrilamida a várias porcentagens de Retenção de Sólidos

ção de grupos metilol pelo 2 métodos: Iodimétrico e do Cianeto, sem apresentar os problemas observados com a N-metilolacrilamida.

Os resultados obtidos para os Suportes-Resina a várias concentrações de resina Urona, em termos de formaldeído livre e grupos metilol, estão apresentados na Tabela 4.5. Nas Figuras 4.2 e 4.3, estão graficadas as concentrações de grupos metilol no Suporte-Resina medidas respectivamente pelos Métodos Iodimétrico e do Cianeto.

Na Tabela 4.5 verifica-se que a concentração de grupos metilol, em termos de porcentagem da massa total de resina depositada no Suporte-Resina, manteve-se praticamente constante, em média em torno de 5%, para todas as concentrações de resina Urona testadas e para os dois métodos usados. Isto mostra que mesmo se aumentando a quantidade de resina depositada, se conseguiu atingir os grupos metilol, inclusos no retículo, através dos métodos de análise empregados.

Os Suportes-Resina testados apresentaram baixos Índices de formaldeído livre, proporcionais à quantidade de resina depositada no Suporte-Resina (Tabela 4.5).

Correlacionado-se os dados das Figuras 4.2 e 4.3 através do Método dos Mínimos Quadrados, obteve-se relações lineares muito semelhantes, para os 2 métodos de análise utilizados, embora o ajuste não seja muito bom.

Valores aproximados da concentração de grupos metilol, para outras concentrações de resina Urona no Suporte-Resina, podem ser determinados através destas retas, que apresentam valores crescentes de grupos metilol, em relação à quantidade cres-

Tabela 4.5 - Concentrações de Grupos Metilol e Formaldeído Livre. Suporte-Resina: Malha de Poliester (179 g/m<sup>2</sup>) e Resina Urona (Permatron XP - Inpal) a várias concentrações

% Retenção de sólidos	g resina / m <sup>2</sup> de Suporte-Resina	g resina / g Suporte-Resina	Formaldeído livre ppm ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{g Suporte-Resina}}$ )	Grupos Metilol *			
				ppm ( $\frac{\mu\text{g}}{\text{g Suporte-Resina}}$ )		% da massa da Resina	
			Método do Sulfito a frio (82)	Método Iodimétrico (64)	Método Cianeto (77)	Método Iodimétrico (64)	Método Cianeto (77)
18,5	33	0,1556	130	7534	8093	4,7	5,2
16,1	29	0,1368	119	5844	5758	4,3	4,2
12,2	22	0,1038	98	5051	-	4,9	-
9,0	16	0,0755	116	4547	5374	5,8	7,1
6,9	12	0,0566	73	3647	2738	6,4	4,8
4,3	8	0,0377	87	1646	1678	4,4	4,5
						Média 5,1	Média 5,2

Os valores tabelados são médias de pelo menos 3 determinações (Erro intra-ensaio < 10%).

\* Nos valores de concentração de Grupos Metilol, já estão descontados os valores de formaldeído livre.

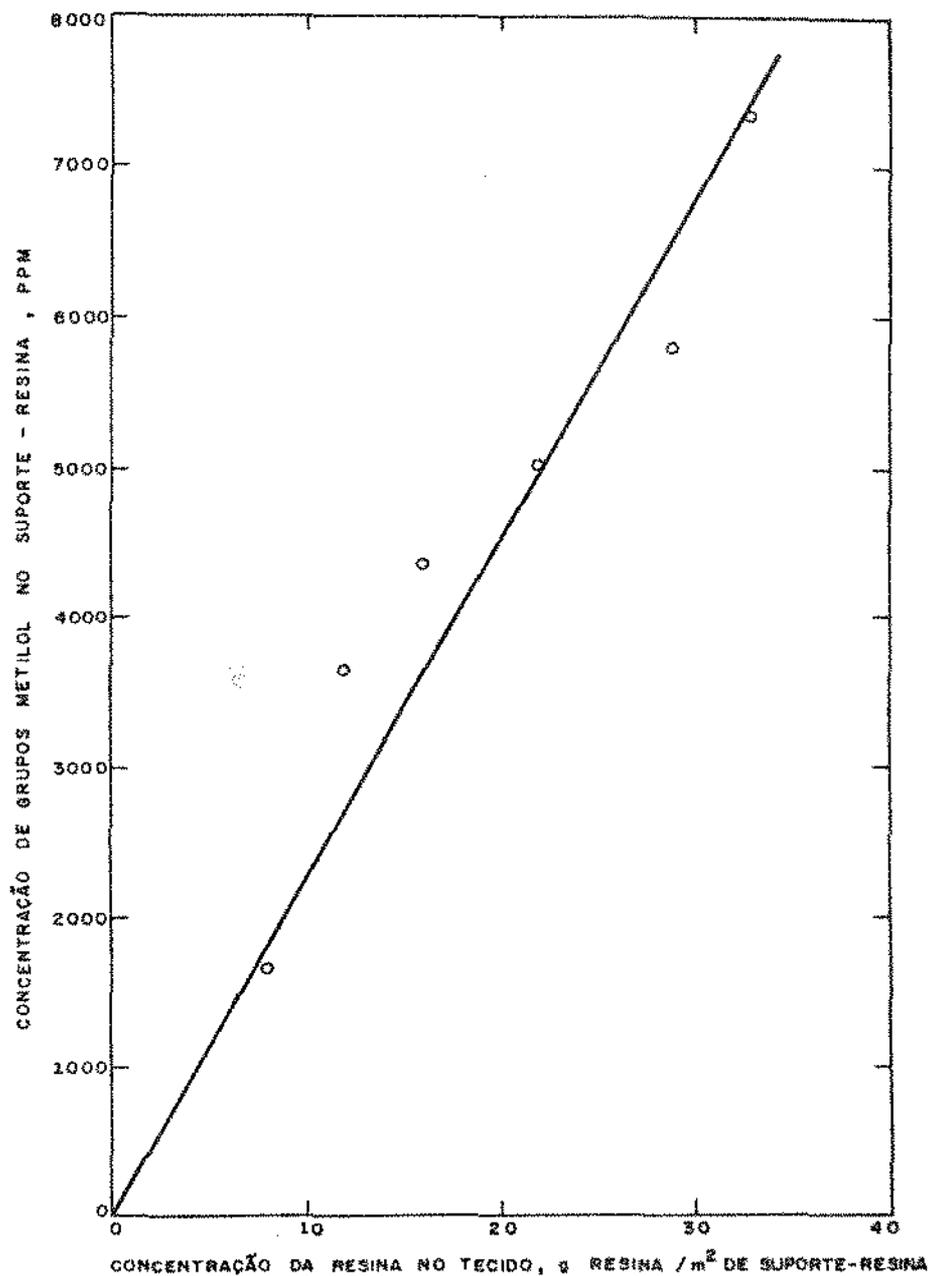


Figura 4.2 - Concentrações de Grupos Metilol , medidas pelo Método Iodimétrico de De Jong e De Jonge, em Malha de Poliester revestida com resina Urona, a várias concentrações

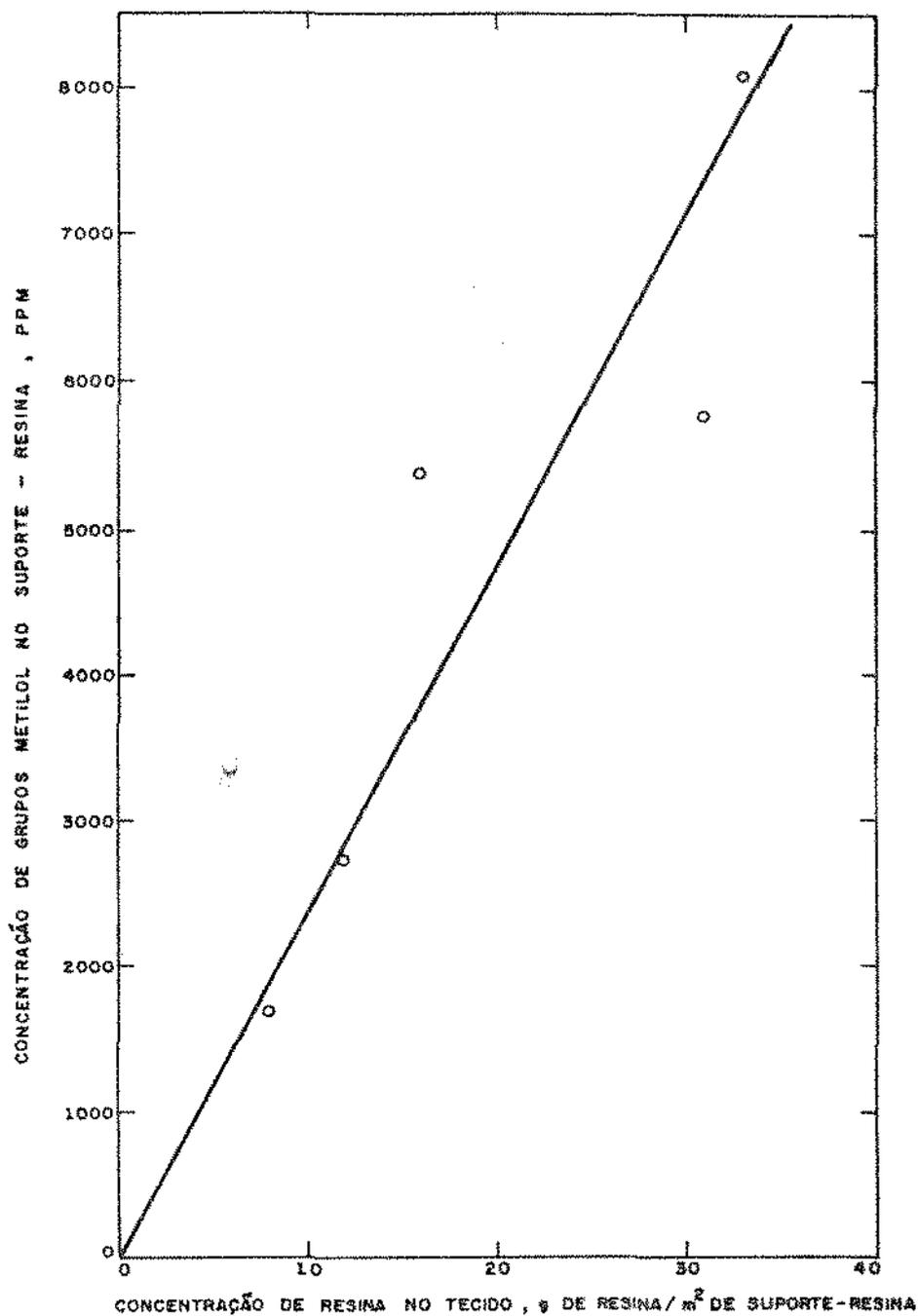


Figura 4.3 - Concentrações de Grupos de Metilol, medidas pelo Método do Cianeto, em Malha de Poliéster, revestida com resina Urona a várias concentrações

cente, de resina Urona depositada no Suporte-Resina.

Embora não tenha sido possível medir por estes métodos usados, a concentração de grupos metíol na resina NMA polimerizada, seria esperado um comportamento semelhante ao verificado para resina Urona.

#### 4.3.2. Área Superficial Disponível no Suporte-Resina para Imobilização de Proteínas

A capacidade de imobilização de proteínas de um suporte, é função de sua área superficial disponível para a ligação das moléculas. Dependendo do peso molecular e geometria da molécula que se deseja imobilizar, esta área pode estar limitada à superfície do suporte, embora ele apresente uma porosidade considerável.

No caso de superfícies plásticas lisas, a área disponível é obtida diretamente da superfície em contato com a solução de proteína, embora haja uma rugosidade que é desprezada.

No caso do Suporte-Resina desenvolvido, que é constituído por tecidos formados por fios compostos por filamentos muito finos, a área superficial disponível é dada pela soma das áreas de todos os filamentos, sendo naturalmente dezenas de vezes maior que a área aparente, medida no tecido como se fosse uma superfície lisa.

Dois tipos de malha de poliéster com gramaturas diferentes : 179 e 292 g/m<sup>2</sup>, foram principalmente usadas. (A gramatura, G, de um tecido, refere-se à quantidade de massa em gramas, que se tem por m<sup>2</sup> de tecido).

As áreas superficiais disponíveis destas malhas, foram

obtidas a partir das propriedades dos fios e filamentos que as constituem e estão apresentadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Áreas Superficiais Disponíveis em Malhas de Polyester

Malha	G	T <sub>f</sub>	N <sub>f</sub>	d <sub>f</sub>	A <sub>S</sub>
A	179	64,6	40	2,06 x 10 <sup>-5</sup>	29,9
B	292	45,6	34	2,47 x 10 <sup>-5</sup>	35,1

onde : A<sub>S</sub> = área superficial disponível da malha =

$$= G \times T_f \times N_f \times \pi \times d_f \left( \frac{m^2}{m^2 \text{ de malha}} \right) ;$$

$$G = \text{gramatura da malha} , \left( \frac{g}{m^2 \text{ de malha}} \right) ;$$

$$T_f = \text{título do fio} ; \left( \frac{m \text{ de fio}}{g \text{ de malha}} \right) ;$$

$$N_f = \text{número de filamentos por fio};$$

$$d_f = \text{diâmetro do filamento, (m)}.$$

Na Tabela 4.7, apresenta-se para as malhas A e B, os valores da área superficial disponível para discos de 8,3 mm de diâmetro, que são os usados neste trabalho e a partir do volume ocupado pelos filamentos que compõe o disco, a relação:

$$\frac{\text{área superficial disponível}}{\text{volume}}$$

Tabela 4.7 - Valores de Área Superficial Disponível por Disco e Relação área superficial para as Malhas de Poliéster A e B  
volume

Malha	Gramatura g/m <sup>2</sup>	<u>Área Superficial</u> disco cm <sup>2</sup> /disco	<u>Volume</u> disco cm <sup>3</sup> /disco	<u>Área superficial</u> volume cm <sup>-1</sup>
A	179	16,1	8,3x10 <sup>-3</sup>	1940
B	292	18,9	11,7x10 <sup>-3</sup>	1619

Os valores das Tabelas 4.6 e 4.7 referem-se às malhas de poliéster, ainda não recobertas com resina.

Como se vê na Tabela 4.7, as relações área superficial/volume para as malhas usadas são bastante altas, resultando na possibilidade de se oferecer, uma grande área disponível para ligação de imunoproteínas num volume pequeno, como desejado para a utilização dos discos em Testes ELISA.

Quando se recobre os tecidos com resinas, deposita-se sobre os filamentos, uma camada de resina polimerizada de pequena espessura, em comparação com o diâmetro do filamento. A espessura da camada vai variar, de acordo com a quantidade de resina depositada no tecido.

No caso das malhas já recobertas com resina, para baixas porcentagens de retenção de sólidos da resina, em torno de 10%, considerou-se a área superficial disponível por disco, para a imobilização de proteínas, como sendo a mesma calculada para os 2 tipos de malha utilizadas, sem o recobrimento.

Isto porque, até esta concentração, considerou-se que a resina recobre perfeitamente os filamentos da malha, sem haver grandes acúmulos nos interstícios formados pelo entrelaçamento dos fios. Até esta concentração de resina o tecido mantém a mesma flexibilidade original.

Para porcentagens de retenção de resina maiores, acima de 20%, começa a se formar uma camada mais espessa de resina polimerizada, ocorrendo o depósito da resina entre os fios, como se pode notar pela rigidez que o tecido adquire. Isto pode provocar uma diminuição da área superficial disponível para a imobilização, a menos que a camada de resina altamente reticulada apresente poros suficientemente grandes, para o acesso das macromoléculas de proteínas envolvidas, que têm peso molecular de até 160000 e tamanho em torno de 250 Å de eixo longitudinal, por 40 Å de eixo transversal. Os poros teriam que ser grandes, o que não é característico destes polímeros altamente reticulados.

A imobilização das proteínas na resina parece ser um fenômeno essencialmente superficial, pois mesmo que existam grupos N-metilol livres, no interior do retículo da resina, devido ao tamanho das macromoléculas de proteína (antígenos e anticorpos) em questão, provavelmente apenas os grupos N-metilol livres à superfície poderão reagir.

#### 4.4. Estudo das Variáveis que influenciam a Quantidade de Proteína Imobilizada no Suporte-Resina na Reação de Imobilização

Para um suporte se adequar ao uso em testes imunoenzi

máticos, ele deve imobilizar uma quantidade de proteína suficientemente alta, por unidade de área ou peso, de modo a possibilitar determinações quantitativas.

Assumindo-se que a ligação da proteína ao Suporte-Resina se dá através dos grupos N-metilol livres presentes na resina, as variáveis características do Suporte-Resina que deveriam afetar a quantidade de proteína que nele se poderia imobilizar, seriam a quantidade de resina depositada e a concentração de grupos N-metilol do Suporte-Resina.

Outras variáveis de influência na quantidade de proteína que se conseguiria ligar ao Suporte-Resina, referem-se às condições nas quais a reação de imobilização, também chamada de reação de sensibilização, é processada, tais como : pH do meio reacional, concentração de eletrólitos, temperatura, tempo de reação e concentração da proteína na solução de sensibilização.

No estudo realizado sobre a influência das variáveis acima citadas, duas técnicas relatadas a seguir, foram usadas para medir a quantidade de proteína imobilizada no Suporte-Resina.

Medidas indiretas foram obtidas através de Testes ELISA realizados para soros positivos e negativos, ensaiados a várias diluições, onde foram usados discos recobertos com vários tipos de resina com diferentes quantidades depositadas, sensibilizados com vários tipos de antígeno, sob diferentes condições de reação de imobilização (pH, temperatura e tempo de reação).

Para quantificação direta da massa de proteína

imobilizada no Suporte-Resina, utilizou-se a técnica do Radio imunoensaio, onde discos recobertos com vários tipos de resina, com diferentes quantidades depositadas, foram sensibilizados com soluções do anticorpo Imunoglobulina G humana (IgG), a várias concentrações, com IgG -  $^{125}\text{I}$  como traçador, sob diferentes condições de reação de imobilização (pH, temperatura e tempo de reação). A partir da radioatividade medida para cada disco de Suporte-Resina, após a reação de imobilização, obteve-se a quantidade de IgG imobilizada.

Em radioimunoensaios utiliza-se anticorpos como a IgG, ao invés de antígenos, devido às maiores facilidades de purificação e marcação com  $^{125}\text{I}$ .

Outra possibilidade para quantificação da proteína imobilizada ao Suporte-Resina, que foi testada sem sucesso, é a determinação da quantidade de proteína que resta na solução, após a reação de imobilização (incorporando-se também as águas de lavagem), através de métodos espectrofotométricos para medida de proteína, como o de LOWRY<sup>(96)</sup>. Este método é entretanto, muito afetado em sua sensibilidade, quando soluções de concentrações muito baixas estão envolvidas, como ocorre neste trabalho.

#### 4.4.1. Influência da Quantidade de Resina Depositada e da Concentração de Grupos N-metilol do Suporte-Resina

Discos de Suportes-Resina de 8,3 cm de diâmetro preparada com tecido de Nylon e Malha de Poliéster ( $179 \text{ g/m}^2$ ) com diferentes quantidades depositadas das resinas: dimetilolurêia (Argos), Urona (Permatron XP - Inpal) e N-metilolacrilamida

(NMA - Hoechst), sensibilizados com antígenos de Toxoplasmose e Doença de Chagas, foram utilizados em Testes ELISA, onde foram ensaiados soros positivos e negativos a várias diluições. Os resultados obtidos em absorvância estão apresentados nas Tabelas 4.8, 4.9 e 4.10.

Discos de Suportes-Resina preparados com Malha de Poliester ( $179 \text{ g/m}^2$ ), com diferentes quantidades depositadas das resinas Urona (Permatron XP - Inpal) e NMA (Hoechst), foram sensibilizados com soluções do anticorpo IgG, nas concentrações de 10, 20 e  $50 \frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$ , diluídas em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2; com IgG -  $^{125}\text{I}$  como traçador. Usou-se 2,5 ml de solução/disco. Os resultados obtidos a partir da radioatividade medida por disco, expressos em  $\frac{\mu\text{g IgG ligada}}{\text{disco}}$ , estão apresentados na Tabela 4.11.

Observando-se os resultados dos Testes ELISA e Radioimunoensaios, realizados para os vários sistemas testados, verifica-se que as quantidades de proteína imobilizadas nos discos, no caso dos Testes ELISA indicadas pelas leituras de absorvância, não se mostraram proporcionais à quantidade de resina depositada no suporte e conseqüentemente à concentração de grupos N-metilol livres na resina.

Nas Tabelas 4.10 e 4.11, os resultados obtidos para várias concentrações das resinas Urona e NMA, mostram que a reatividade do Suporte-Resina, para as concentrações testadas, tem uma tendência a diminuir com o aumento da quantidade de resina depositada.

Na Tabela 4.11, verifica-se que o Suporte-Resina com NMA, ligou praticamente a mesma quantidade de IgG por disco,

Tabela 4.8 - Absorvâncias medidas em Testes ELISA para Toxoplasmosse, usando discos de 8,3 mm de diâmetro de Nylon e resinas dimetilolurêia (Argos) e NMA (Cyanamid), a diferentes % de retenção de sólidos no suporte, sensibilizados com antígeno de Toxoplasmosse, na concentração de 146 µg/ml. (Soro positivo (+) e negativo (-), a várias diluições).

Resina		Dimetilolurêia			NMA		
% de Retenção de sólidos		7,4	12,5	15,9	5,7	8,5	
Soro (+)	Diluições	1/16	1,746	1,325	1,219	1,867	1,841
		1/256	0,526	0,514	0,541	0,750	0,674
		1/1000	0,204	0,244	0,225	0,279	0,299
		1/4000	0,074	0,076	0,036	0,086	0,104
		1/8000	0,036	0,030	0,000	0,041	0,061
Soro (-)	Diluições	1/16	0,166	0,127	0,153	0,596	0,493
		1/256	0,060	0,036	0,016	0,117	0,096
		1/1000	0,015	0,021	0,000	0,039	0,041
		1/4000	0,009	0,000	0,000	0,026	0,020
		1/8000	0,008	0,000	0,000	0,016	0,021

Tabela 4.9 - Absorvâncias medidas em Teste ELISA para Toxoplasmose, usando discos de Malha de Poliéster ( $179 \text{ g/m}^2$ ) e resina Urona-Permatron XP(Impal), a várias concentrações, sensibilizados com antígeno de Toxoplasmose, na concentração de  $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . (Soro positivo (+) e Soro negativo (-), a várias diluições)

Concentração de resina no suporte, $\frac{\text{g}}{\text{m}^2}$			49,2	21,5	9,7
Concetração de grupos Metilol no Suporte-Resina, ppm*			11070	4800	2160
Soro (+)	Diluições	1/16	1,468	1,600	1,978
		1/64	1,133	1,254	1,302
		1/256	0,643	0,741	0,782
		1/1000	0,342	0,312	0,387
Soro (-)	Diluições	1/16	0,000	0,156	0,240
		1/64	0,015	0,088	0,127
		1/256	0,003	0,018	0,080
		1/1000	0,001	0,006	0,050
Absorvância para o Tampão-Controle			0,000	0,020	0,021

\* Valores obtidos da Figura 4,2, em ppm ( $\frac{\mu\text{g grupos Metilol}}{\text{g de Suporte-Resina}}$ )

Tabela 4.10 - Absorvâncias Medidas em Testes ELISA para Doença de Chagas, usando discos de Malha de Poliéster ( $179 \text{ g/m}^2$ ) e resinas Urona Permatron XP (Impal) e NMA (Hoechst) a diferentes concentrações, sensibilizados com antígeno de Doença de Chagas na concentração de  $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . (Soros positivos: X e Y e soros negativos: W e Z, ensaiados a diluição de  $1/100$ )

Resina		Urona			NMA		
% de Retenção de sólidos no suporte		9	13	17	10	23	34
Concentração de resina no suporte, $\frac{\text{g}}{\text{m}^2}$		16,1	23,3	30,4	17,9	40,3	61,2
Soros positivos	X	1,300	1,130	1,590	1,860	1,870	1,590
	Y	1,750	1,285	1,785	1,785	1,860	1,590
Soros negativos	W	0,000	0,000	0,000	0,130	0,110	0,045
	Z	0,055	0,020	0,170	0,070	0,125	0,000

Os valores tabelados são médias de duplicatas, sendo que a NMA apresentou melhor reprodutibilidade

Tabela 4.11 - Quantidades do Anticorpo IgG ligadas por disco de Suporte-Resina, medidas por Radioimunoensaio, para discos de 8,3 mm de diâmetro de Suportes-Resina de Malha de Poliéster ( $179 \text{ g/m}^2$ ) e resinas Urona Permatron XP (Inpal) e NMA (Hoechst) a diferentes concentrações, para diferentes concentrações de IgG na solução de sensibilização. Volume de solução usada : 2,5 ml/disco. Resultados expressos em  $\mu\text{g}$  IgG ligada/disco. (Valores médios de triplicatas)

Resina		Urona			NMA		
% de Retenção de sólidos		9	13	17	10	23	34
Concentração da Resina no Suporte, $\text{g/m}^2$		16,5	23,3	30,4	17,9	40,3	61,2
Concentração da solução de sensibilização dos discos, $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$	10	5,6	3,1	2,4	8,7	11,3	8,5
	20	10,5	6,0	4,3	13,9	14,6	14,3
	50	13,7	9,2	13,1	28,0	28,2	22,5
Concentração de grupos Metilol do Suporte-Resina, ppm*		5600	5242	6840			

\* Valores obtidos da Figura 4.2, em ppm ( $\frac{\mu\text{g de grupos Metilol}}{\text{g de Suporte-Resina}}$ )

para as % retenção de sólidos no suporte de 10 e 25 e menor quantidade para a % de retenção de sólidos de 34.

Estas características de constância e principalmente de diminuição da capacidade de ligação de proteínas do Suporte-Resina, com o aumento da quantidade de resina nele depositada, indicam um controle da reação pela área superficial disponível no Suporte-Resina para a reação de imobilização, associada à geometria das moléculas de proteína.

Na realidade, quanto maior for a quantidade de resina depositada no Suporte-Resina, mais espessa será a camada depositada sobre os filamentos, diminuindo a área superficial específica do Suporte-Resina, que é dada inicialmente pelo somatório das áreas superficiais específicas dos filamentos, que compõem os fios. Com o aumento da quantidade de resina depositada, inicia-se então a ligação dos filamentos pela resina, diminuindo ainda mais a relação área/volume do Suporte-Resina.

Assim, a quantidade de moléculas de proteína que se consegue imobilizar na superfície do retículo resinoso, através da interação direta com grupos N-metilol, estaria limitada pela área superficial total disponível para ligação e pela área que cada molécula de proteína ocuparia dessa superfície, para se ligar. Como as moléculas de antígeno e anticorpos têm altos pesos moleculares e apresentam um formato tridimensional complexo, dependendo da forma como a molécula se ligar à superfície, ela poderá ocupar maior ou menor área.

Outrossim, sendo a concentração de grupos N-metilol no Suporte-Resina e na superfície do retículo resinoso, suficientemente alta, para a faixa de quantidades de resina deposi

tadas nos suportes estudada neste trabalho, a quantidade de proteína ligada seria função apenas da área superficial específica.

Deve-se ressaltar, que para os suportes desenvolvidos para ligação covalente de proteínas, descritos na literatura (32,33,37,53,54), não foram realizados estudos mais detalhados sobre a capacidade de ligação dos suportes, assumindo-se apenas ligação covalente.

Para avaliar os pontos acima considerados, far-se-ã , para um disco de 8,3 mm de diâmetro do Suporte-Resina apresentado na Tabela 4.9, composto por Malha de Poliéster ( $179 \text{ g/m}^2$ ) e 21,5 g de resina Urona XP/ $\text{m}^2$  de Suporte-Resina, com área superficial disponível de  $16,1 \text{ cm}^2$ , estimativas da ordem de grandeza da densidade de grupos N-metilol superficiais e da quantidade do anticorpo IgG, que se poderia imobilizar por unidade de área de Suporte-Resina.

A concentração de grupos metilol deste Suporte-Resina é de 4800 ppm ( $\frac{\mu\text{g de grupos Metilol}}{\text{g de Suporte-Resina}}$ ), ou seja,

$$4,8 \times 10^{-3} \frac{\text{g de grupos Metilol}}{\text{g de Suporte-Resina}}$$

Considerando-se, entretanto, que os grupos Metilol são tão localizados na resina e que se tem :

$$\frac{0,1063 \text{ g de Resina Urona polimerizada}}{\text{g de Suporte-Resina}}, \text{ tem-se então :}$$

$$\frac{4,5 \times 10^{-2} \text{ g de grupos Metilol}}{\text{g de resina Urona polimerizada}}$$

Para cada disco deste Suporte-Resina, tem-se  $1,1 \times 10^{-3}$  g de resina Urona, ou seja,  $4,9 \times 10^{-5}$  g de grupos Metilol. Sendo o peso molecular do grupo metilol igual a 31, tem-se portanto,  $9,6 \times 10^{17}$  grupos metilol por disco.

Para este Suporte-Resina, pode-se fazer uma estimativa da espessura da camada de resina que reveste os filamentos de poliéster do disco, a partir da massa específica da resina Urona polimerizada que é da ordem de  $1,5 \text{ g/cm}^3$ . Sabendo-se que a massa depositada por disco é de  $1,1 \times 10^{-3}$  g ou seja,  $6,8 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$ , tem-se portanto uma espessura da camada de resina de cerca de 5000 Å.

Considerando-se agora que os grupos Metilol possivelmente aptos a reagir com as moléculas de proteína, se limitam àqueles localizados na superfície da camada de resina, toma-se então uma espessura de 10 Å desta camada, para estimar a ordem de grandeza da densidade superficial de grupos Metilol, obtida da porcentagem que representa do total de grupos Metilol medido.

Lembrando-se que o filamento de poliéster tem um formato cilíndrico, fazendo-se os cálculos necessários, verifica-se que o volume desta camada de 10 Å corresponde a 0,2% do volume total da camada de resina de 5000 Å, ou seja, apenas 0,2% dos grupos Metilol medidos, estariam à superfície.

Ter-se-á portanto, à superfície da camada de resina, cerca de  $1,2 \times 10^{14}$  grupos Metilol/cm<sup>2</sup>.

Para se realizar a estimativa da quantidade do anticorpo IgG, que se poderia ligar por cm<sup>2</sup> de área do Suporte-Resina, sabe-se que a molécula de IgG é formada por 3 sub-unidades

compactas, ligadas entre si por ligações peptídicas flexíveis (região das dobradiças - Figura 2.4), que ao microscópio eletrônico apresenta-se como um cilindro com cerca de  $250 \text{ \AA}$  de eixo maior e  $40 \text{ \AA}$  de eixo menor<sup>(4)</sup>, apresentando um peso molecular de 160000.

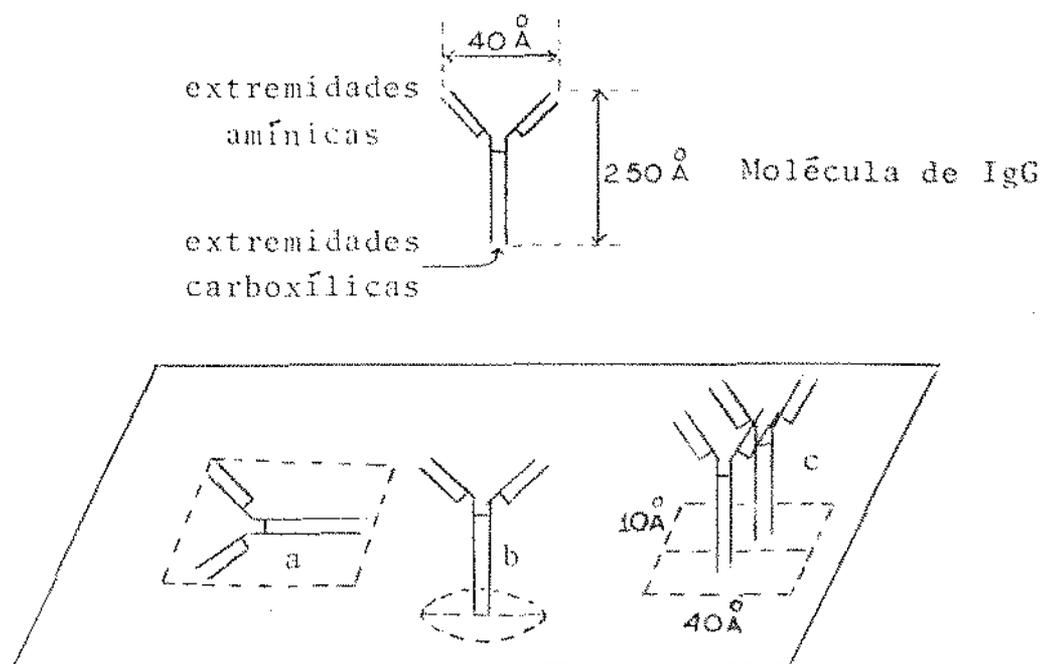


Figura 4.4 - Formas de Ligação da Molécula de IgG à superfície

Dependendo portanto, da forma como a molécula de IgG se liga à superfície, como se vê na Figura 4.4, maior ou menor área é comprometida nesta ligação.

Caso a ligação da molécula se dê através de vários grupos das cadeias proteicas com grupos Metilol, ela poderá ficar praticamente paralela à superfície, ocupando uma área aproximada de até  $10000 \text{ \AA}^2$  ( $40 \text{ \AA} \times 250 \text{ \AA}$ ) (Figura 4.4.a).

Caso a ligação da molécula se dê perpendicularmente ao eixo maior, a área comprometida poderá ser de até  $1250 \text{ \AA}^2$  (área

da base do cilindro da molécula] (Figura 4.4.b),

Valores de área ocupada por molécula de IgG, poderão diminuir se uma ligação mais compacta das moléculas, de maneira perpendicular ao eixo maior, lado a lado, puder se efetuar, como acontece com moléculas de corante, que chegam inclusive a formar cristais.

Isto vai depender das interações que se processam entre as macromoléculas de IgG, ligadas à superfície.

Uma menor concentração de IgG na solução em contato com a superfície deve favorecer a ligação da molécula de IgG em multipontos, enquanto que uma concentração maior deve favorecer uma diminuição da área ocupada, por induzir uma aproximação maior das moléculas, que tenderão a se ligar em menor número de pontos, cada vez mais perpendicularmente à superfície.

Assumindo-se que moléculas de IgG se ligassem perpendicularmente à superfície, na direção de seu maior eixo, lado a lado, supondo-se que cada uma se movesse apenas dentro de um espaço de  $10 \text{ \AA}$  por  $40 \text{ \AA}$  (medida do menor eixo), ter-se-ia uma área ocupada de  $400 \text{ \AA}^2$  por molécula de IgG (Figura 4.4.c).

Para as áreas estimadas para ligação de cada molécula de IgG, de  $10000 \text{ \AA}^2$ ,  $1250 \text{ \AA}^2$  e  $400 \text{ \AA}^2$ , poder-se-ia ligar respectivamente,  $1,0 \times 10^{12}$ ;  $8,0 \times 10^{12}$  e  $25,0 \times 10^{12}$  moléculas de IgG/cm<sup>2</sup> de superfície.

Comparando-se os valores obtidos, com a densidade superficial de grupos Metilol estimada, que é da ordem de  $1,2 \times 10^{14}$  grupos Metilol/cm<sup>2</sup>, verifica-se que se teria a disponibilidade de 120, 15 ou 5 grupos Metilol por molécula de IgG, o que indica um excesso de grupos Metilol à superfície, mesmo

para a menor área estimada por molécula.

Uma maior concentração de resina no Suporte-Resina resultaria numa camada mais espessa da mesma, envolvendo os filamentos de poliéster. Entretanto, o número de grupos Metilol disponíveis à superfície ficaria praticamente constante e em excesso, como demonstrado anteriormente.

Os resultados obtidos nestes experimentos, em termos da quantidade de proteína imobilizada, em relação à quantidade de resina depositada no Suporte-Resina e à concentração de grupos Metilol, indicam que uma primeira camada de proteína é imobilizada na superfície da resina polimerizada, possivelmente através da ligação covalente com grupos N-metilol disponíveis à superfície, que de acordo com as estimativas realizadas parecem estar em excesso, em relação a quantidade de proteína que se poderia imobilizar. A densidade superficial de grupos N-metilol no retículo da resina parece ser praticamente independente da quantidade de resina depositada.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11, considerando-se, que a resina NMA apresentou uma capacidade de ligação de proteínas superior à das demais resinas testadas, que se verificou um aumento das leituras de absorvância nos Testes ELISA realizados, quando se usou baixas quantidades de resina depositadas no Suporte-Resina e que se verificou uma diminuição da capacidade de ligação de imunoproteínas, para Suporte-Resina com quantidades depositadas da resina NMA superiores a  $40 \text{ g/m}^2$ , escolheu-se o Suporte-Resina preparado com Malha de Poliéster com gramatura de  $292 \text{ g/m}^2$  (maior área superficial disponível por disco) e resi-

na NMA na concentração de  $35 \text{ g/m}^2$  de Suporte-Resina (12% de Retenção de Sólidos no suporte), para uso na maioria dos ensaios realizados para caracterização e avaliação de desempenho do Suporte-Resina desenvolvido neste trabalho, que serão relatados adiante.

#### 4.4.2. A Influência do pH, Concentração de Eletrólitos, Temperatura e Tempo de Reação

Com a finalidade de se determinar condições de reação de imobilização para discos de Suporte-Resina, visando o controle da quantidade de proteína imobilizada, e a aplicação prática destes discos em Testes ELISA como imunosorvente, realizou-se ensaios para fixar as variáveis que normalmente são consideradas relevantes para reações de imobilização de proteínas a suportes em geral, usados em Testes Imunoenzimáticos.

As variáveis estudadas foram: pH do meio reacional, concentração de eletrólitos, temperatura e tempo de reação.

Já foi visto anteriormente (Tabela 4.11), que a quantidade de proteína imobilizada no Suporte-Resina, é diretamente proporcional à concentração da solução.

##### 4.4.2.1. A influência do pH do meio reacional e da concentração de eletrólitos

Como a fixação de proteínas ao Suporte-Resina se trata da ligação entre macromoléculas, o pH do meio reacional pode ter uma grande influência na quantidade de proteína ligada, como acontece por exemplo na adsorção de proteínas à

superfícies de poliestireno, que é favorecida por pH básico (pH 9,5).

Para se determinar o pH do meio reacional mais conveniente, foram realizados Radioimunoensaios, onde discos de 8,3 mm de diâmetro de malha de Poliéster ( $179 \text{ g/m}^2$ ), recobertos com NMA (Hoechst) nas concentrações de 17,9 e 40,0 g de resina/ $\text{m}^2$  de Suporte-Resina, foram sensibilizados com soluções do anticorpo IgG humano, nas concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g IgG/ml}$  (com traços de IgG -  $^{125}\text{I}$ ), por 18 horas, a  $22^\circ\text{C}$ , com agitação contínua. Foram usados 10 ml de solução de sensibilização/ 3 discos de Suporte-Resina.

As diluições da proteína IgG foram feitas com tampões de três diferentes pHs.:

pH 4,4 : Tampão Acetato de Sódio 0,1 M;

pH 7,5 : Tampão Fosfato (PBS) 20 mM;

pH 9,5 : Tampão Bicarbonato-Carbonato 0,1M.

Os resultados obtidos, como médias de triplicatas, expressos em  $\mu\text{g IgG ligada/disco}$ , estão apresentados na Tabela 4.12 e na Figura 4.5, de onde se verifica que embora se liguem boas quantidades da proteína para os 3 pHs testados, o pH neutro se mostrou o mais eficiente, principalmente quando a oferta da proteína por disco, foi maior (167  $\mu\text{g}$  de IgG/disco).

Para uma oferta menor da proteína (34  $\mu\text{g IgG/disco}$ ), embora o pH neutro ainda tenha-se mostrado como o mais eficiente, as quantidades de proteína ligada por disco são aproximadamente iguais para os 3 meios. O pH que se mostrou mais inconveniente foi o básico (pH 9,5), ligando em todos os casos as

menores quantidades de proteína por disco.

Tabela 4.12 - Quantidade de IgG ligada por disco de Suporte-Resina, em função do pH do meio reacional. Resultados expressos em  $\frac{\mu\text{g IgG ligada}}{\text{disco}}$

Suporte-Resina		18 g de NMA		40 g de NMA	
		$\text{m}^2$ de Suporte-Resina		$\text{m}^2$ de Suporte-Resina	
Concentração da solução de sensibilização, $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$		10	50	10	50
Massa de proteína oferecida/disco $\mu\text{g IgG}$		34	167	34	167
Tampões Utilizados	Acetato pH. 4,4	6,6	14,0	5,5	12,9
	Fosfato pH. 7,5	7,1	15,5	6,7	19,5
	Carbonato pH. 9,5	5,1	8,6	5,0	8,9

Estes resultados foram confirmados por Testes Imunoenzimáticos ELISA, realizados com discos de Suporte-Resina de Nylon, recobertos com N-metilolacrilamida, com retenção de sólidos de 12,6%, sensibilizados com soluções de IgG, diluídas a várias concentrações com tampão acetato de pH 4,0 e tampão carbonato de pH 9,0.

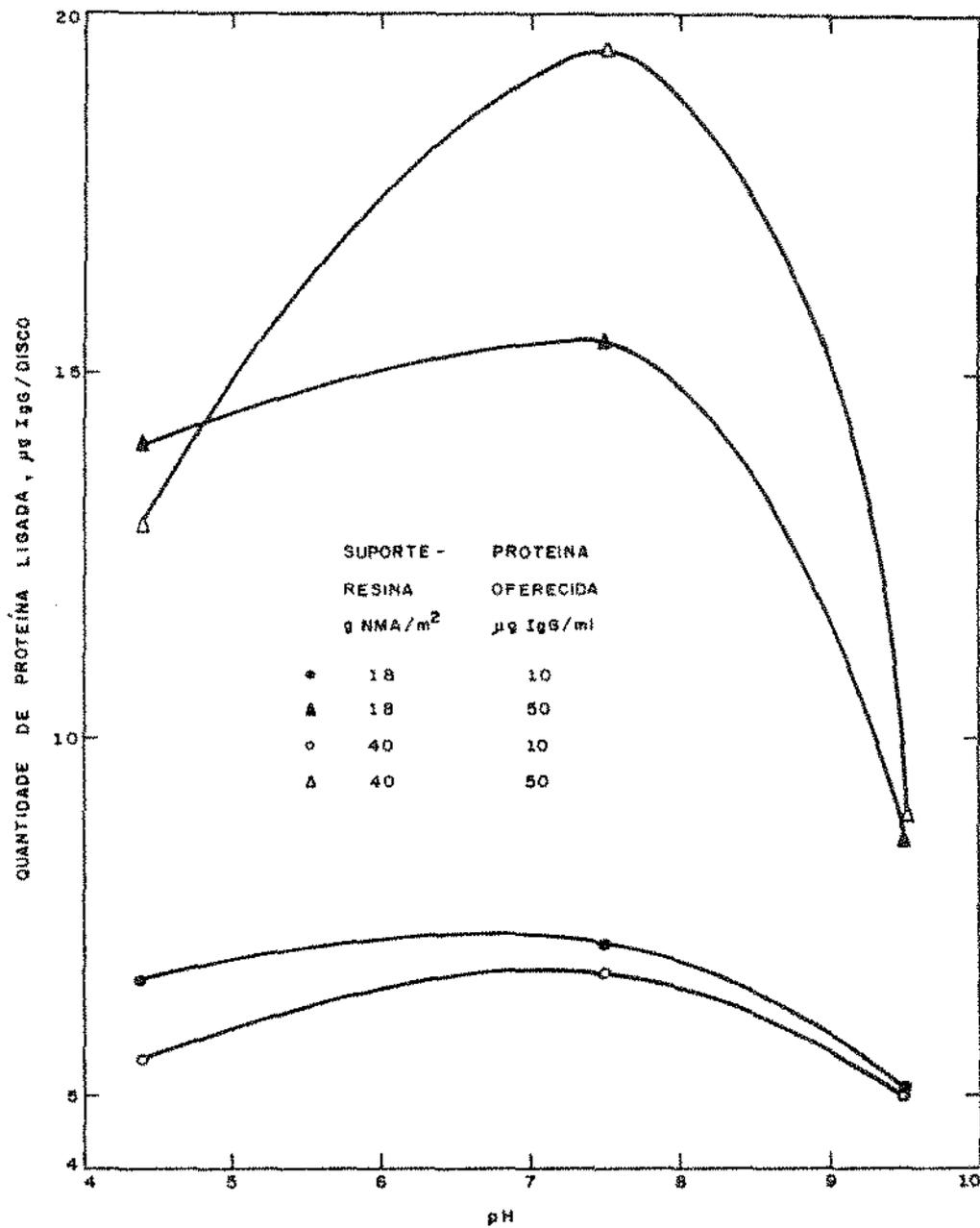


Figura 4.5 - Influência do pH do meio reacional, na quantidade de proteína IgG ligada por disco de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) na reação de imobilização

Os resultados destes Testes ELISA expressos em absorvância, estão apresentados na Tabela 4.13, de onde se verifica pelas baixas leituras de absorvância, que o meio básico (pH 9,0) não se presta à ligação de proteínas ao Suporte-Resina.

Conforme já foi discutido na Revisão Teórica, o grupo N-metilol pode reagir, em princípio, com grupos amino ou hidroxilas, em pH ácido, neutro ou básico. Quando essa ligação se dá entretanto, entre um grupo N-metilol do Suporte-Resina e um destes grupos característicos de uma macromolécula de proteína, verifica-se que o pH neutro e o ácido favorecem mais, principalmente para concentrações mais elevadas de proteína na solução de sensibilização. Isto pode estar relacionado com a concentração e tipo de cargas na superfície do Suporte-Resina e o tipo de carga da proteína.

Para se verificar a influência da variação da concentração de eletrólitos no meio reacional, na quantidade de proteína ligada por disco, adicionou-se ao tampão fosfato (PBS) 20 mM pH 7,5 escolhido, cloreto de sódio a diferentes molaridades : 0,5 M e 0,8M.

Discos dos mesmos Suportes-Resina usados para estabelecer o melhor pH foram sensibilizados em soluções de IgG, com traços de IgG  $^{125}$ I, diluídos em tampão normal e com cloreto de sódio.

Os resultados obtidos, expressos em  $\mu$ g IgG ligada/disco, estão apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.13 - Leituras de Absorvância em Testes ELISA. Efeito do pH do meio reacional, na quantidade do anti corpo IgG ligada por disco de Suporte-Resina

Suporte-Resina		disco de 8,3 mm de diâmetro de Nylon, com NMA (12,6% de retenção de sólidos)			
Concentração da solução de sensibilização $\frac{\text{mg IgG}}{\text{ml}}$		5	1	0,5	0,1
Tampões Utilizados	Acetato pH 4,0	0,700	0,520	0,450	0,400
	Carbonato pH 9,0	0,065	0,010	0,005	0,000

Tabela 4.14 - Efeito da adição de Eletrólitos ao meio reacional de sensibilização, na quantidade de IgG ligada por disco (Resultados expressos em  $\frac{\mu\text{g IgG ligada}}{\text{disco}}$ )

Suporte-Resina	18 g de NMA		40 g de NMA	
	$\text{m}^2$ de Suporte-Resina		$\text{m}^2$ de Suporte-Resina	
Concentração da solução de sensibilização, $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$	10	50	10	50
Massa de proteína oferecida, $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{disco}}$	34	167	34	167
PBS 20mM pH 7,5 (Normal)	5,7	11,4	5,0	16,0
PBS 20mM + NaCl 0,5M pH 7,5	6,9	7,7	4,8	8,9
PBS 20 mM + NaCl 0,8M pH 7,5	7,2	9,4	4,9	8,8

Dos resultados obtidos, verifica-se que a adição de NaCl não teve praticamente efeito para a concentração de sensibilização de 10 µg IgG/ml, mas reduziu à metade a quantidade de IgG ligada por disco, para solução de sensibilização mais concentrada.

Portanto, como meio reacional mais adequado, manteve-se o tampão fosfato 20 mM, pH 7,5, sem eletrólitos.

#### 4.4.2.2. Influência da Variação da Temperatura e do Tempo de Reação

Através de Radioimunoensaios, avaliou-se a influência da temperatura e do tempo de reação, na quantidade de proteína IgG ligada por disco. Os ensaios foram feitos às temperaturas de 22°C e 37°C, nos tempos de reação de 2,5 e 18 horas.

Discos de 8,3 mm de diâmetro de Malha de Poliéster (292 g/m<sup>2</sup>), com 35 g de NMA/m<sup>2</sup> de Suporte-Resina, foram sensibilizados em soluções de IgG diluídas em PBS 20 mM pH 7,5, nas concentrações de 10 e 50 µg IgG/ml. Utilizou-se volumes de 10 ml/3 discos, sob agitação contínua.

Os resultados obtidos de médias de triplicatas, expressos em µg IgG ligada/disco, estão apresentados na Tabela 4.15 e Figura 4.6.

A máxima temperatura testada para a reação de sensibilização foi de 37°C, devido à denaturação que pode ocorrer às proteínas, à temperaturas superiores a 40°C.

Os resultados da Tabela 4.15 indicam que pode-se realizar a reação de sensibilização a 22°C (temperatura ambiente), com quantidade de proteína ligada/disco suficiente para se ob-

ter um bom imunosorvente. O tempo de reação teve maior influência, quando se usou uma maior concentração de proteína na sensibilização, conseguindo-se ligar quantidades significativamente maiores, com o aumento do tempo de reação. Para a menor concentração de IgG usada, o aumento da quantidade de proteína ligada não foi muito significativo, atingindo-se um patamar, para tempos superiores a 2 horas de reação (Figura 4.6).

Tabela 4.15 - Influência da Temperatura e Tempo de Reação na quantidade de IgG ligada por disco de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>). Tampão fosfato (PBS), 20 mM pH 7,5 (Resultados expressos em µg IgG ligada/disco).

Temperatura, °C		22		37	
Concentração da solução de sensibilização, $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$		10	50	10	50
Massa de proteína oferecida $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{disco}}$		34	167	34	167
Tempo de reação, horas	2	7,2	17,1	8,9	16,4
	5	7,9	20,4	8,6	16,4
	18	8,2	28,2	-	-

Na Tabela 4.15, vê-se que para a temperatura de 37°C, atingiu-se para a menor concentração de IgG oferecida, também

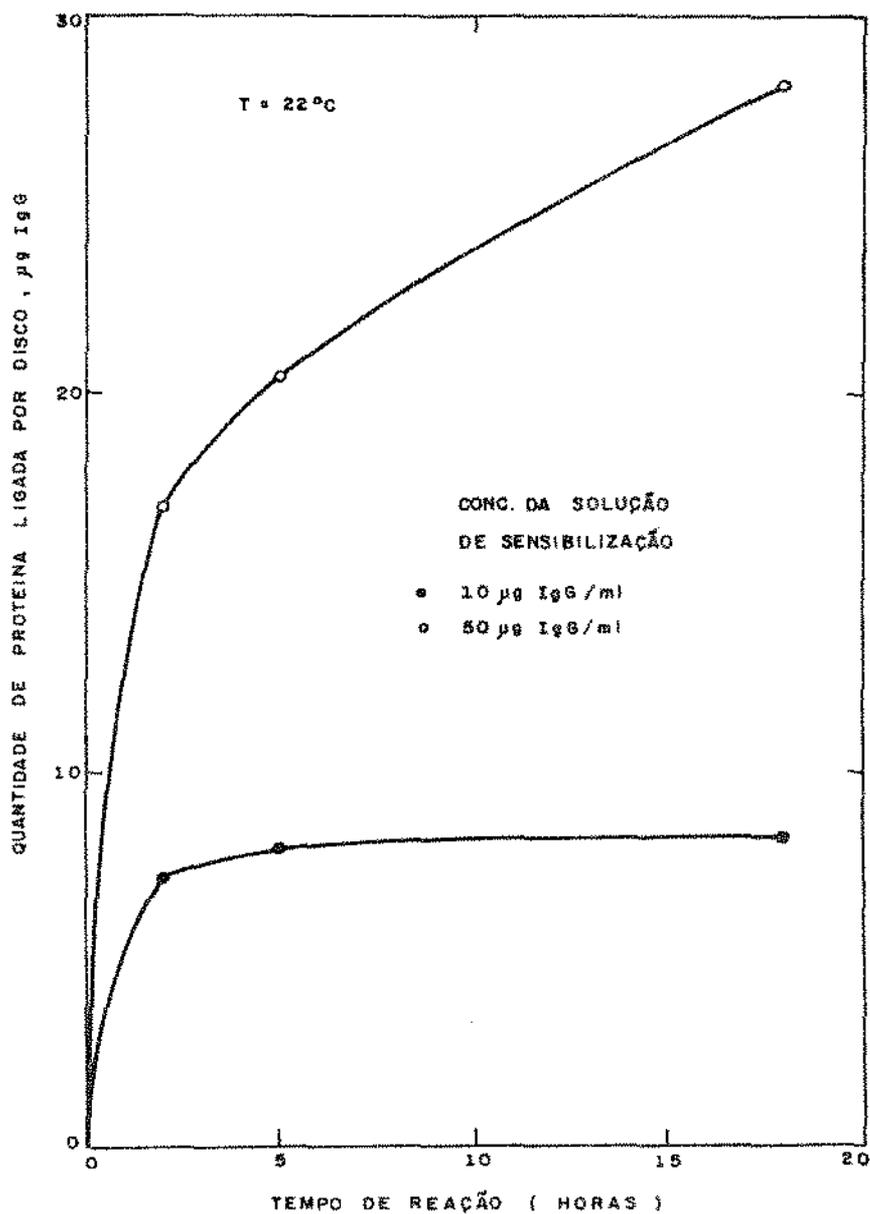


Figura 4.6 - Influência do tempo de reação, à temperatura de 22°C, na quantidade de proteína IgG ligada por disco de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>) na reação de imobilização

rapidamente (2 horas) o mesmo patamar atingido à temperatura de 22°C. Para a concentração de 50 µg IgG/ml, as quantidades ligadas de proteína se mostraram constantes com os tempos de reação testados, ligando menor quantidade de proteína que à temperatura de 22°C.

Testes ELISA preliminares também foram realizados na tentativa de se determinar a temperatura e tempo de reação adequados, para a reação de imobilização de antígenos no Suporte-Resina.

Discos de 8,3 mm de diâmetro de Nylon, revestidos com resina Dimetilolurêia (Argos), com 15% de Retenção de Sólidos, foram sensibilizados com solução de antígeno de Toxoplasmose na concentração de 130 µg/ml. As reações se processam às temperaturas de 37°C e 4°C e nos tempos de reação de 1, 2, 4, 6 e 18 horas.

Realizou-se então, para um soro positivo (+) e um soro negativo (-) a várias diluições, Testes ELISA para Toxoplasmose, utilizando os discos sensibilizados sob as diferentes condições de temperatura e tempo de reação. As absorvâncias obtidas dão uma medida indireta da quantidade de antígeno, que é ligada por disco, em cada caso.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.16.

Observando-se a Tabela 4.16, verifica-se que a partir de 2 horas de reação de sensibilização a 37°C, o comportamento do disco no Teste ELISA, em termos de absorvância medida, praticamente não se altera. Para a temperatura de 4°C, a reação se processou num tempo maior, de 18 horas, obtendo-se a mesma

absorvância no Teste ELISA, que para o tempo de 6 horas a 37°C.

Tabela 4.16 - Absorvâncias obtidas em Testes ELISA para Toxoplasmose, utilizando discos de Suporte-Resina, sensibilizados com antígeno de Toxoplasmose, sob diferentes condições de temperatura e tempo de reação.

Concentração de antígeno na sensibilização: 130µg  
ml

Temperatura , °C			37	37	37	37	4
Tempo de Reação horas			1	2	4	6	18
Soro (+)	Diluições	1/16	0,930	1,105	1,055	1,374	1,364
		1/256	0,440	0,486	0,539	0,579	0,414
		1/1000	0,178	0,205	0,211	0,247	0,125
		1/4000	0,076	0,088	0,088	0,093	0,050
Soro (-)	Diluições	1/16	0,154	0,140	0,152	0,148	0,050
		1/256	0,056	0,078	0,088	0,073	0,042
		1/1000	0,036	0,039	0,073	0,055	0,037
		1/4000	0,021	0,037	0,037	0,048	0,025
Controle: Tampão fosfato pH 7,5			0,025	0,050	0,028	0,037	0,024

É provável que a temperatura mais baixa favoreça a ligação mais específica do antígeno de interesse ao Suporte-Resina, diminuindo a adsorção inespecífica de outras proteínas que

compõem o extrato proteico do antígeno, ou então, que o longo tempo de reação permita se chegar a um equilíbrio melhor estabelecido.

De acordo com os resultados obtidos para as variáveis estudadas, para o procedimento de rotina de sensibilização de discos para uso em Testes ELISA, propõe-se como padrão a sensibilização por 2 horas a 37°C, seguidas por mais 18 horas à temperatura de 4°C ou temperatura ambiente (22°C), realizada em meio reacional tamponado de pH neutro (tampão fosfato 20mM, pH 7,5), sem a presença de eletrólitos.

#### 4.5. Estudo da Natureza e Estabilidade da Ligação entre o Suporte-Resina e Superfícies de Poliestireno e a Proteína.

O estudo e identificação da natureza da ligação que se processa entre a proteína e o Suporte-Resina na preparação de imunossorventes, é de grande interesse devido à sua relação com a estabilidade da ligação, e portanto do próprio imunossorvente.

A identificação do tipo de ligação que ocorre a nível de superfície, que pode ser por adsorção física, adsorção química ou ligação covalente, bem como das espécies ou grupos funcionais reativos envolvidos na ligação, é bastante difícil de ser realizada, como foi discutido no ítem 2.8., deste trabalho.

Mesmo no campo da Catálise Heterogênea, onde o fenômeno da adsorção tem extrema importância, a identificação das espécies químicas intermediárias que participam da reação e da natureza da ligação que ocorre entre a superfície catalítica

e estas espécies reativas (geralmente adsorção química) é muito difícil, permanecendo quase sempre várias hipóteses possíveis, para explicar os fenômenos envolvidos.

No caso do Suporte-Resina composto por tecidos revestido com resinas, com grupos funcionais capazes de reagir covalentemente com grupos funcionais de proteínas, procurou-se demonstrar a natureza da reação através de critérios auxiliares.

A aplicação de Modelos e Isotermas de Adsorção aos dados de equilíbrio obtidos para imobilização de IgG, em discos de Suporte-Resina com 35 g NMA/m<sup>2</sup> e para efeito de comparação, em superfícies de poliestireno, que se constituem no tipo de suporte mais usado atualmente para preparação de imunossorventes para Testes ELISA, foi realizada visando a obtenção de elementos para a discussão da natureza da ligação envolvida.

A estabilidade da ligação da proteína ao Suporte-Resina, à temperatura, tempo de estocagem e contato com soluções de elevada tensão iônica, está relacionada com a própria natureza da ligação, resultando na busca de ligação covalente.

Por isto, experimentos visando o estudo do efeito destas variáveis sobre a estabilidade da ligação, foram efetuados para antígenos e anticorpos imobilizados em Suportes-Resina, obtidos a partir de N-metilolacrilamida.

A análise do conjunto das observações e resultados obtidos através destes procedimentos, pode levar a conclusões sobre a natureza da ligação da proteína ao Suporte-Resina.

Ainda com o objetivo de se demonstrar a ocorrência de ligação covalente entre os grupos N-metilol do Suporte-Resina,

e grupos reativos de proteínas, realizou-se outros experimentos auxiliares que serão relatados a seguir, cujos resultados obtidos, embora não tenham sido conclusivos, fornecem elementos para proposição de novos experimentos.

Realizou-se o bloqueio de grupos N-metilol da resina polimerizada no Suporte-Resina, através de reação com butanol e a quebra da ligação entre o grupo Metilol e o átomo de nitrogênio da cadeia da resina :  $\text{>N} \begin{array}{c} | \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ , pelo tratamento com uma solução de NaOH 2M, à temperatura de 0°C, visando a liberação dos grupos Metilol na forma de formaldeído livre.

Discos de tais Suportes-Resina tratados, quando testados em Testes ELISA e Radioimunoensaios não apresentaram, entretanto, alterações significativas em termos de quantidade de proteína ligada, em relação aos discos normais, o que pode indicar, devido ao excesso de grupos Metilol à superfície, que não se tenha chegado a um esgotamento completo.

Tentou-se ainda utilizar a técnica de Espectrofotometria de Infravermelho, para demonstrar a covalência da ligação, mas os resultados obtidos para as resinas polimerizadas (NMA e uréia-formaldeído) reagidas com o anticorpo IgG não foram conclusivos, pois a quantidade de IgG ligada à resina era inferior aos 5% em peso da amostra, necessários para se poder identificar possíveis alterações nos espectros.

Um outro experimento interessante para demonstrar a participação preponderante do grupo Metilol, na fixação de uma primeira camada de proteína no Suporte-Resina, seria a preparação de discos revestidos com o monômero acrilamida, reticulado com outros monômeros di- ou tri-funcionais, que não apre-

sentem grupos Metilol, os quais poderiam ser posteriormente introzuidos pela reação com formaldeído, para efeito de compa-ração.

De acordo com a literatura, entretanto, não se espera que se ligue quantidade significativa de proteína à acrilamida, pois quando Ternick e Avrameas<sup>(52)</sup> utilizaram gel de poliacrilamida, como suporte para preparação de imunosorventes, houve a necessidade da "ativação" com glutaraldeído, como intermediário, para que a ligação covalente de proteínas ocorresse.

#### 4.5.1. Aplicação de Modelos e Isotermas de Adsorção a Dados de Equilíbrio Obtidos na Imobilização do Anticorpo IgG em Discos de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>) e em Superfícies de Poliestireno

Para obtenção de dados de equilíbrio, em termos de quantidade de proteína ligada e concentração de equilíbrio da solução de proteína, para discos de Suporte-Resina e superfícies de poliestireno, foi utilizada a técnica do Radioimunoensaio.

Discos de 8,3 mm de diâmetro de Suporte-Resina preparado com Malha de Poliéster (292 g/m<sup>2</sup>) e resina N-metilolacrilamida na concentração de 35 g NMA/m<sup>2</sup>, apresentando área superficial disponível de 18,9 cm<sup>2</sup>, foram sensibilizados em triplicata, em soluções de IgG a concentrações variando de 2,1 µg IgG/ml a 1500 µg IgG/ml (em PBS 20mM, pH 7,5), com IgG - <sup>125</sup>I como traçador. As reações de sensibilização se processaram à temperatura de 22°C, por 18 horas, sob agitação suave, usan-

do-se sempre 1 ml de solução de sensibilização por disco.

Os resultados obtidos em termos de quantidade de IgG ligada por disco, estão apresentados na Tabela 4.17 e nas Figuras 4.7 e 4.8.

Superfícies de poliestireno, no formato de cavidades de placas com 100  $\mu$ l e 200  $\mu$ l e tubos de 500  $\mu$ l, apresentando respectivamente áreas superficiais disponíveis de 1,1 ; 1,6 e 2,8  $\text{cm}^2$ , foram sensibilizados em triplicata, com soluções de IgG a concentrações variando de 0,5  $\mu\text{g}$  IgG/ml a 20,0  $\mu\text{g}$  IgG/ml, em tampão carbonato pH 9,5 , a temperatura de 4°C, por 18 horas , usando-se os volumes completos dos recipientes e IgG -  $^{125}\text{I}$  como traçador.

Os resultados obtidos em termos de quantidade de IgG ligada por cavidade ou tubo, estão apresentados na Tabela 4.18.

O ajuste dos dados de equilíbrio obtidos para o Suporte-Resina, em termos de concentração de equilíbrio da solução de sensibilização e quantidade de proteína ligada por  $\text{cm}^2$  de Suporte-Resina ou por grama de resina polimerizada, a Modelos de Adsorção, é extremamente dificultado pela quase inexistência na literatura de estudos desta natureza.

Os Modelos de Adsorção existentes foram essencialmente desenvolvidos para adsorção de gases e vapores, como se vê na Tabela 2.5., que apresenta as equações das isotermas de adsorção mais empregadas. (Capítulo 2, Ítem 2.8).

Entretanto, alguns destes modelos têm sido aplicados com sucesso para a adsorção de moléculas em solução, como o Modelo de Langmuir, que de acordo com a literatura<sup>(93,94,97)</sup> costuma representar bem a adsorção de moléculas de proteína em so

Tabela 4.17 - Quantidades de IgG ligadas por disco de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ), nas reações de sensibilização, a várias concentrações de IgG. Parâmetros calculados para construção de Isotermas. ( $T = 22^\circ\text{C}$ )

Concetração da solução de sensibilização inicial $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$	massa de IgG ligada disco $\mu\text{g IgG}$	% da proteína oferecida que é ligada por disco	Concentração de equilíbrio da solução de sensibilização, C $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$	X/W $\frac{\mu\text{g IgG ligada}}{\text{cm}^2}$	$r \times 10^3$ $\frac{\mu\text{g IgG ligada}}{\text{g resina polimerizada}}$
2,1	0,9	42,9	1,2	0,05	0,5
4,2	2,5	59,5	1,7	0,13	1,4
8,4	3,6	42,9	4,8	0,19	2,1
16,9	7,9	46,7	9,0	0,42	4,5
33,8	11,5	34,0	22,3	0,61	6,6
67,5	21,3	31,6	46,2	1,13	12,2
135,0	31,9	23,6	103,1	1,69	18,3
270,0	42,3	15,7	227,7	2,24	24,3
540,0	60,9	11,3	479,1	3,22	35,0
750,0	83,3	11,1	666,7	4,41	47,9
1500,0	174,4	11,6	1325,6	9,23	100,0

Discos de 8,3 mm de diâmetro. Massa de resina polimerizada por disco:  $1740 \mu\text{g}$   
 Área superficial disponível:  $18,9 \text{ cm}^2/\text{disco}$

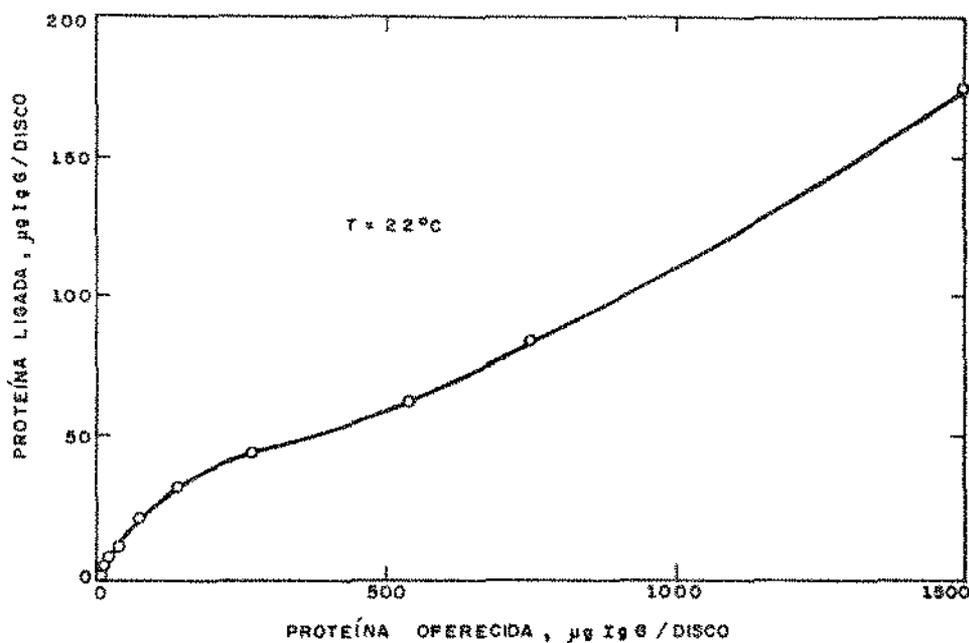


Figura 4.7 - Quantidades de proteína IgG ligadas por discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) na reação de imobilização, realizada para várias ofertas de IgG

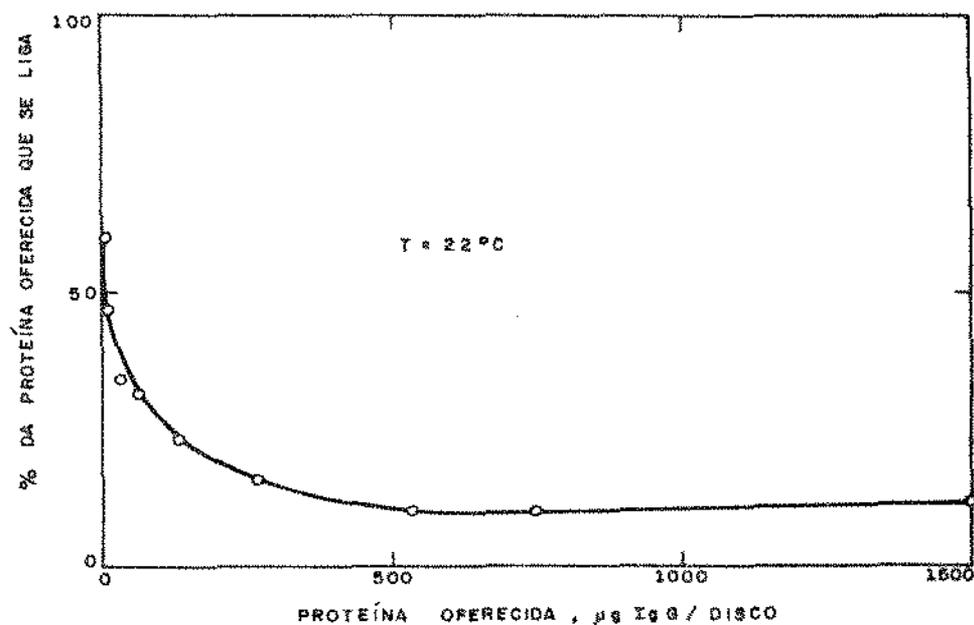


Figura 4.8 - % de proteína IgG oferecida por disco de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ), que se liga na reação de imobilização

Tabela 4.18 - Quantidade de IgG ligada por cavidade ou tubo de poliestireno, na sensibilização com soluções de IgG, a várias concentrações. Parâmetros para Isoterma de Adsorção de Langmuir ( $T = 4^{\circ}\text{C}$ ).

Superfícies de Poliestireno	Concentração solução de sensibilização $\mu\text{g IgG/ml}$	$\mu\text{g IgG oferecida}$	$\mu\text{g IgG ligada}$	C	$X/W \times 10^2$	$\frac{C}{X/W} \cdot \frac{\text{cm}^2}{\text{ml}}$
		poço ou tubo	poço ou tubo	$\mu\text{g IgG}$ ml	$\mu\text{g IgG ligada}$ $\text{cm}^2$	
Cavidade de 100 $\mu\text{l}$ $A = 1,1 \text{ cm}^2$	0,5	0,05	0,02	0,3	1,83	16,5
	1,0	0,1	0,05	0,5	4,55	11,0
	2,0	0,2	0,09	1,1	8,18	13,5
	5,0	0,5	0,18	3,2	16,36	19,6
	10,0	1,0	0,23	7,7	20,91	36,8
	20,0	2,0	0,29	17,1	26,36	64,9
Cavidade de 200 $\mu\text{l}$ $A = 1,6 \text{ cm}^2$	0,5	0,1	0,05	0,25	3,13	8,0
	1,0	0,2	0,10	0,5	6,25	8,0
	2,0	0,4	0,18	1,1	11,25	9,7
	5,0	1,0	0,30	3,5	18,75	18,7
	10,0	2,0	0,39	8,0	24,38	32,8
	20,0	5,0	0,51	17,5	31,88	54,8
Tubo de 500 $\mu\text{l}$ $A = 2,8 \text{ cm}^2$	0,5	0,25	0,1	0,3	3,57	8,4
	1,0	0,5	0,2	0,6	7,14	8,4
	2,0	1,0	0,3	1,4	10,71	13,1
	5,0	2,5	0,6	3,8	21,43	17,7
	10,0	5,0	0,8	8,4	28,57	29,4
	20,0	10,0	1,1	17,8	39,29	45,3

lução às superfícies poliméricas e de certos corantes às fibras (Adsorção em Monocamada.).

Calculou-se a partir dos dados experimentais obtidos, apresentados nas Tabelas 4.17 e 4.18, os parâmetros para construção de Isotermas de Adsorção, que são a quantidade de IgG ligada por  $\text{cm}^2$  de suporte (X/W) e por grama de resina polimerizada no Suporte-Resina (r) e a concentração de equilíbrio da solução de sensibilização (C). Os valores dos parâmetros obtidos estão apresentados também nas Tabelas 4.17 e 4.18, respectivamente para o Suporte-Resina e as Superfícies de Poliestireno.

A Isoterma (C versus X/W) obtida para o Suporte-Resina, mostrada na Figura 4.9, apresenta um formato sigmoidal, diferente do formato característico da Isoterma de Langmuir (Formato I, Figura 2.32) para Adsorção em Monocamada.

Verifica-se na Figura 4.9 que para quantidades de IgG ligadas por  $\text{cm}^2$ , de cerca de  $3,0 \mu\text{g}$  IgG, ou seja cerca de  $60 \mu\text{g}$  de IgG ligada por disco, obtidas até a concentração de equilíbrio ao redor de  $500 \frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$ , a Isoterma parecia tender a um patamar de quantidade de IgG ligada/ $\text{cm}^2$ . Entretanto, a partir desta concentração verificou-se uma mudança no comportamento da curva, ligando-se quantidades de IgG por  $\text{cm}^2$  de Suporte-Resina cada vez maiores, sem tendência de formação de patamar, conferindo à Isoterma um formato sigmoidal, característico de fenômenos de Adsorção em Multicamada. (Formato II, Figura 2.32).

As estimativas realizadas no item 4.4.I., sobre o número de moléculas de IgG, que se poderia ligar por  $\text{cm}^2$  de super

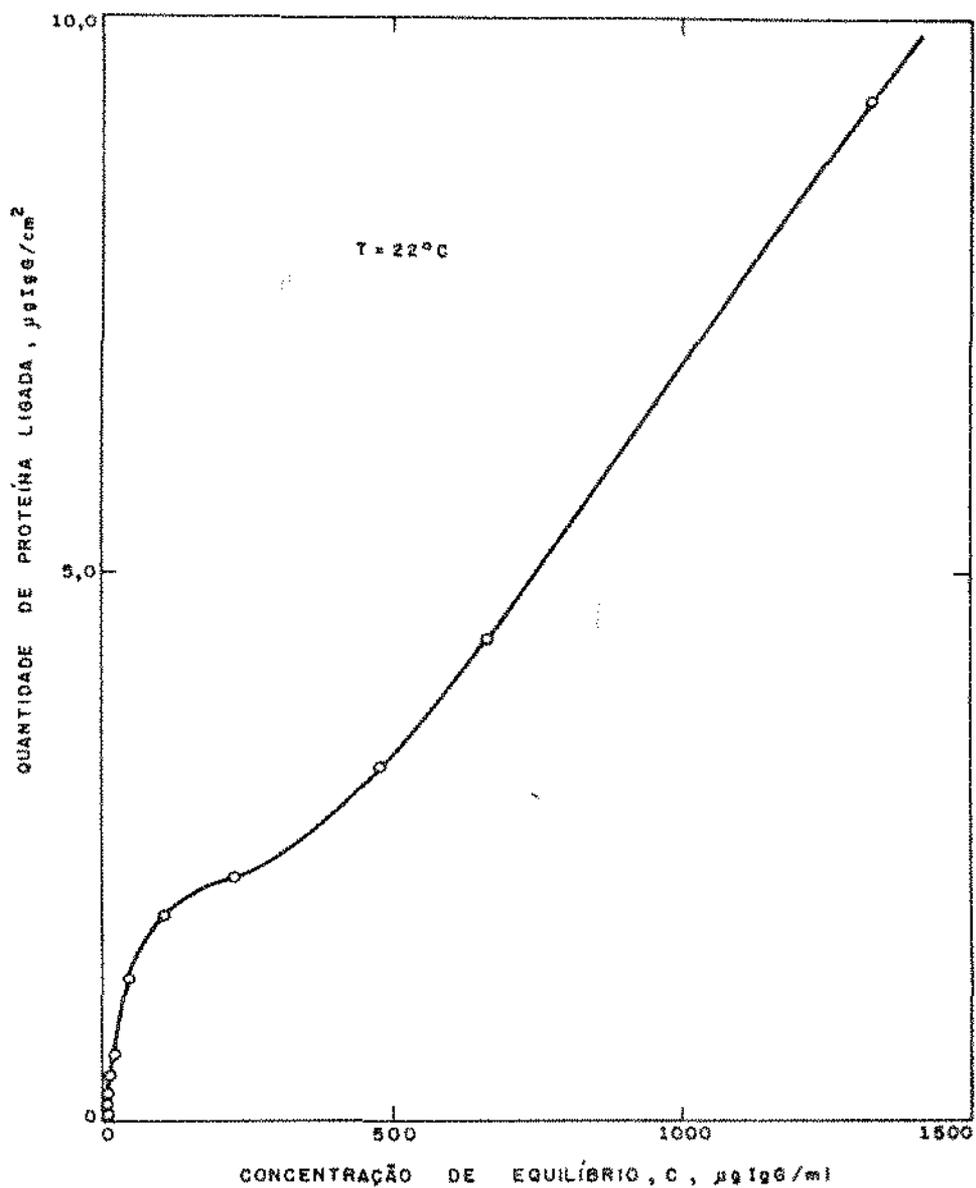


Figura 4.9 - Isotherma de Adsorção, obtida para dados de equilíbrio da reação de imobilização de IgG, no Su porte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>)

lície, apresentaram como limite máximo, cerca de  $25 \times 10^{12}$  moléculas de IgG/cm<sup>2</sup>, considerando-se uma forma de ligação mais compacta das moléculas de IgG, lado a lado, perpendicularmente ao eixo maior de  $250 \text{ \AA}$  (Figura 4.4.c.). Este número de moléculas corresponderia a uma massa de  $6,6 \text{ \mu g IgG/cm}^2$ .

Entretanto, como a ligação de todas as moléculas desta forma é pouco provável, pois além das interações entre as macromoléculas, a ligação realizada desta forma exigiria o comprometimento dos sítios combinatórios do anticorpo IgG, que se localizam nas extremidades amino-terminais das cadeias leves e pesadas (Figura 4.4), exigindo também a ligação da molécula de IgG através das extremidades carboxi-terminais das cadeias pesadas (Figura 4.4.), que não são reativas em relação ao grupo Metilol da superfície do Suporte-Resina.

Deste modo, provavelmente a estimativa mais realista seja a da área de  $1250 \text{ \AA}^2$  por molécula de IgG, que permitiria a ligação de  $8 \times 10^{12}$  moléculas de IgG por cm<sup>2</sup>, que corresponderia a uma massa de  $2,1 \text{ \mu g IgG/cm}^2$ , ou seja, no caso do disco de Suporte-Resina usado, que apresenta uma área superficial disponível de  $18,9 \text{ cm}^2$ , cerca de  $40 \text{ \mu g IgG/disco}$ .

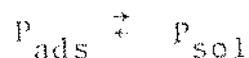
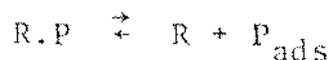
Na Figura 4.9, verifica-se, entretanto, que para a concentração da solução de sensibilização de equilíbrio, de  $1300 \text{ \mu g IgG/ml}$ , conseguiu-se ligar cerca de  $9,2 \text{ \mu g IgG/cm}^2$ , ou seja, uma quantidade 4,3 vezes maior que a estimada, considerando-se uma área de  $1250 \text{ \AA}^2$  por molécula de IgG ligada à superfície. Verifica-se também que a quantidade de IgG que foi estimada para a formação de uma monocamada :  $2,1 \text{ \mu g IgG/cm}^2$ , se aproxima do valor de  $3,0 \text{ \mu g IgG/cm}^2$  obtido a partir da mudança de

comportamento da curva da isoterma da Figura 4.9, que começa a se afastar da tendência inicial de formação de patamar.

Estas observações: formato sigmoidal obtido para a isoterma da Figura 4.9, construída a partir das concentrações de IgG ensaiadas, e a aproximação entre a estimativa da quantidade de IgG necessária para formação da monocamada, e a quantidade de IgG ligada/cm<sup>2</sup> de Suporte-Resina, obtida da isoterma da Figura 4.9, para início do desvio do comportamento da curva em relação ao formato característico de uma Isoterma de Langmuir (adsorção em monocamada), que representaria o início da formação das multicamadas de IgG por adsorção física, parecem indicar que o fenômeno que ocorre na ligação de IgG ao disco de Suporte-Resina, seria semelhante ao descrito por Hailwood e Horrobin<sup>(95)</sup>, para a sorção de umidade em fibras, que foi apresentado no Ítem 2.8, deste trabalho.

No caso do Suporte-Resina e da proteína IgG em solução, as primeiras moléculas seriam ligadas covalentemente através dos grupos Metilol da estrutura da resina, ou por adsorção química, até o esgotamento da área superficial disponível para a ligação das macromoléculas, seguindo-se então uma possível formação de multicamadas da proteína IgG, sobre a camada ligada quimicamente (não seria possível ocorrer uma dissolução de macromoléculas da proteína IgG, no retículo da resina).

Dois tipos de equilíbrio podem ser propostos: entre a proteína ligada à unidade reativa da resina (R) e a proteína adsorvida fisicamente ( $P_{ads}$ ) e entre a proteína adsorvida fisicamente e a proteína em solução ( $P_{sol}$ ):



de onde se tem pela Lei de Ação de Massas :

$$[R.P] = K_1 [P_{ads}] [R] \quad (4.1)$$

e

$$[P_{ads}] = K_2 [P_{sol}] \quad (4.2)$$

onde  $K_1$  e  $K_2$  são constantes de equilíbrio.

Definindo-se :

$n_a$  = nº de moles de proteína adsorvida na proteína ligada à resina;

$n_o$  = nº de moles de unidades reativas da resina não ligadas à proteínas;

$n_1$  = nº de moles de unidades reativas da resina ligadas à proteínas,

e assumindo-se que os três tipos de molécula envolvidas nos equilíbrios formam uma solução ideal, as suas concentrações são dadas por :

$$[P_{ads}] = \frac{n_a}{n_a + n_o + n_1} \quad (4.3)$$

$$[R] = \frac{n_o}{n_a + n_o + n_1} \quad (4.4)$$

$$[R.P] = \frac{n_1}{n_a + n_o + n_1} \quad (4.5)$$

Das equações 4.2 e 4.3, tem-se :

$$n_a = \frac{(n_o + n_1) K_2 [P_{sol}]}{1 - K_2 [P_{sol}]}$$

Das equações 4.1, 4.2, 4.4 e 4.5, tem-se :

$$n_1 = n_o \frac{[R.P]}{[R]} = n_o K_1 K_2 [P_{sol}] \quad (4.7)$$

Sendo:  $n_a + n_1$  = número de moléculas de proteína adsorvidas e ligadas à resina;

$n_o + n_1$  = número de unidades reativas da resina reagidas ou não com a proteína;

defini-se o ganho,  $r$ , em massa da proteína IgG ligada por grama de resina como :

$$r = \text{ganho} = \frac{\text{massa de IgG ligada à resina}}{\text{massa de resina}}$$

ou seja:

$$r = \text{ganho} = \frac{(n_a + n_1) \times 160000}{(n_o + n_1) \times M} \quad (4.8)$$

onde :  $M$  = peso molecular da unidade reativa da resina;

160000 = peso molecular da molécula de IgG.

Rearranjando a equação 4.8, tem-se :

$$\frac{r M}{160000} = \frac{n_a}{n_o + n_1} + \frac{n_1}{n_o + n_1} \quad (4.9)$$

Substituindo-se as equações 4.6 e 4.7 na equação 4.9, tem-se :

$$\frac{r M}{160000} = \frac{K_2 [P_{sol}]}{1 - K_2 [P_{sol}]} + \frac{K_1 K_2 [P_{sol}]}{1 + K_1 K_2 [P_{sol}]} \quad (4.10)$$

Fazendo-se  $[P_{sol}] =$  concentração de equilíbrio de proteína IgG = C , tem-se :

$$\frac{r M}{160000} = \frac{K_2 C}{1 - K_2 C} + \frac{K_1 K_2 C}{1 + K_1 K_2 C} \quad (4.11)$$

A equação 4.11 relaciona o ganho (r) em massa de proteína pela resina do Suporte-Resina, com a concentração de equilíbrio de proteína na solução, C, resultando em curvas com as características da observada na Figura 4.10. (formato sigmoideal), cujos parâmetros r e C, apresentados na Tabela 4.17, foram obtidos a partir dos dados experimentais, apresentados na mesma Tabela.

A escolha adequada das três constantes  $K_1$ ,  $K_2$  e M, seria necessária, para a verificação do ajuste dos dados experimentais, ao modelo proposto.

Outro modelo que ajusta curvas análogas, é o Modelo de Adsorção de BET, que foi desenvolvido para adsorção física de gases em multicamada. No caso de soluções, o termo  $P/P_o$  é

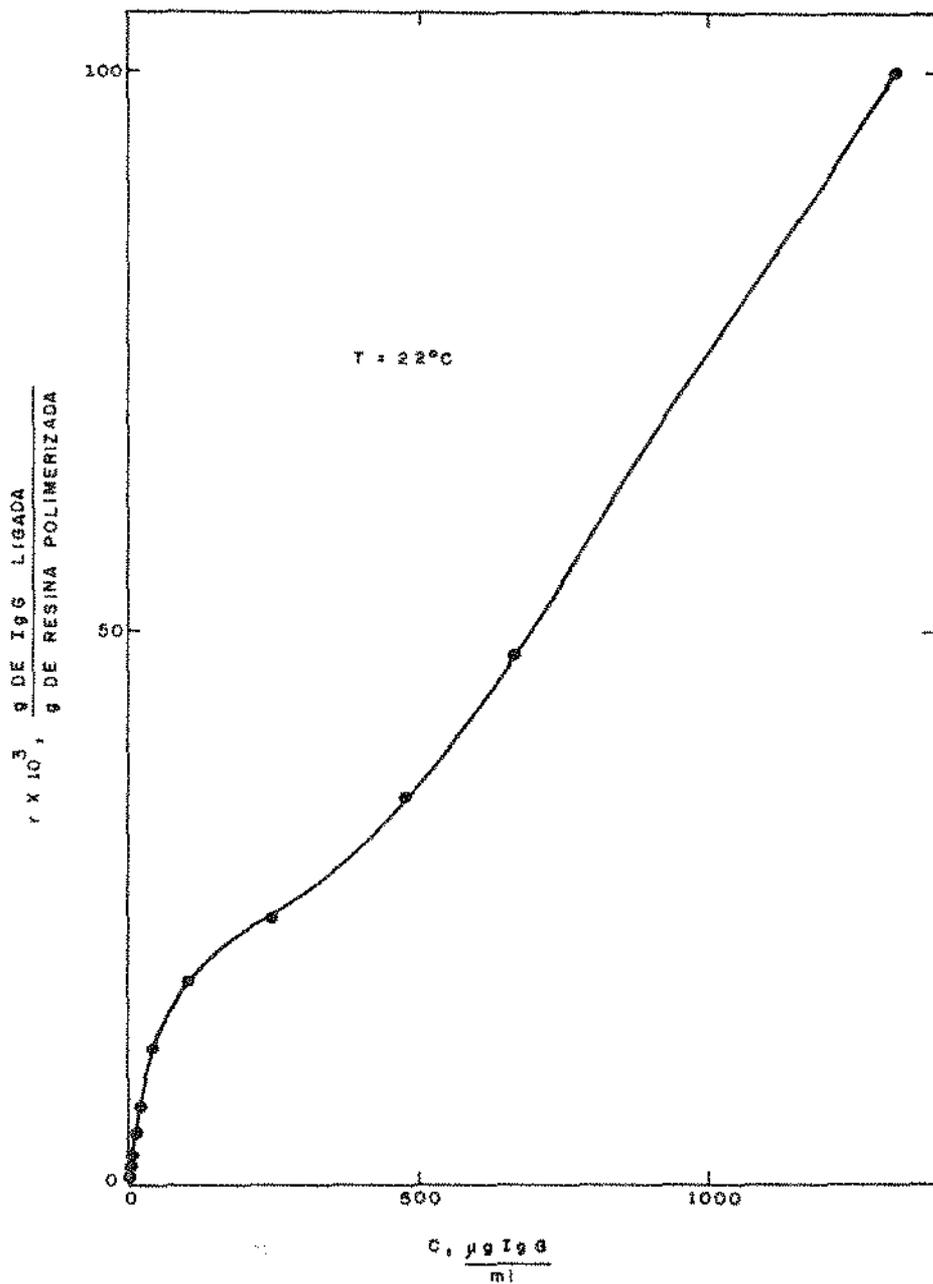


Figura 4.10 - Isotherma de Adsorção relacionando o ganho  $\underline{r}$ , em massa de proteína IgG, pela resina depositada no Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e a concentração de equilíbrio,  $C$ , da solução de IgG

substituído por  $C/C_0$ , na equação da isoterma apresentada na Tabela 2.5, como já foi discutido no Ítem 2.8. do Capítulo 2.

É quase certo, que há formação de multicamada, como resultado das estimativas da quantidade limite de imunoproteína IgG que se pode ligar e também pelo tipo de isoterma observado, sendo que um estudo mais amplo se torna necessário, visando o estabelecimento da generalidade do modelo proposto.

Para efeito de comparação, sabendo-se que a ligação de proteínas à superfícies de poliestireno-se dá por adsorção, apresenta-se nas Figuras 4.11 e 4.12, as Isotermas de Langmuir, respectivamente nas formas normal e linearizada, obtidas dos parâmetros apresentados na Tabela 4.18, para cada uma das superfícies de poliestireno testadas.

Da Figura 4.12, pelo Método dos Mínimos Quadrados obteve-se os coeficientes lineares, angulares e de correlação, para cada uma das três retas obtidas e os valores dos parâmetros Nm (massa de anticorpo IgG necessária para formar a monocamada) e K (constante de equilíbrio de adsorção). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.19, de onde se verifica que os coeficientes de correlação são razoáveis, ajustando-se bem o Modelo de Adsorção de Langmuir (discutido no Ítem 2,8 deste trabalho), para a faixa de concentrações de IgG, usada na sensibilização das superfícies.

As observações realizadas a partir de Isotermas de Adsorção construídas para dados de equilíbrio, em termos de concentração de IgG na solução de sensibilização e quantidade de IgG ligada/cm<sup>2</sup> do Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>), sugerem que a ligação do anticorpo IgG se dá, em uma primeira camada, até

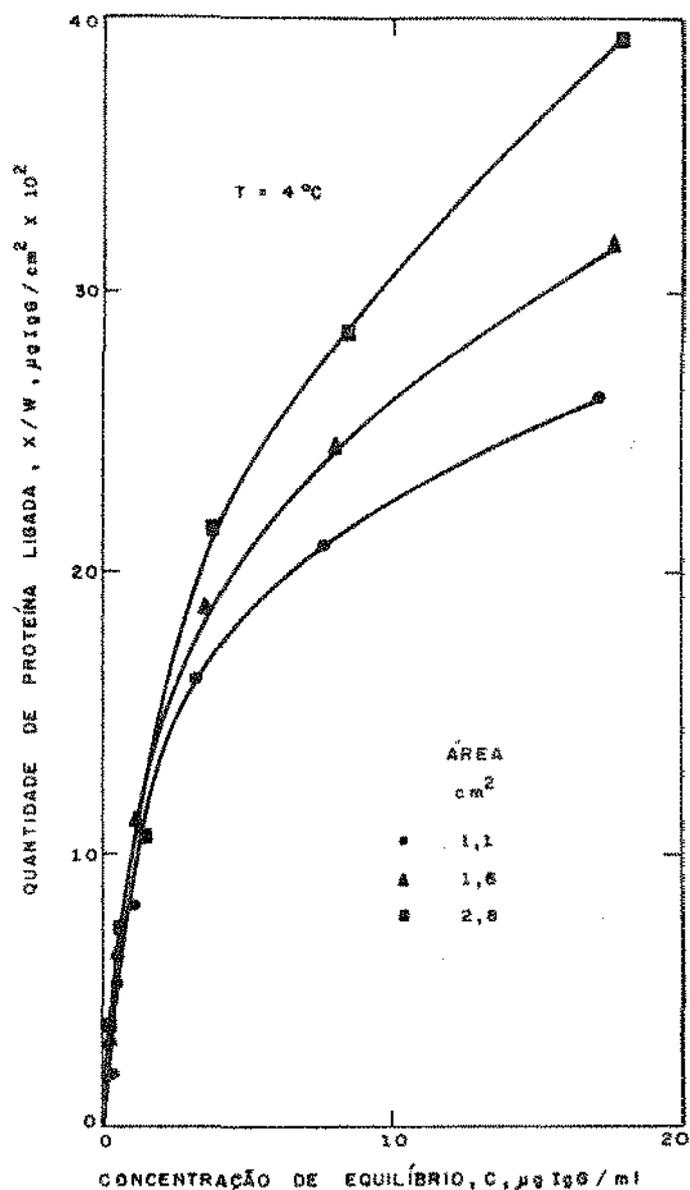


Figura 4.11 - Isotermas de Adsorção de Langmuir na Forma Normal, na reação de imobilização de IgG em Superfícies de Poliestireno, com várias áreas disponíveis

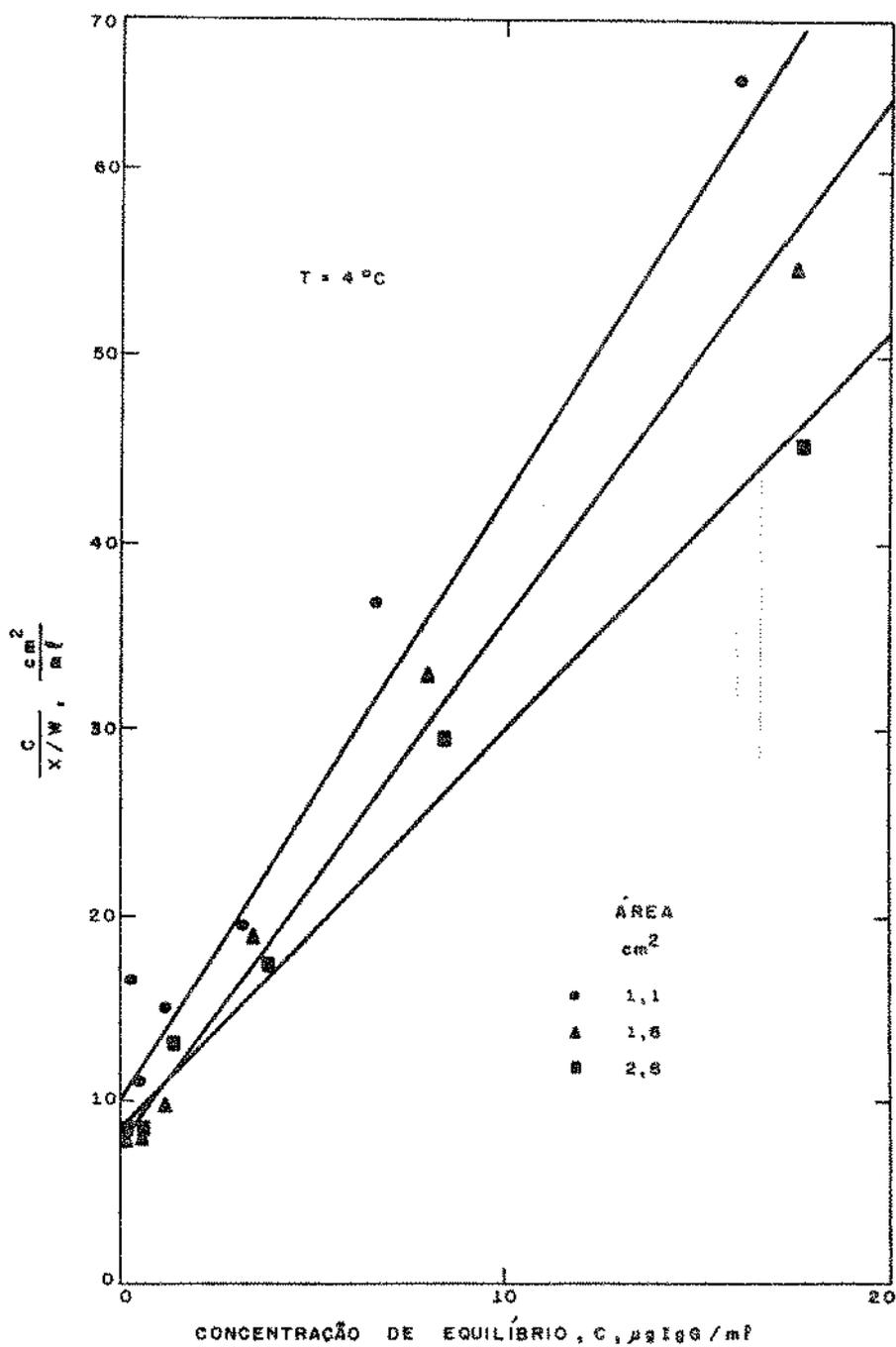


Figura 4.12 - Isothermas de Adsorção de Langmuir na Forma Linearizada, para dados de equilíbrio da reação de imobilização de IgG, em Superfícies de Poliestireno, com várias áreas disponíveis

o esgotamento da área superficial disponível, por reação com grupos N-metilol superficiais da resina ou por adsorção química, seguindo-se uma possível formação de multicamadas de IgG, ligadas então por ligações secundárias às moléculas de IgG que formam a primeira camada.

Tabela 4.19 - Valores dos coeficientes e parâmetros obtidos das retas da Figura 4.12.

Suporte	Coefficiente linear	Coefficiente angular	Coefficiente correlação	Nm $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{cm}^2}$	K $\frac{\text{ml}}{\mu\text{g IgG}}$
Cavidade 1,1 cm <sup>2</sup>	9,87	3,26	0,9989	0,31	0,33
Cavidade 1,6 cm <sup>2</sup>	7,79	2,79	0,9962	0,36	0,36
Tubo 2,8 cm <sup>2</sup>	8,98	2,12	0,9926	0,47	0,24

Do valor obtido para o parâmetro Nm (massa de IgG necessária para formar a monocamada), de 0,47  $\mu\text{g IgG}/\text{cm}^2$ , para o tubo de poliestireno com 2,8 cm<sup>2</sup> (Tabela 4.19), verifica-se que cada molécula de IgG ligada ocuparia uma área de 5650 Å<sup>2</sup>, que é maior que a de 1250 Å<sup>2</sup>, considerada como limite inferior, para a estimativa realizada para a quantidade de IgG possível de se ligar por cm<sup>2</sup> de Suporte-Resina, refletindo possivelmente uma população de formas de deposição superficial das moléculas de IgG.

Portanto, a hipótese de formação de multicamadas de

IgG, sobre a superfície do Suporte-Resina, fica mais uma vez reforçada, já que as quantidades de IgG que se conseguiu ligar por disco (até 174,4  $\mu\text{g}$  IgG) superaram em muito a quantidade máxima estimada para a área de  $1250 \text{ \AA}^2$  por molécula (cerca de  $\frac{40 \mu\text{g IgG}}{\text{disco}}$ ).

Em termos práticos, comparando-se a capacidade de ligação de IgG de um disco do Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ), com a de um tubo de poliestireno de  $500 \mu\text{l}$ , que é um dos suportes mais utilizados em Testes ELISA, verifica-se que enquanto se consegue ligar ao tubo, de modo instável, no máximo cerca de  $1,3 \mu\text{g}$  IgG (valor obtido da quantidade necessária para formar a monocamada da Tabela 4.19), consegue-se ligar de modo estável, por disco de Suporte-Resina, até cerca  $60 \mu\text{g}$  IgG para a oferta de IgG de  $\frac{500 \mu\text{g IgG}}{\text{disco}}$  (Figura 4.7).

#### 4.5.2. Estudo da Estabilidade da Ligação da Proteína ao Suporte-Resina

A caracterização do tipo de ligação que ocorre entre a proteína e a superfície do Suporte-Resina, pode ser auxiliada pelo estudo da estabilidade desta ligação, com relação à temperatura, tempo de estocagem, variação da tensão iônica do meio ou mudanças bruscas de pH.

Uma ligação que se dá por simples adsorção física, embora apresente uma energia de ativação necessária para a desorção igual ao calor diferencial de adsorção (89,90,91), pode ser muito sensível às variações de temperatura, tensão iônica do meio, mudanças de pH e normalmente não resiste a uma es

tocagem por longo tempo.

Isto é o que ocorre com a ligação de proteínas às superfícies de poliestireno, para uso em Teste ELISA. Caso não sejam estocadas à temperatura de 4°C, a ligação da proteína não resiste por mais de 24 horas, se desprendendo também no decorrer do próprio processamento do teste, pela influência dos meios reacionais, comprometendo a reprodutibilidade e sensibilidade do ensaio.

#### 4.5.2.1. O Efeito da Temperatura e Tempo de Estocagem

No estudo da estabilidade de reagentes de uso biológico a longos períodos de estocagem, a variável temperatura é importante, pois os fenômenos de deterioração das características dos produtos são acelerados pelo aumento da temperatura. Um período de estocagem de 1 dia a 37°C, pode ter o mesmo efeito da estocagem por uma semana ou mais, a 4°C.

Lotes de discos de 8,3 mm de diâmetro de Suporte-Resina de Malha de Poliéster de 292 g/m<sup>2</sup>, revestidos com  $\frac{35 \text{ g NMA}}{2 \text{ m}^2}$ , foram sensibilizados com extrato de Trypanosona cruzi (Doença de Chagas) a 10 µg/ml, liofilizados, selados à vácuo e armazenados a 4°C, 37°C e 56°C. A reatividade foi testada a intervalos de tempo de 15, 30 e 60 dias, juntamente com discos recentemente sensibilizados, em Testes ELISA para Doença de Chagas.

Foram ensaiados a cada vez, 2 soros positivos; X e Y e um negativo: W, na diluição de 1/40, sempre em duplicata. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4,20.

Tabela 4.20 - Absorvâncias medidas em Testes ELISA para Doença de Chagas (2 soros positivos, X e Y e um negativo, W), usando discos de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>) sensibilizados com antígeno, estocados por diversos períodos, a várias temperaturas

Soro		X (+)			Y (+)			W (-)		
Tempo de estocagem, dias		15	30	60	15	30	60	15	30	60
Temperatura, °C	56	0,981	0,790	0,764	0,433	0,316	0,356	0,108	0,073	0,149
	37	0,849	0,702	0,684	0,389	0,345	0,360	0,105	0,032	0,117
	4	0,797	0,528	0,722	0,594	0,440	0,715	0,068	0,052	0,131
	Disco sensibilizado no dia do teste	0,627	0,606	0,866	0,626	0,588	0,541	0,066	0,050	0,115

\* Os resultados mostrados nesta Tabela foram anteriormente apresentados por Michael et al<sup>(101)</sup>, em 1985.

Os resultados experimentais da Tabela 4.20, demonstram a estabilidade da ligação da proteína ao Suporte-Resina, mesmo sob as condições enérgicas de temperatura de 56°C, após 2 meses de armazenamento. A reatividade dos discos manteve-se praticamente inalterada, devendo-se estas pequenas variações de absorvância verificadas, a problemas de padronização dos demais reagentes usados no Teste ELISA, estando perfeitamente dentro dos intervalos de variação inter-ensaio, esperados para este tipo de teste.

Também com a finalidade de se testar a estabilidade da ligação à temperatura e tempo de estocagem, lotes de discos de 8,3 mm de diâmetro de Suporte-Resina com 138 g NMA/m<sup>2</sup>, foram sensibilizados com antígeno de Toxoplasmose e Rubéola, secos e estocados em frascos estanques, sobre envelopes de sílica-gel, às temperaturas de 4 e 37°C.

A manutenção da reatividade dos discos, em comparação com a observada no dia da sensibilização, foi testada a intervalos de tempo de 23, 36, 50, 72, 92, 142, 177 e 248 dias, ensaiando-se os discos sempre com o mesmo soro positivo e o mesmo soro negativo, à diluição de 1/64, usando os mesmos reagentes padronizados, em Testes ELISA.

Os resultados obtidos, em termos de absorvância lida para Toxoplasmose e Rubéola, estão apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14 respectivamente, nas quais verifica-se a manutenção inicial da reatividade dos discos até cerca de 50 dias, para ela então cair significativamente para 92 dias, voltando porém, aos valores de reatividade iniciais, a partir de 142 dias. Isto ocorreu tanto para os soros positivos, quanto para os negati

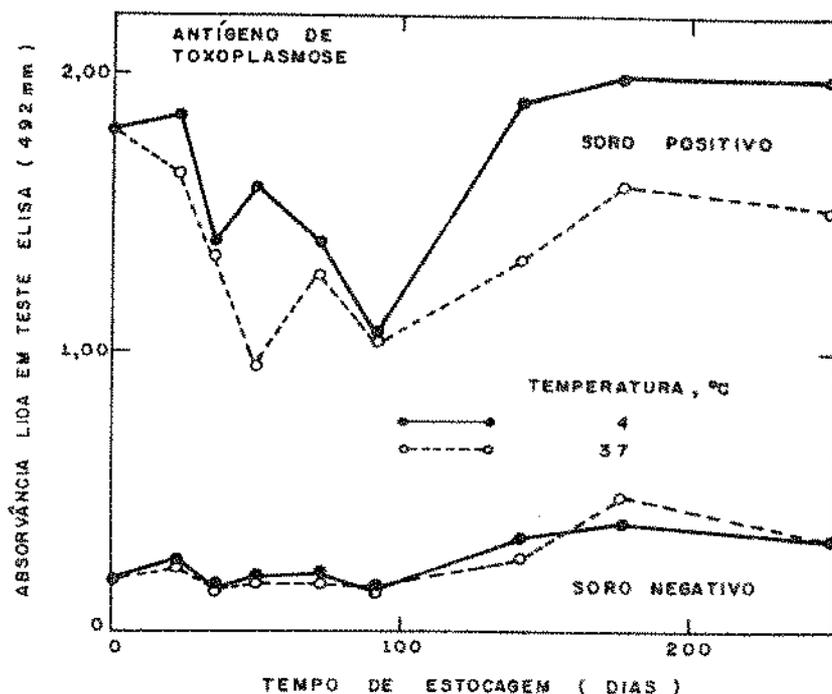


Figura 4.13 - Absorvâncias em Testes ELISA para Toxoplasmose, usando discos de Suporte-Resina ( $138 \text{ g NMA/m}^2$ ) sensibilizados, estocados por vários períodos, às temperaturas de  $4$  e  $37^\circ\text{C}$

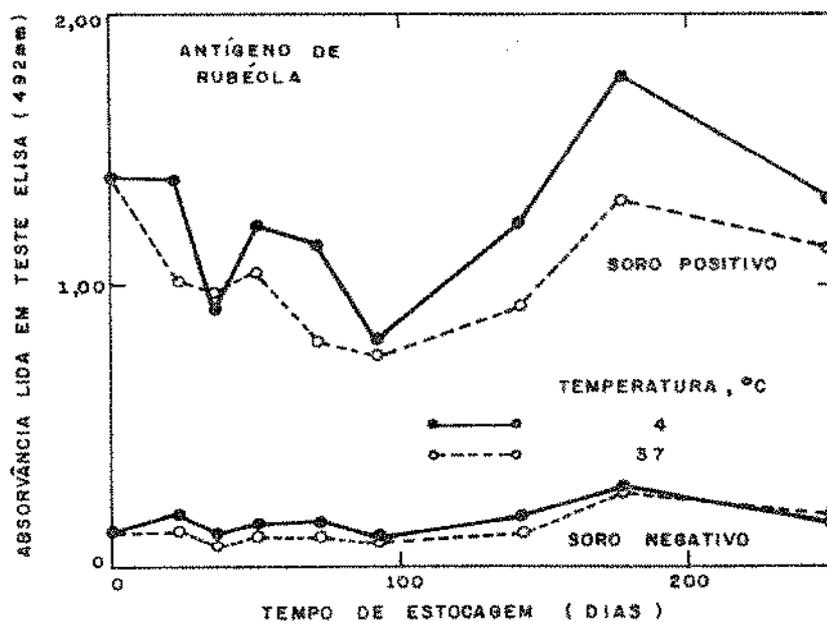


Figura 4.14 - Absorvâncias em Testes ELISA para Rubéola, obtidas como descrito na Figura 4.13

vos, para os 2 tipos de antígeno immobilizados nos discos.

Este comportamento foi depois explicado pela utilização nos Testes ELISA realizados no intervalo de 50 até 142 dias de armazenamento, de uma solução contaminada do conjugado enzimático anti-IgG-peroxidase. Após a sua substituição, a partir do teste para o período de 142 dias, houve a recuperação dos níveis de reatividade, àqueles medidos inicialmente. Observou-se portanto, a estabilidade da ligação entre o Suporte-Resina e os antígenos, por um período superior a 8 meses. Embora as leituras de absorvância, para os discos estocados a 37<sup>o</sup>C, tenham se reduzido a 80 - 90% da inicial, a estabilidade é considerada satisfatória.

Estes resultados de estabilidade obtidos pela ligação entre o Suporte-Resina e os antígenos, para longos períodos de estocagem à altas temperaturas, seriam impossíveis caso a ligação da proteína ao suporte se desse por simples adsorção física, pois as fracas forças nela envolvidas, não resistiriam a tais condições. Isto sugere que a ligação do antígeno ao Suporte-Resina deve dar-se por covalência (reação química) ou por adsorção química, que exigiria uma alta energia de ativação para dessorção.

A manutenção da reatividade dos discos nos Testes ELISA, demonstra também que os antígenos ligados, não tiveram suas propriedades de especificidade alteradas, durante o período de estocagem.

#### 4.5.2.2. O Efeito da Tensão Iônica e pH (o uso de Soluções Eluentes)

A ligação por adsorção física de uma molécula à uma superfície ou a outra molécula, como ocorre na interação antígeno-anticorpo, pode ser quebrada na presença das chamadas soluções eluentes, como Uréia 2 M ou 8 M, ou Glicina - HCl 0,1 M NaCl 0,15 M, de pH 2,8.

Na prática estas soluções são usadas para separação de complexos antígeno-anticorpo, formados em colunas de purificação, como se mostrou na Figura 2.18, do ítem 2.4 deste trabalho.

Na presença dessas soluções grande parte das moléculas ligadas por adsorção física, são liberadas.

A ligação covalente não é tão sensível à essas variações de tensão iônica ou pH, nas suas proximidades.

Para se verificar o efeito das soluções eluentes, sobre a ligação entre a imunoproteína e o Suporte-Resina, discos de 8,3mm de diâmetro de Suporte-Resina, com  $\frac{35 \text{ g NMA}}{\text{m}^2}$ , foram sensibilizados com soluções de IgG, nas concentrações de 0,5; 5,0 e 25,0  $\mu\text{g IgG/ml}$ , com IgG -  $^{125}\text{I}$  como traçador (1 ml/disco).

Pela leitura de radioatividade, determinou-se a quantidade de proteína ligada por disco, incubando-se em seguida discos sensibilizados em soluções eluentes: Uréia 8 M e Glicina-HCl 0,1M NaCl 0,15 M pH 2,8 e em PBS 20 mM pH 7,5 como controle, usando-se 1 ml/disco sensibilizado, por 2 horas, à temperatura ambiente, sob agitação.

Após a incubação, mediu-se novamente a radioatividade

de cada disco, determinando-se a massa de IgG, que permaneceu ligada ao disco de Suporte-Resina.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.21.

Tabela 4.21 - Porcentagem de proteína IgG, ligada por disco na reação de sensibilização, que permanece ligada, após o contato do disco com soluções eluentes

Concentração da solução de sensibilização µg IgG/ml	µg IgG ligada disco (Pré-eluição)	Controle	Soluções Eluentes	
		PBS pH 7,5	Uréia 8 M	Glicina-HCl 0,1M NaCl 0,15 M pH 2,8
0,5	0,30	90,5%	83,3%	100,0%
5,0	2,84	93,9%	86,4%	95,4%
25,0	7,89	95,8%	82,5%	95,0%

Como se observa na Tabela 4.21, os discos testados apresentam quantidades de proteína ligada de até cerca de 8,0 µg de IgG/disco, que embora sejam suficientes para testes imunoenzimáticos, estão longe das quantidades de até 174,4 µg de IgG/disco, que se conseguiu ligar, para a oferta de 1500 µg IgG/disco (Figura 4.7). Testes de eluição para quantidades ligadas, acima de 10 µg IgG/disco até 174 µg de IgG/disco, seriam interessantes para auxiliar a demonstração da ocorrência de formação de multicamadas.

As altas porcentagens obtidas de retenção de moléculas de proteína para as quantidades de proteína ligada testadas, mostram que a ligação é bem estável às variações de tensão iônica e pH, como é característico de uma ligação covalente ou por adsorção química.

Os experimentos realizados para estudar a estabilidade da ligação de antígenos e anticorpos ao Suporte-Resina, em relação à temperatura, tempo de estocagem e contato com soluções eluentes, mostraram que para as quantidades de proteína ligadas por disco de Suporte-Resina testadas, que são maiores que as usualmente encontradas em outros imunosorventes utilizados em Testes ELISA, a ligação da proteína é muito estável, resistindo às temperaturas de 56°C e 37°C por períodos de vários meses. Estes resultados só seriam possíveis, para ligações através de reação química ou adsorção química, com alta energia de ativação para dessorção.

#### 4.6. Avaliação da Capacidade de Captação de IgG em solução, para Imunosorventes Preparados com Suporte-Resina e Diferentes Quantidades de Anti-IgG Imobilizada, visando sua utilização em Testes ELISA. Discussão da Natureza da Interação Imunosorvente - IgG em Solução

Para que discos de Suporte-Resina com proteínas imobilizadas possam ser usados como imunosorventes em Testes ELISA, proporcionando determinações quantitativas, eles deverão possuir quantidade suficiente de proteína ligada, de modo a captar, quando em contato com soluções de soros desconhecidos, quantidades sempre proporcionais da proteína

específica presente, sem que ocorra a sua saturação, a partir de alguma concentração do soro.

Para cada tipo de antígeno ou anticorpo existem no soro sanguíneo concentrações limites, que determinam após exaustivos ensaios, a quantidade de proteína específica, que se deverá ter no imunosorvente para uma análise quantitativa.

A interação antígeno-anticorpo que ocorre entre o imunosorvente e o soro em teste é específica e se dá por adsorção física, sendo uma reação de equilíbrio altamente influenciada pelas concentrações destas proteínas no imunosorvente e no soro.

Considerando a aplicação prática de discos de Suporte-Resina com proteínas imobilizadas como imunosorventes em determinações quantitativas em Testes ELISA, realizou-se ensaios para avaliação da capacidade de captação de IgG em solução a várias concentrações, simulando soros com vários níveis de reatividade, de discos de imunosorvente preparados com Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e várias quantidades de Anti-IgG ligadas por disco.

A partir do conhecimento prévio da natureza da interação antígeno-anticorpo, que se dá por adsorção física, aplicou-se os dados experimentais obtidos nos ensaios realizados, como discutido acima, em termos de concentração de equilíbrio de IgG e quantidade de IgG captada por disco, ao Modelo de Adsorção de Langmuir, para observar-se o comportamento das Isotermas de Adsorção obtidas, e verificar-se a natureza da interação.

Para a avaliação da capacidade de captação de IgG humana em solução, foram usados discos de 8,3 mm de diâmetro de malha de poliéster ( $292 \text{ g/m}^2$ ) com  $35 \text{ g NMA/m}^2$ , sensibilizados com soluções de Anti-IgG humana, obtendo-se quantidades ligadas de 0,44 ; 4,20 e 11,70  $\mu\text{g}$  Anti-IgG/disco (determinadas por radioimunoensaio). Trata-se portanto, de discos sensibilizados com anticorpos.

Discos destes imunosorventes, em triplicata, foram colocados em contato com soluções do anticorpo IgG humana, no caso funcionando como um antígeno, à concentrações variando de 0,16 a 10  $\mu\text{g}$  IgG/ml, com IgG -  $^{125}\text{I}$  como traçador. Utilizou-se 500  $\mu\text{l}$  de solução/disco e a reação processou-se a  $37^\circ\text{C}$ , por 1 hora.

Os resultados obtidos, expressos em ng de IgG captada/disco, estão apresentados na Tabela 4.22 e nas Figuras 4.15 e 4.16.

Na Figura 4.15, verifica-se que para o disco de imunosorvente com 0,44  $\mu\text{g}$  Anti-IgG, atinge-se um patamar de saturação em relação à captação de IgG, para uma oferta próxima de 1000 ng IgG/disco, quando se consegue captar cerca de 40 ng IgG/disco.

Já para o disco de imunosorvente com 4,20  $\mu\text{g}$  Anti-IgG, a curva da Figura 4.15 indica a tendência de formação de patamar de saturação, apenas para a oferta de IgG acima de 5000 ng IgG/disco, quando se capta cerca de 600 ng IgG/disco.

O disco de imunosorvente com 11,70  $\mu\text{g}$  Anti-IgG, entretanto, não indica o estabelecimento imediato de um patamar de saturação, que deve ser atingido para uma oferta de proteína,

Tabela 4.22 - Capacidade de Captação de IgG, para Discos de Imunossorventes Preparados com Suporte-Resina (35 g de NMA/m<sup>2</sup>) e várias quantidades de Anti-IgG ligadas. Resultados expressos em ng IgG captada/disco.

Concentração da solução de IgG, em contato com o Imunossorvente, $\frac{\mu\text{g IgG}}{\text{ml}}$	Massa de IgG oferecida $\frac{\text{ng IgG}}{\text{disco}}$	Concentração de Anti-IgG no Imunossorvente, $\frac{\mu\text{g Anti-IgG}}{\text{disco}}$		
		0,44	4,20	11,70
0,16	80	12,1 (15,1)*	23,9 (29,9)	26,0 (32,5)
0,31	155	20,3 (13,1)	44,5 (28,7)	44,4 (28,6)
0,62	310	29,0 (9,4)	78,7 (25,4)	89,6 (28,9)
1,25	625	29,9 (4,8)	150,0 (24,0)	168,8 (27,0)
2,50	1250	41,3 (3,3)	-	327,0 (26,0)
5,00	2500	38,9 (1,6)	454,0 (18,2)	571,5 (22,9)
10,00	5000	43,3 (0,9)	592,8 (11,9)	1019,2 (20,4)

\* Os números entre parêntesis, referem-se às porcentagens de IgG oferecida, que são captadas por disco de imunossorvente

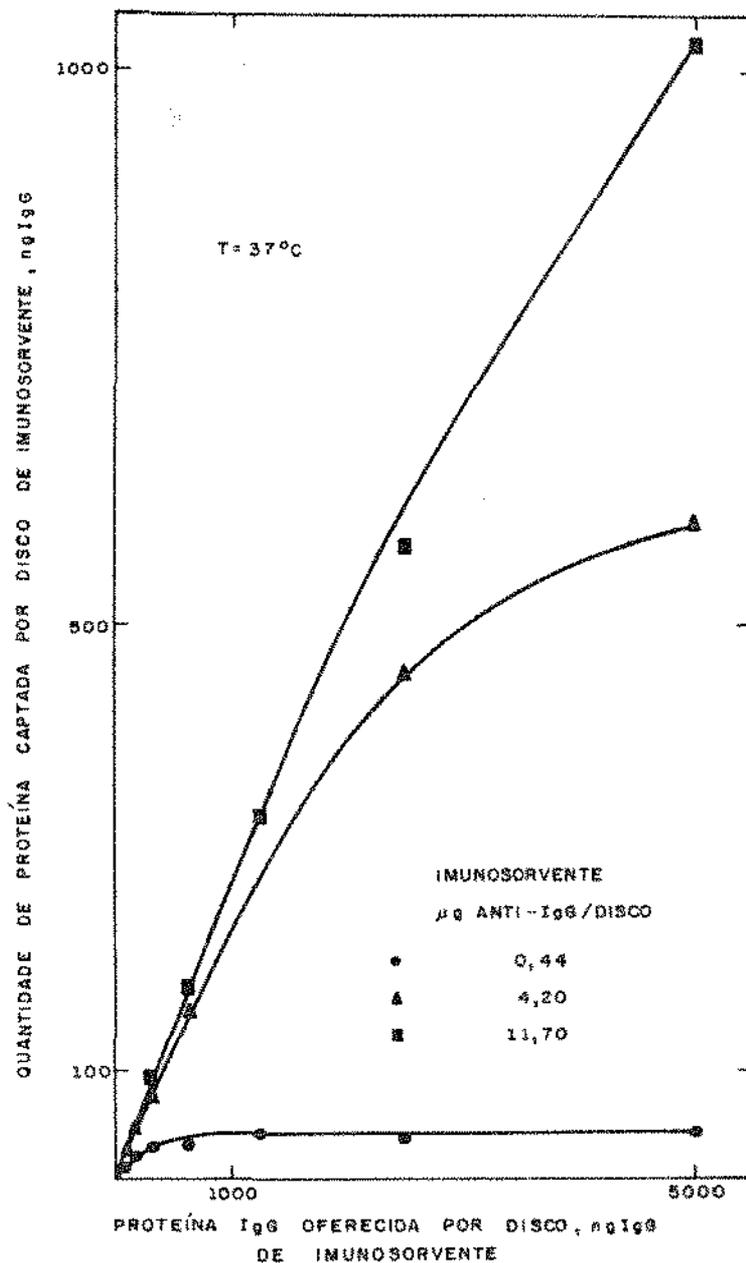


Figura 4.15 - Captação de IgG em solução (oferecida em diversas quantidades), por discos de Suporte-Resina com ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e várias quantidades de Anti-IgG ligadas, usados como imunosorvente

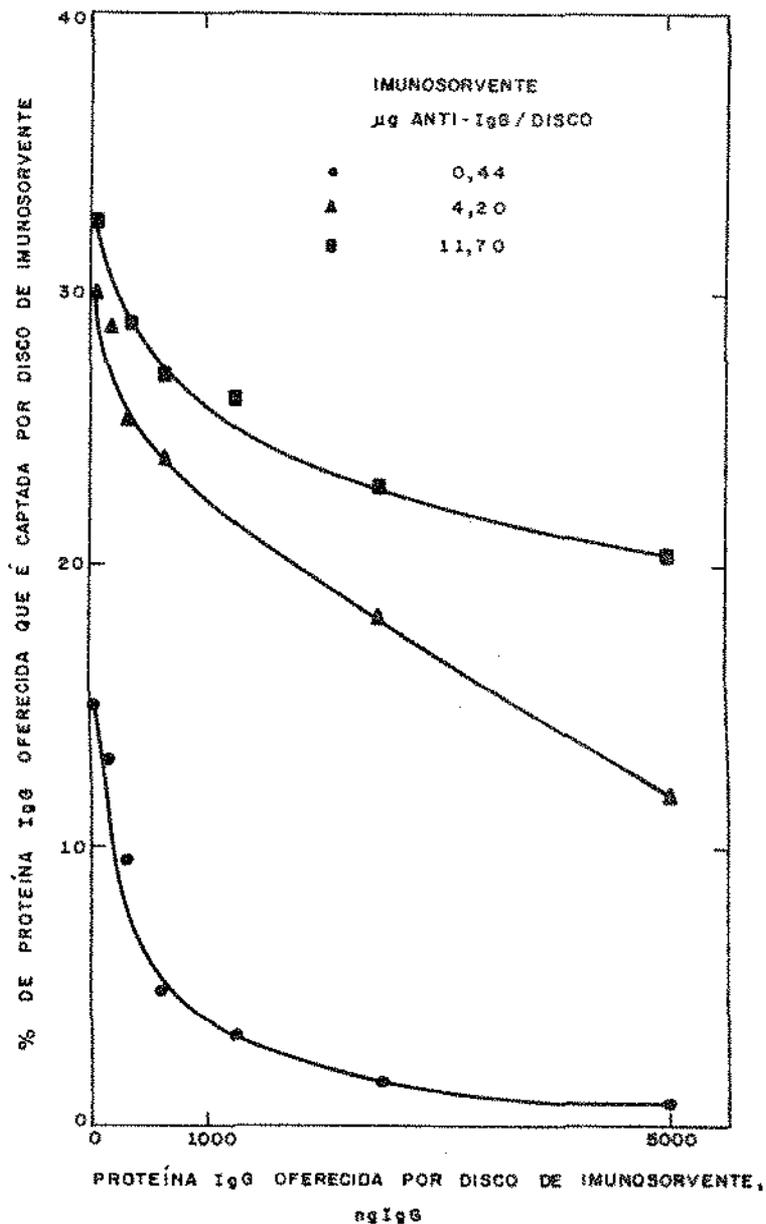


Figura 4.16 - % da massa de proteína IgG oferecida por discos de imunosorvente (Suporte-Resina com  $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e várias quantidades de Anti-IgG ligadas), que é captada por disco

superior a 10000 ng IgG/disco.

Da Figura 4.16 observa-se que a porcentagem de IgG oferecida, que se liga ao disco de imunosorvente, diminui com o aumento da oferta, bem mais acentuadamente para o disco com menor quantidade de Anti-IgG imobilizada, já que ele é mais precocemente saturado. Para os dois outros tipos de imunosorvente, embora a porcentagem caia, capta-se sempre por disco uma maior quantidade de IgG.

Observando-se o comportamento dos três imunosorventes testados, em relação à capacidade de captação de IgG, para as ofertas de IgG ensaiadas (de 80 a 5000 ng, Figura 4.15), em termos de utilização prática conclui-se que o imunosorvente com 0,44 µg de Anti-IgG não serviria para quantificar a proteína IgG, em todo o intervalo de concentrações testado.

A partir da oferta de 1000 ng IgG/disco, já se tem a saturação do imunosorvente e as quantidades de IgG captadas deixam de ter proporcionalidade com as concentrações de IgG, impedindo determinações quantitativas (Figura 4.15).

Tanto o imunosorvente com 4,20 µg Anti-IgG/disco, quanto o com 11,70 µg Anti-IgG/disco poderiam ser usados, já que não apresentaram a formação de patamar de saturação. Captou-se sempre quantidades crescentes de IgG, proporcionais à oferta (Figura 4.15).

Entretanto, a escolha poderia recair sobre o imunosorvente com 4,20 µg Anti-IgG/disco devido a motivos econômicos, relativos às dificuldades de obtenção, purificação e custo da proteína imobilizada.

Este intervalo de concentrações de IgG oferecido para

os discos de imunosorvente, de 80 a 5000 ng IgG/disco, compreende na prática, o intervalo de concentrações de anticorpos normalmente presentes em soros desconhecidos, às diluições usuais usadas em Testes ELISA.

Como quantidades de proteína da ordem de 10,0  $\mu\text{g}$ , são facilmente ligadas por disco de Suporte-Resina (35 g NMA/ $\text{m}^2$ ) como se vê na Figura 4.7, resultados quantitativos podem ser obtidos sem dificuldades para Testes ELISA, usando discos de Suporte-Resina sensibilizados com proteína, como imunosorvente.

Considerando-se agora, que a interação entre um antígeno e um anticorpo, se dá por adsorção física, aplicou-se os dados de equilíbrio obtidos em termos de quantidade de IgG captada em relação à concentração de IgG de equilíbrio, ao Modelo de Adsorção de Langmuir, para os três imunosorventes com Anti-IgG ligada testados.

Os parâmetros calculados para as Isotermas de Langmuir, nas formas Normal e Linearizada, estão apresentados na Tabela 4.23 e nas Figuras 4.17 e 4.18.

Na Figura 4.17 verifica-se que as curvas obtidas para os imunosorventes com 0,44 e 4,20  $\mu\text{g}$  IgG/disco, apresentam o formato característico da Isoterma de Langmuir (Formato I, Figura 2.32). O imunosorvente com 11,70  $\mu\text{g}$  Anti-IgG/disco não apresenta ainda um patamar de saturação visível, que deve ser atingido para concentrações de equilíbrio bem maiores que as testadas.

Da Figura 4.18, obteve-se os coeficientes angulares, lineares e de correlação para as três retas obtidas, e a partir deles, os parâmetros  $N_m$  e  $K$  para cada imunosorvente testado. Os

Tabela 4.23 - Parâmetros para Isotermas de Langmuir. Adsorção de antígeno (IgG) por anticorpo (Anti-IgG), imobilizado em várias quantidades, nos imunosorventes

Imunosorvente <u>µg Anti-IgG</u> disco	ng de IgG <u>oferecida</u> disco	X/W ng de IgG <u>captada</u> disco	C <u>µg IgG</u> ml	$\frac{C}{X/W}$ <u>disco</u> ml
0,44	80	12,1	0,14	12,0
	155	20,3	0,27	13,0
	310	29,0	0,56	19,0
	625	29,9	1,19	40,0
	1250	41,3	2,42	59,0
	2500	38,9	4,92	126,0
	5000	43,3	9,91	229,0
4,20	80	23,9	0,11	4,6
	155	44,5	0,22	4,9
	310	78,7	0,46	5,8
	625	150,0	0,95	6,3
	2500	454,0	4,09	9,0
	5000	592,8	8,81	14,9
11,70	80	26,0	0,11	4,2
	155	44,4	0,22	5,0
	310	89,6	0,44	4,9
	625	168,8	0,91	5,4
	1250	327,0	1,85	5,7
	2500	571,0	3,86	6,8
	5000	1019,0	7,62	7,5

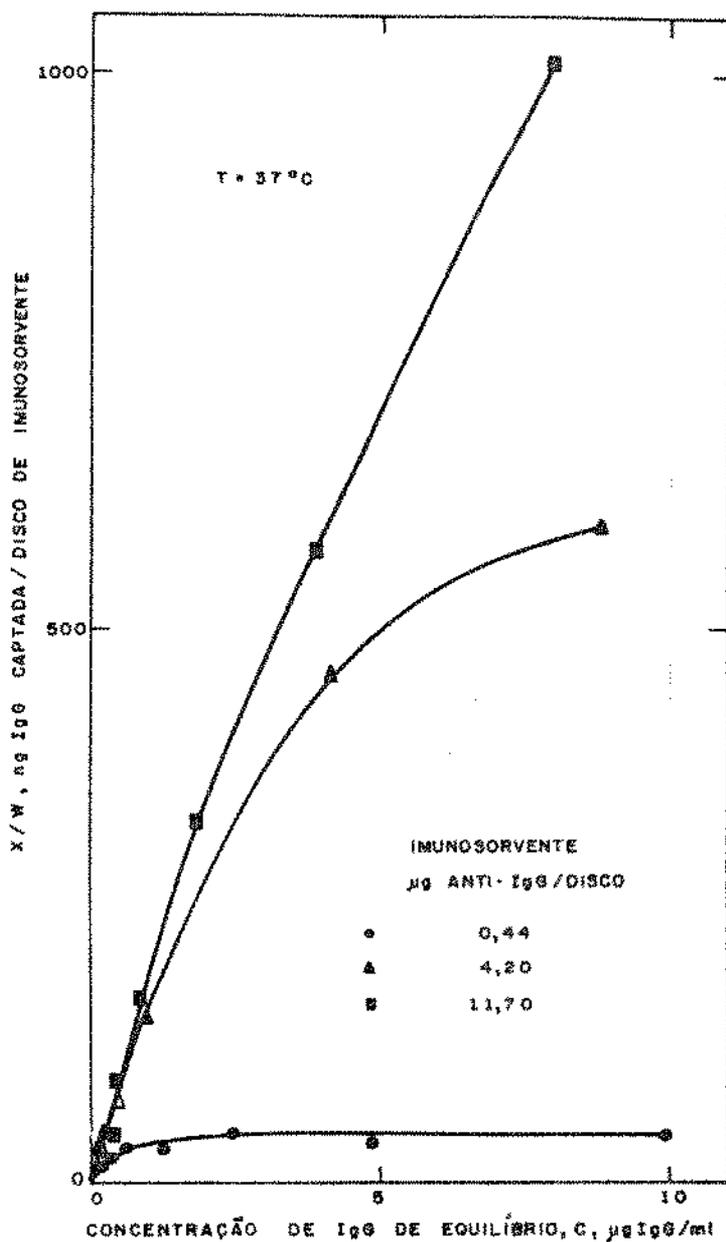


Figura 4.17 - Isothermas de Adsorção de Langmuir na forma normal, para dados de equilíbrio de captação de IgG em solução, por discos de imunosorvente (Suporte-Resina com  $35 \text{ g NMA/m}^2$  e várias quantidades de Anti-IgG ligadas)

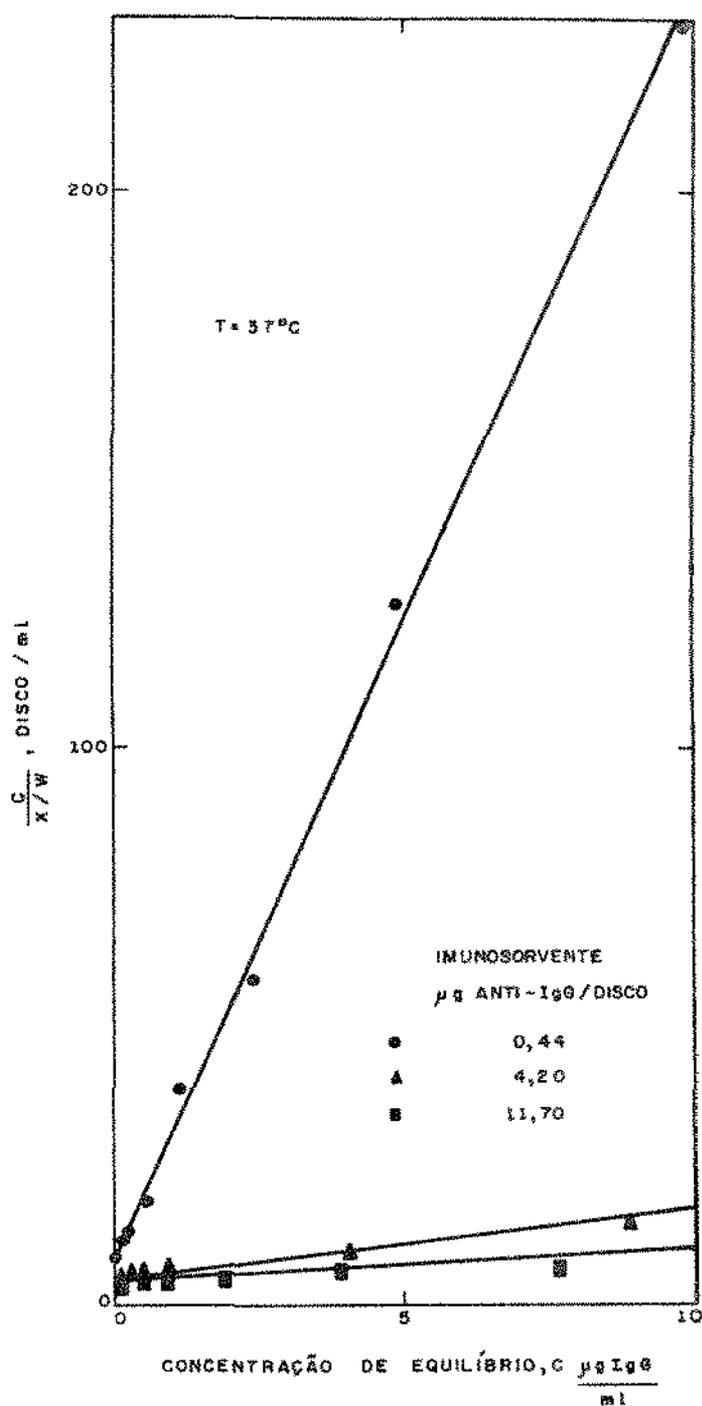


Figura 4.18 - Isothermas de Adsorção de Langmuir na forma linearizada, para dados de equilíbrio de captação de IgG em solução, por discos de imunosorvente (Suporte-Resina) com 35 g NMA/m<sup>2</sup> e várias quantidades de Anti-IgG ligadas

valores obtidos estão apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24 - Coeficientes e Parâmetros Nm e K, obtidos das Retas da Figura 4.18.

Imunossorvente <u>ng Anti-IgG</u> disco	Coeficiente linear	Coeficiente angular	Coeficiente correlação	Nm <u>ng IgG</u> disco	K <u>ml</u> <u>µg IgG</u>
440	8,81	22,48	0,9987	44 (10%)*	2,58
4200	4,84	1,13	0,9952	889 (21%)*	0,23
11700	4,80	0,39	0,9453	2533 (21%)*	0,08

\* Os valores entre parêntesis representam as porcentagens em peso de IgG que são captadas, em relação à quantidade de Anti-IgG ligada, por disco de imunossorvente.

Os valores dos coeficientes de correlação obtidos, especialmente para os imunossorventes com 0,44 e 4,20 µg Anti-IgG/disco, indicam um bom ajuste do Modelo de Langmuir aos dados experimentais, para a temperatura testada, confirmando a ocorrência de adsorção, na interação antígeno-anticorpo.

Os valores obtidos para os parâmetros Nm (quantidade de proteína necessária para formar a monocamada), praticamente coincidem, para os imunossorventes com 0,44 e 4,20 µg Anti-IgG/disco, com as quantidades máximas de IgG captadas por disco, obtidas dos patamares de saturação da Figura 4.15.

Os valores obtidos para a porcentagem em peso de IgG,

que é captada, em relação à quantidade de Anti-IgG imobilizada por disco, apresentados entre parêntesis na Tabela 4.24, indicam uma tendência de não se captar por disco, mais que 20% em peso da proteína imobilizada, o que pode ser efeito de equilíbrio e/ou da perda de especificidade, de parte das moléculas de Anti-IgG, quando da imobilização ao Suporte-Resina.

Estes experimentos realizados demonstraram a viabilidade do uso de discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) com proteínas imobilizadas como imunosorventes, para determinações quantitativas em Testes ELISA, pois as quantidades de imunoproteína que se tem que imobilizar por disco de Suporte-Resina, para quantificação de anticorpos e mais raramente de antígenos, em concentrações usualmente presentes em soros às diluições usadas em Testes ELISA, são facilmente atingidas na reação de imobilização ou sensibilização dos discos de Suporte-Resina.

A adequação do Modelo de Adsorção de Langmuir aos dados de equilíbrio obtidos confirma a natureza da interação antígeno-anticorpo como uma adsorção, estabelecendo-se uma relação única entre as quantidades de proteína ligadas e as quantidades captadas.

#### 4.7. Estudo Sistemático do Desempenho do Imunosorvente Desenvolvido no Teste ELISA para Doença de Chagas

Tendo o Suporte-Resina desenvolvido ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ), apresentado bons resultados de capacidade de ligação de proteína e estabilidade de ligação, iniciou-se então um estudo sistemático de avaliação do desempenho do imunosorvente preparado a

partir do Suporte-Resina em Testes ELISA, tenho sido escolhido o antígeno da Doença de Chagas para a sensibilização dos discos.

Dos inúmeros testes sorológicos descritos para auxiliar o diagnóstico da Doença de Chagas, ou para a triagem de doadores de sangue contaminados, o Teste ELISA utilizando placas de poliestireno com antígeno adsorvido como imunosorvente, é um dos testes mais eficientes para medida de anticorpos contra o Trypanosoma cruzi.

Neste estudo, ainda em desenvolvimento no Instituto de Medicina Tropical (IMT), da USP, o Teste ELISA com discos está sendo avaliado segundo as suas características de sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade e reatividade cruzada, para se fazer então uma comparação com o Teste ELISA com placas de poliestireno, visando sua aplicação em larga escala.

Sensibilidade refere-se à mínima quantidade de material desconhecido, detectável pelo teste. Um teste com alta sensibilidade consegue diferenciar soros positivos de soros negativos de maneira satisfatória.

Reprodutibilidade pode ser definida referindo-se à comparação de resultados inter-ensaio e intra-ensaio. A reprodutibilidade inter-ensaio indica o desvio que ocorre em resultados de amostras, avaliados num período de tempo finito como dias, semanas ou meses. Reprodutibilidade intra-ensaio, praticamente se confunde com a precisão, quando o desvio-padrão é considerado, mas outros testes estatísticos podem ser feitos. Precisão é a habilidade do teste de reproduzir repetidamente, o mesmo resultado, para a mesma amostra.

A especificidade refere-se à habilidade do teste, na identificação de uma substância particular, numa mistura de substâncias. No caso do Teste ELISA, a especificidade está relacionada à reatividade cruzada que pode ocorrer, e que vai depender dos sítios de ligação do anticorpo, e de sua capacidade de se combinar apenas com sítios receptores muito específicos do antígeno.

Num estudo inicial, que será relatado a seguir, avaliou-se um "kit" completo para Teste ELISA, composto por discos de Suporte-Resina sensibilizados com antígeno de Trypanosoma cruzi como imunosorvente, soluções de conjugado enzimático e de substrato para a enzima, utilizando-se um painel de soros chagásicos e não-chagásicos, analisados de acordo com uma rotina bem definida. Os resultados relatados nos itens a seguir foram anteriormente apresentados por Michael et al<sup>(101)</sup>, em 1985.

#### 4.7.1. Painel de Soros Humanos Utilizado

Neste estudo inicial foi utilizado um painel de 182 soros, selecionados para a avaliação de testes sorológicos, propostos para Doença de Chagas (Soroteca do Instituto de Medicina Tropical, da USP).

São 85 soros positivos extraídos de pacientes mostrando certeza de contaminação com o parasita, ou alta probabilidade de infecção crônica de Trypanosoma cruzi, e 97 soros negativos, extraídos de indivíduos com alta probabilidade de não possuírem infecções por Trypanosoma ou Leishmania. Todos os soros foram anteriormente testados, por Imunofluorescência e Hema-glutinação.

#### 4.7.2. Titulação dos Soros do Painel

Como imunosorvente foram utilizados discos de 8,3 mm de diâmetro de malha de poliéster ( $292 \text{ g/m}^2$ ), com  $35 \text{ g NMA/m}^2$ , sensibilizados com extrato proteico de Trypanosoma cruzi, na concentração de  $10 \text{ µg/ml}$ , utilizando-se 5 discos por ml de solução.

Duplicatas de cada amostra de soro do painel diluídas de 1/40 foram ensaiadas, lendo-se a absorvância obtida.

Verificou-se, entretanto, a ocorrência de pequenas variações diárias das absorvâncias lidas para um soro a várias diluições, decorrentes da utilização de reagentes instáveis ou de difícil padronização, na rotina do teste (conjugado enzimático e solução cromógena). Isto pode ser observado na Figura 4.19, que traz curvas dose-resposta, para um soro de referência B, ensaiadas em 12 ocasiões diferentes. Entretanto, mesmo com as variações, as relações obtidas mostraram sempre linearidade.

A fim de se evitar a influência desta variação diária de sensibilidade, na determinação dos títulos dos soros do painel, pelo Teste ELISA com discos, tomou-se como referência 2 soros reativos A e B, que foram ensaiados em triplicatas, na diluição de 1/40, a cada bateria de testes realizada.

Ao soro de referência B, foi atribuído o título de 640, baseado nas curvas dose-resposta da Figura 4.19, em que para a diluição 1/640, as leituras de absorvâncias se aproximaram das obtidas para um soro negativo.

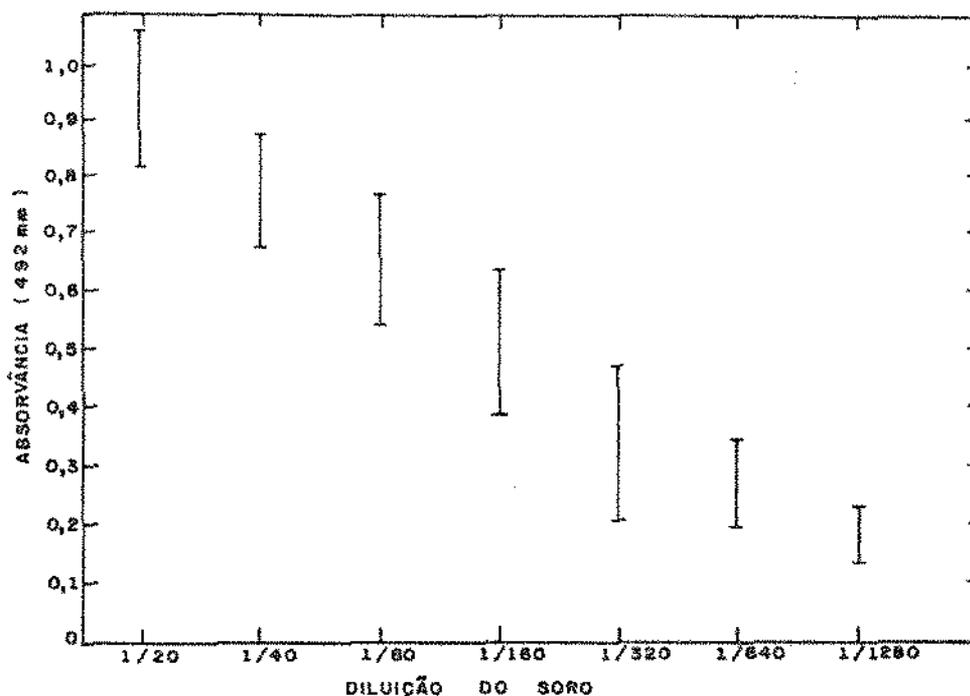


Figura 4.19 - Variações das curvas dose-resposta, para um soro chagásico de referência, B, ensaiadas em 12 dias diferentes, em Testes ELISA para Doença de Chagas, com discos de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>) e antígeno de Trypanosoma cruzi (101)

Como já foi comentado, o título de um soro em Imunologia, corresponde à diluição do soro em teste a que se deve chegar, para que o resultado se aproxime do resultado médio obtido para um painel de soros negativos.

É também comum representar-se o título de um soro, pelo logaritmo na base 10 da diluição encontrada. Para o soro B :  $\text{Log}_{10} 640 = 2,8$ .

O soro da referência A, com título de 80 ( $\text{Log}_{10} 80 = 1,9$ ), foi obtido diluindo-se o soro B de 1/8, com um soro não-reativo.

Os títulos dos soros do painel, foram portanto, deter

minados a partir de uma reta traçada a cada bateria de testes, ligando os pontos obtidos dos valores médios de absorvância lidas, para as triplicadas dos soros de referência A e B ensaiadas, e dos seus títulos 1,9 e 2,8 previamente determinados, como se pode ver na Figura 4.20.

A partir do valor médio de absorvância lido, para cada soro em teste, através da reta da Figura 4.20, obteve-se o título expresso como  $\text{Log}_{10}$ , de uma diluição atribuída ao soro.

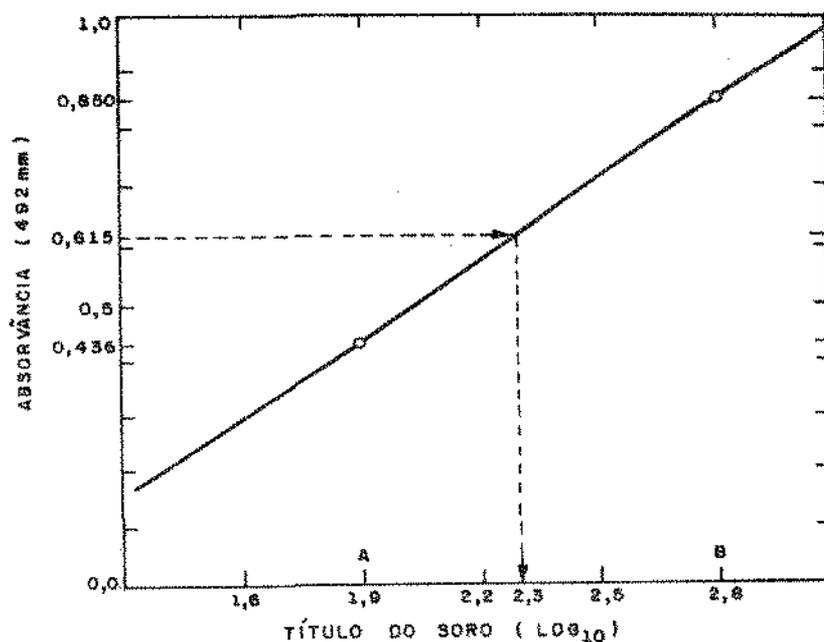


Figura 4.20 - Exemplo de determinação do título, para soros chagásicos e não-chagásicos do painel testado, usando soros de referência A e B, em Testes ELISA, com discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e antígeno de Trypanosoma cruzi (101)

A distribuição de títulos, obtida para o painel de soros testado, está apresentada na Figura 4.21.

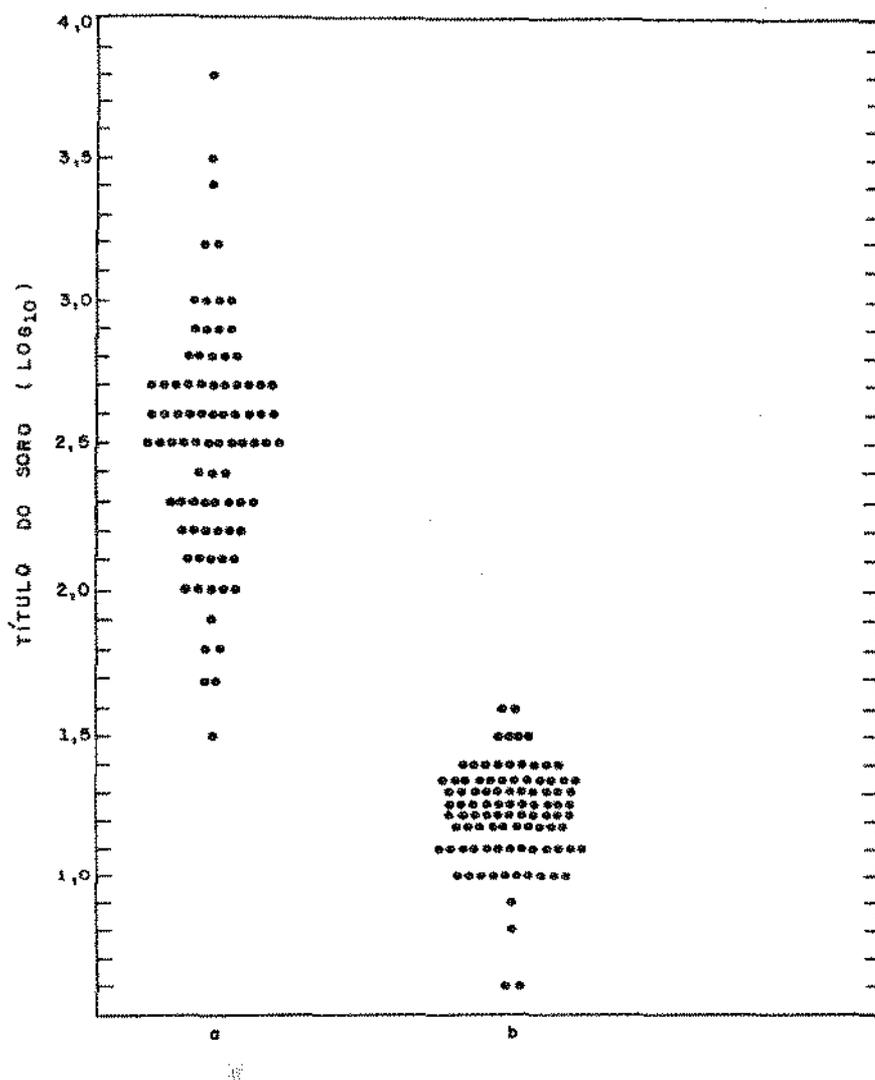


Figura 4.21 - Distribuição dos títulos obtidos para os 85 soros chagásicos (alínea a) e 97 soros não-chagásicos (alínea b) do painel testado, dados como  $\text{Log}_{10}$ (título), determinados em Testes ELISA com discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e antígeno de Trypanosoma cruzi (101)

Para os soros não-chagásicos, o valor do título médio foi de 1,21, com um desvio-padrão de 0,16.

O título médio obtido para os soros chagásicos foi de 2,51, com desvio padrão de 0,40.

Foi necessário estabelecer-se então, um limiar de reatividade discriminatório, entre as reações consideradas positivas e negativas.

Como Título de Corte, ou seja, o título a partir do qual o soro é considerado positivo, foi arbitrariamente tomado o valor de 1,7, que corresponde ao valor do título médio para os soros negativos (não-chagásicos), mais 3 vezes o desvio-padrão encontrado.

Qualquer título obtido abaixo de 1,7, foi considerado negativo, e títulos iguais ou acima de 1,7, foram considerados positivos.

#### 4.7.3. Sensibilidade

Para o painel de soros testados, considerando-se o Título de Corte estabelecido como 1,7, pode-se verificar na Figura 4.21, que o Teste ELISA com discos, deu como sendo negativo apenas um dos 85 soros positivos testados, o que confere ao teste uma sensibilidade de 98,8%.

#### 4.7.4. Reprodutibilidade

Intra-ensaio : Como se pode observar na Figura 4.22, a Reprodutibilidade Intra-ensaio foi avaliada comparando-se as absorvâncias lidas para 25 duplicatas de soros reativos do painel, selecionadas aleatoriamente entre as 85 determinações rea

lizadas, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,887, e para 25 duplicatas de soros não-reativos do painel, selecionadas da mesma forma entre as 97 determinações realizadas, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,874.

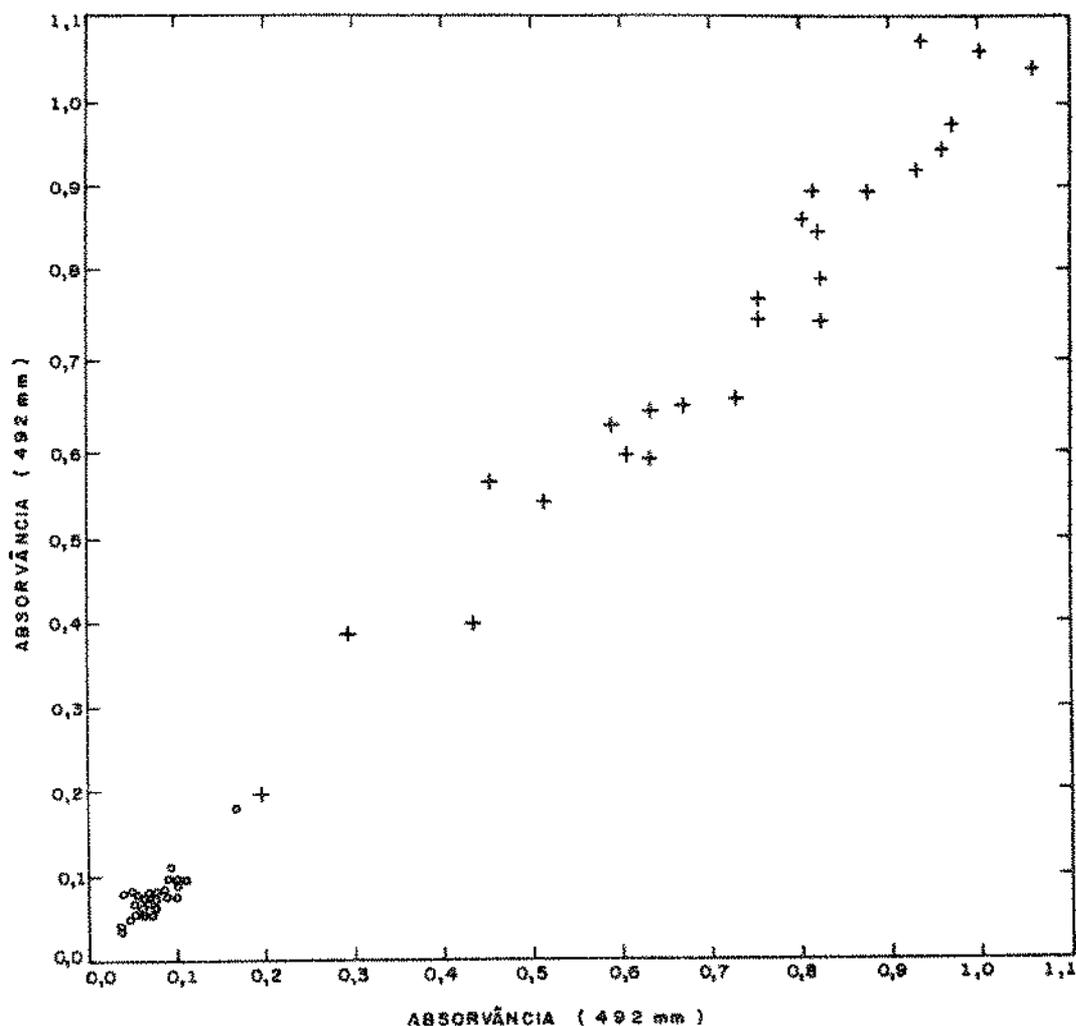


Figura 4.22 - Reprodutibilidade Intra-ensaio. Comparação das absorvâncias medidas para 25 duplicatas de soros chagásicos(+) e 25 duplicatas de soros não-chagásicos(o), em Testes ELISA, com discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ) e antígeno de Trypanosoma cruzi. Coeficientes de correlação obtidos: 0,887 para soros chagásicos e 0,874 para soros não-chagásicos (101)

Inter-ensaio: A Reprodutibilidade Inter-ensaio foi avaliada comparando-se títulos obtidos para 24 amostras de soros positivos, ensaiadas em dias diferentes.

Na Figura 4.23, estão correlacionados os títulos obtidos após correção com os soros de referência A e B ensaiados a cada dia, obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,834.

Como se vê na Figura 4.24, correlacionando-se diretamente as absorvâncias lidas, para as mesmas 24 amostras em dias diferentes, sem se fazer a correção das variações diárias através dos soros de referência A e B, obteve-se o coeficiente de correlação de 0.730, o que justifica o método usado para a determinação dos títulos dos soros.

#### 4.7.5. Especificidade e Reatividade Cruzada

A Especificidade do Teste ELISA com discos, para o painel de soros testado, foi de 100%, já que todos os soros negativos testados, apresentaram título inferior ao Título de Corte.

No entanto, a fim de se avaliar a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas no teste, ou seja, a identificação de um soro negativo como positivo, em adição ao painel de soros testado também foram ensaiadas 56 outras amostras de soro, com as seguintes características:

a) Soros de 10 casos de Leishmaniose cutânea, considerados positivos por Imunofluorescência e Teste ELISA com placa de poliestireno;

b) Soros de 10 casos de Calazar com diagnóstico clínico e laboratorial;

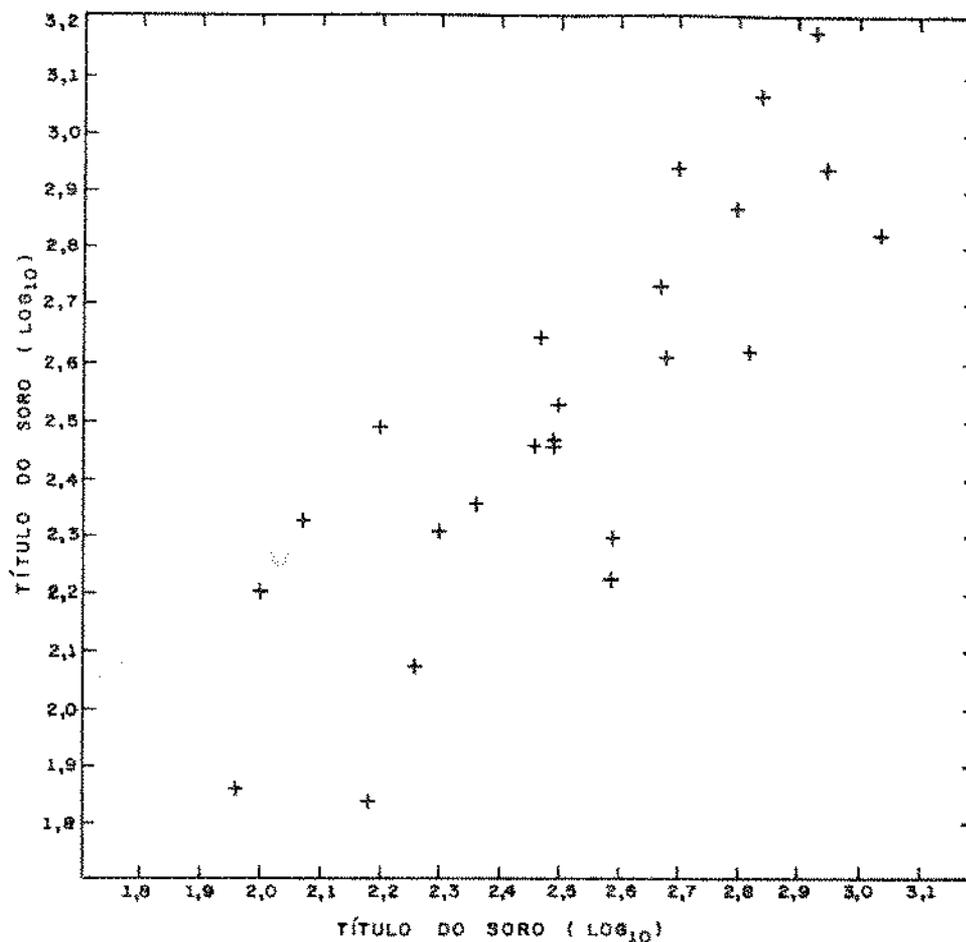


Figura 4.23 - Reprodutibilidade Inter-ensaio. Comparação de duplicatas de títulos de 24 soros chagásicos , determinados em dias diferentes, em Testes ELISA com discos de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>) e antígeno de Trypanosoma cruzi<sup>(101)</sup>. Coeficiente de correlação obtido : 0,834

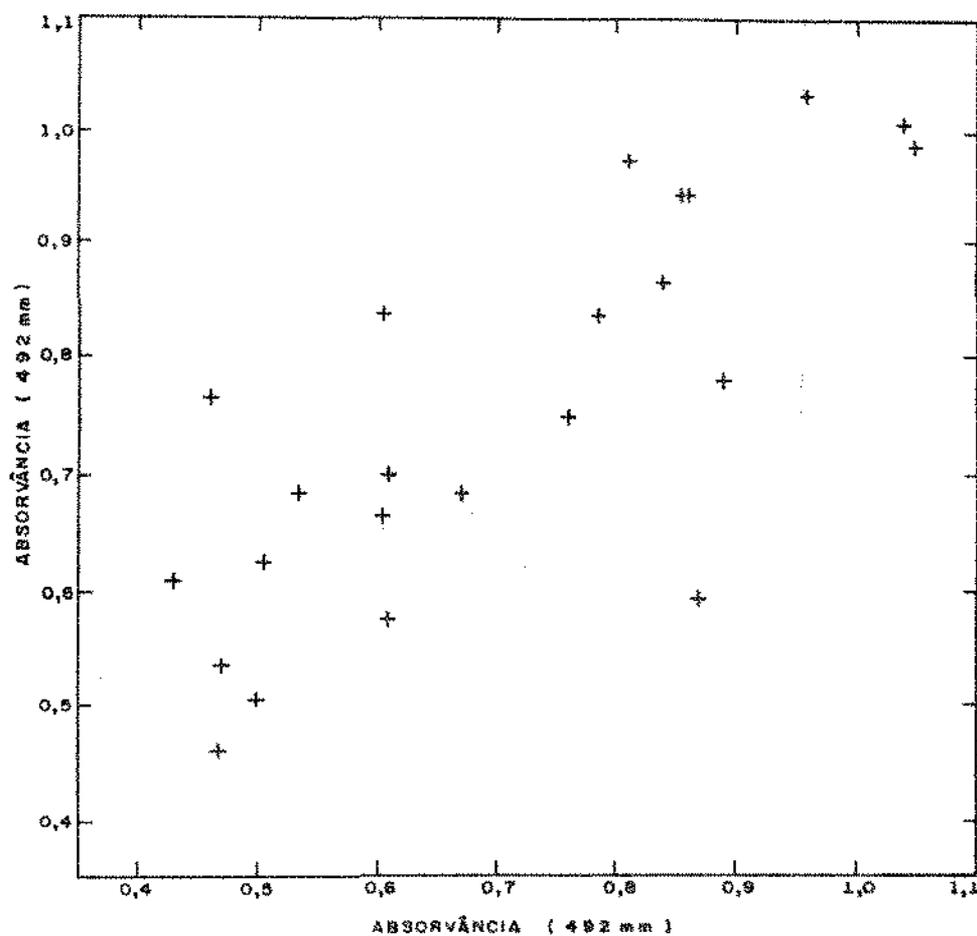


Figura 4.24 - Reprodutibilidade Inter-ensaio. Comparação de duplicatas das absorvâncias (492 nm) lidas para os mesmos 24 soros chagásicos da Figura 4.23, sem se fazer a correção pelos soros de referência A e B.<sup>(101)</sup>. Coeficiente de correlação obtido : 0,730

c) Soros de 2 casos de Calazar, considerados positivos por Imunofluorescência e Fixação de Complemento;

d) Soros de 34 pacientes com outras doenças, com diagnóstico clínico e laboratorial, ou autoanticorpos.

A existência nestes soros de anticorpos contra outros tipos de antígeno, que não deveriam em princípio, reagir com o antígeno de Doença de Chagas imobilizado no imunosorvente, servirá para demonstrar a ocorrência de reações cruzadas, dando resultados falso-positivos.

Os resultados obtidos pelos Testes ELISA com discos para Doença de Chagas realizados com estes 56 soros, estão apresentados na Tabela 4.25, onde estão distribuídos de acordo com o diagnóstico de cada soro.

Tabela 4.25 - Resultados de Testes ELISA com discos, para Doença de Chagas, realizados para 56 soros com outras infecções (101)

Diagnóstico	Nº de soros	Positivos	Negativos
Leishmaniose	10	0	10
Calazar	12	2	10
Toxoplasmose	3	0	3
Autoanticorpos	3	0	3
Leptospirose	2	0	2
Esquistossomose	3	0	3
Malária	1	0	1
Histoplasmose	3	0	3
Cisticercose	2	0	2
Paracoccidiodomicose	3	0	3
Tétano	3	0	3
Artrite reumática	2	0	2
Sífilis	3	0	3
Mononucleose	3	0	3
Toxocaríase	3	0	3

Como se vê na Tabela 4.25, resultados falso-positivos foram observados apenas para 2 casos de Calazar. Esta interferência já era, porém, esperada.

Uma maior especificidade resultaria da substituição do extrato proteico de Trypanosoma cruzi usado como antígeno, por antígenos purificados do parasita, como as glicoproteínas GP - 90<sup>(98)</sup> e GP - 25<sup>(99)</sup>.

#### 4.8. Teste ELISA com Placas de Poliestireno Sensibilizados, para Doença de Chagas

Para o Teste ELISA utilizando placas de poliestireno sensibilizadas com antígeno de Doença de Chagas como imunosorvente, cada uma das amostras de soro do painel descrito no item anterior, foi ensaiada na diluição de 1/100, estando os resultados obtidos, expressos em absorvância, apresentados na Figura 4.25.

Para os 97 soros não-chagásicos, a absorvância média medida foi de 0,07, com um desvio-padrão de 0,04.

As absorvâncias lidas para os 85 soros chagásicos, variaram de 0,80 a 1,95, com um valor médio de 1,67.

O valor de Absorvância de Corte, acima do qual o resultado do teste é considerado positivo, foi tomado arbitrariamente como 0,19, correspondendo ao valor médio para os soros não-chagásicos, mais três vezes o desvio-padrão.

##### 4.8.1. Sensibilidade

Considerando-se a Absorvância de Corte tomada como 0,19, da Figura 4.25 observa-se que para o painel de soros tes

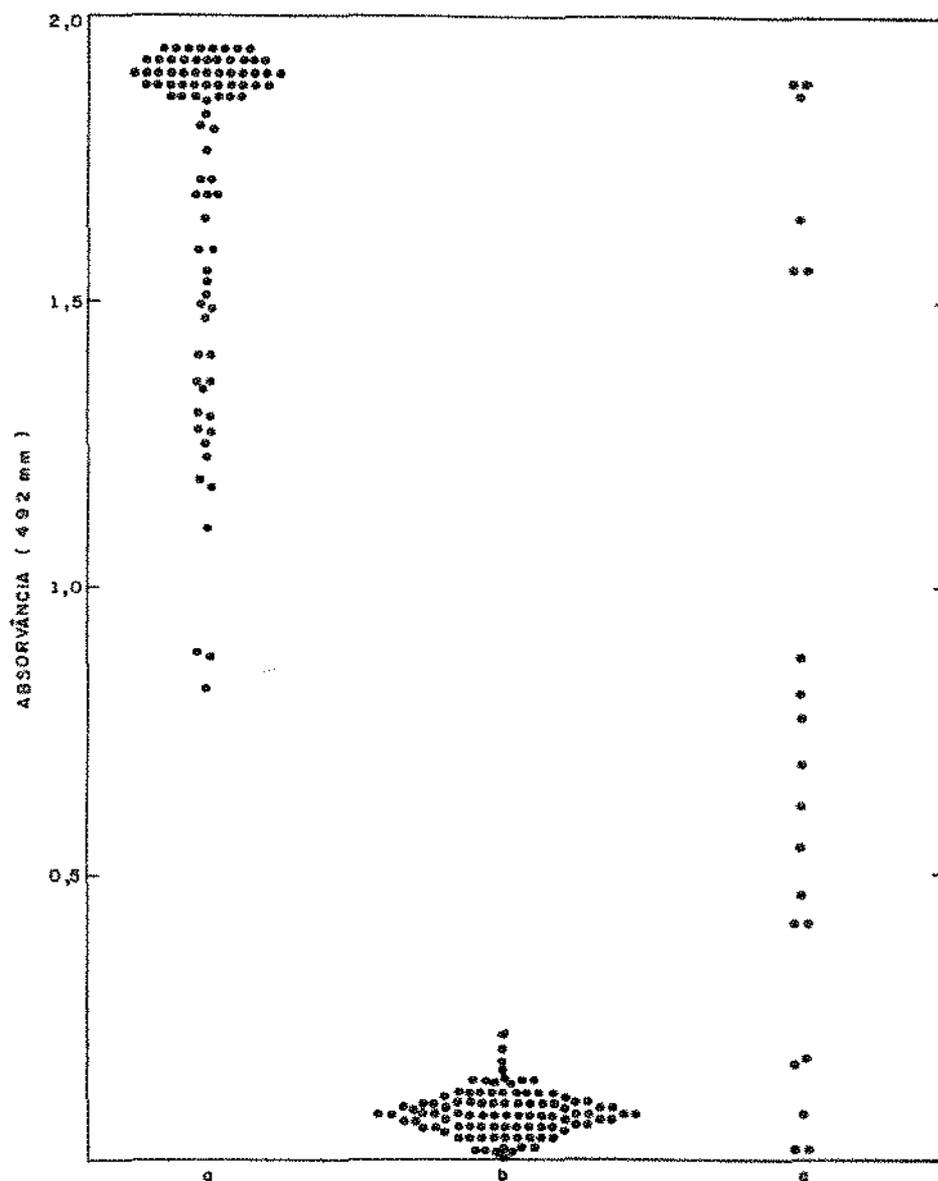


Figura 4.25 - Distribuição das absorvâncias lidas, para 85 soros chagásicos (alínea a), 97 soros não-chagásicos (alínea b) e 20 casos de Calazar (alínea c), em Testes ELISA com placas de poliestireno para Doença de Chagas, de Camargo et al<sup>(100)</sup>, em publicação.

tado , não houve nenhuma identificação de soro positivo como negativo, o que confere ao teste uma sensibilidade de 100%.

#### 4.8.2. Especificidade e Reatividade Cruzada

A especificidade do teste para o painel de soros testado , foi de 97,9%, já que para o grupo de soros não-chagásicos, 2 soros apresentaram absorvâncias superiores à de Corte (0,19).

A fim de avaliar-se a possibilidade de ocorrência de Reações Cruzadas, pela presença de anticorpos contra Calazar, testou-se um conjunto de 20 soros de pacientes com Calazar, todos reativos em vários outros imunoenaios .

Como se pode ver dos resultados obtidos, também apresentados na Figura 4.25 (alínea c), os valores de absorvância variaram muito entre si, indo desde 0,01 até 1,90 (média de 0,77), dando resultados positivos para 16 casos.

#### 4.9. Comparação do Teste ELISA com Discos, com o Teste ELISA com Placas de Poliestireno, para a Doença de Chagas

Os títulos obtidos para os soros do painel testado pelo Teste ELISA com discos, mostraram boa correspondência com os obtidos pelo Teste ELISA com placas de poliestireno.

Para ambos os testes obteve-se do mesmo modo , altas sensibilidade e especificidade (Co-positividade de 98,8% e co-negatividade de 97,7%).

A reprodutibilidade, tanto inter-ensaio como intra-ensaio, obtida para o Teste ELISA com discos, se assemelha à obtida pelo Teste ELISA com placas e Radioimunoensaio, que é de 15%.

Os valores médios de absorvância lidos para soros não-reativos nos Testes ELISA com discos, foram consideravelmente maiores que os obtidos nos Testes ELISA com placas (Figuras 4.21 e 4.25), o que se atribui principalmente a problemas de lavagem dos discos, que deve ser mais eficiente e ao fato de que um maior espectro de componentes antigênicos presentes no extrato proteico que compõe o antígeno usado, pode se ligar à superfície da resina N-metilolacrilamida dos discos, do que à superfície plástica das placas.

Um melhor bloqueio dos sítios de ligação (por adsorção) inespecíficos da resina, bem como o uso de um componente antigênico mais purificado, como a glicoproteína GP - 25, que está sendo objeto de estudos no momento, no Instituto de Medicina Tropical da USP, devem ajudar a diminuir esta reação de fundo inespecífica.

Uma característica do teste imunoenzimático, em geral, é apresentar variações nas intensidades de coloração desenvolvida pela reação da solução cromógena com a enzima, quando amostras de um mesmo soro são ensaiadas em ocasiões diferentes, diminuindo a reprodutibilidade inter-ensaio do teste, como ocorreu com o Teste ELISA com discos.

Esta variação é devida principalmente, à qualidade da solução cromógena usada. Uma rigorosa padronização dessa solução, que normalmente apresenta componentes instáveis, como a água oxigenada, substrato da enzima peroxidase, em concentrações muito baixas, pode contribuir muito na otimização ao Teste ELISA com discos e testes imunoenzimáticos em geral.

Com relação a Reatividade Cruzada, ambos os tipos de

Teste ELISA, levaram à identificação de casos de Calazar como positivos em relação à Doença de Chagas, com maior incidência para o Teste ELISA com placas: de 20 casos testados, 16 foram dados como positivos. Para o Teste ELISA com discos, de 12 casos testados, 2 foram dados como positivos. Com certeza essa reatividade cruzada tenderá a desaparecer para ambos os testes, com o uso de um antígeno mais purificado, no caso da Doença de Chagas, da glicoproteína GP - 25.

Uma maior dispersão de resultados para soros positivos, foi observada para o Teste ELISA com discos (Figura 4.21), o que pode indicar um melhor poder de resolução para o teste, principalmente para soros de alta reatividade.

#### 4.10. Comparação do Teste ELISA com Discos, com Testes Sorológicos Clássicos

O painel de soros positivos e negativos em relação à Doença de Chagas, que foi analisado pelo Teste ELISA com discos, tinha sido previamente selecionado por testes sorológicos clássicos como a Hemaglutinação, a Imunofluorescência e a Fixação de Complemento.

Em termos qualitativos pode-se verificar uma concordância expressiva, dos resultados do Teste ELISA com discos, com estes testes sorológicos convencionais.

#### 4.11. Demonstração da Viabilidade da Determinação Quantitativa de Soros em Teste ELISA com Discos, utilizando-se apenas uma Diluição do Soro

A viabilidade de determinação quantitativa de soros

em Testes ELISA com discos, usando-se apenas uma diluição do soro em teste (ou seja, um só disco), foi demonstrada quando se estabeleceu curvas dose-resposta para 20 soros chagásicos de reatividade variada : alta, média e baixa e 10 soros não-chagásicos, todos previamente selecionados por Hemaglutinação e Imunofluorescência. Utilizou-se nos Testes ELISA para Doença de Chagas, discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ), com antígeno de Trypanosoma cruzi.

As curvas dose-resposta foram obtidas ensaiando-se para cada soro, diluições seriadas, duplicadas a cada vez, começando de 1/20 até 1/1280, lendo-se então a absorvância resultante e graficando-se cada diluição testada contra a absorvância lida, em papel log-log.

Observou-se que as curvas dose-resposta obtidas apresentaram o formato de retas, com inclinações muito semelhantes. Isto pode ser visto na Figura 4.26, que traz curvas dose-resposta para 3 destes soros ensaiados : 2 positivos e 1 negativo. Os coeficientes angulares das retas obtidas para os soros positivos foram de  $- 0,5046$  e  $- 0,4999$ , ou seja, muito próximos, para o intervalo de absorvâncias de 0,15 a 1,00.

O fato das curvas dose-resposta obtidas para inúmeros soros de reatividade variada, terem apresentado coeficientes angulares semelhantes, para um intervalo de absorvâncias determinado, indica a possibilidade de determinação quantitativa de um soro desconhecido, a partir de um ensaio feito a apenas uma diluição, através da correlação que será estabelecida a seguir.

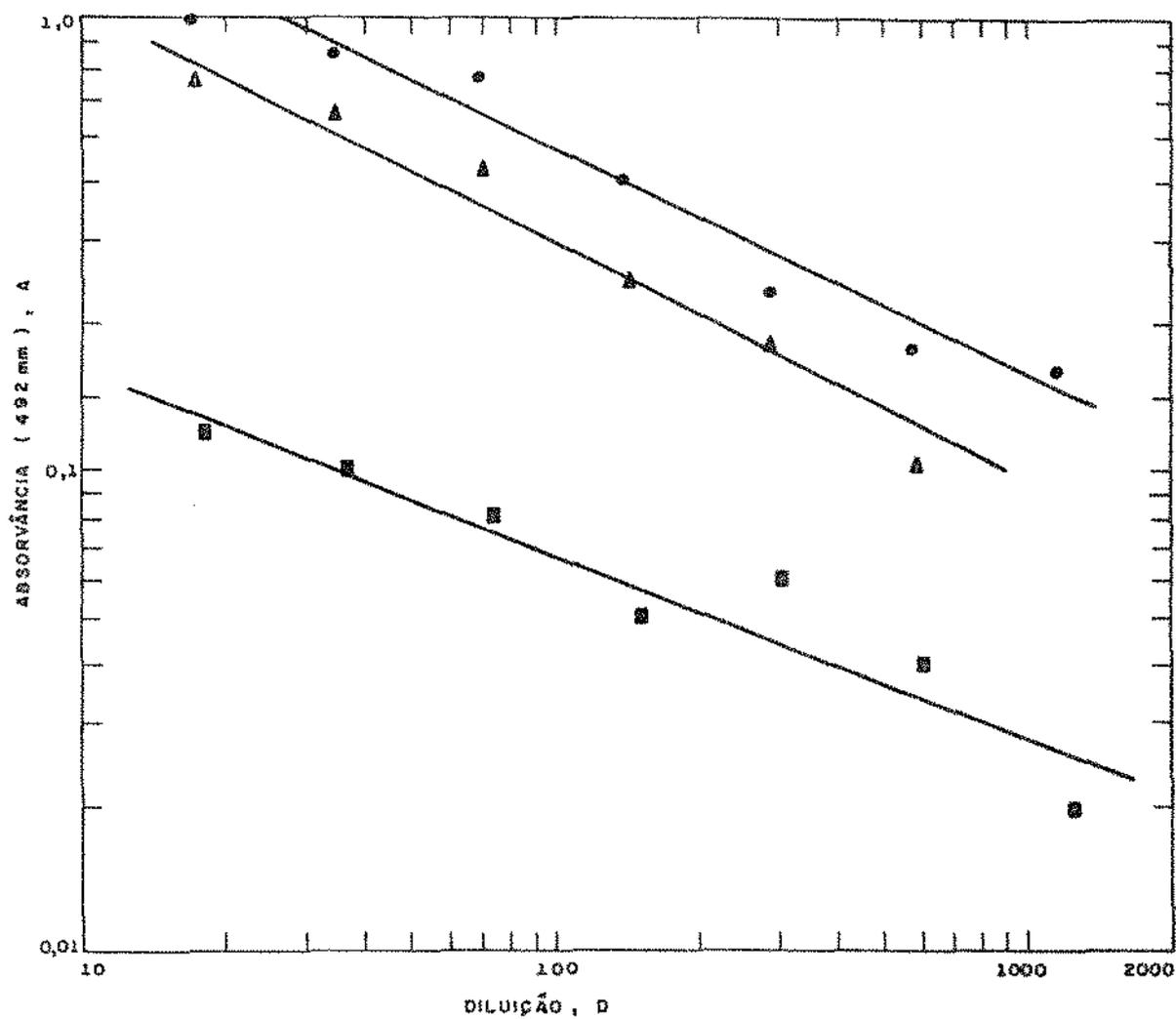


Figura 4.26 - Curvas dose-resposta para 2 soros chagásicos (●) e (▲), e 1 soro não-chagásicos (■), obtidas em Testes ELISA com discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ g NMA/m}^2$ ), sensibilizados com antígeno de Trypanosoma cruzi

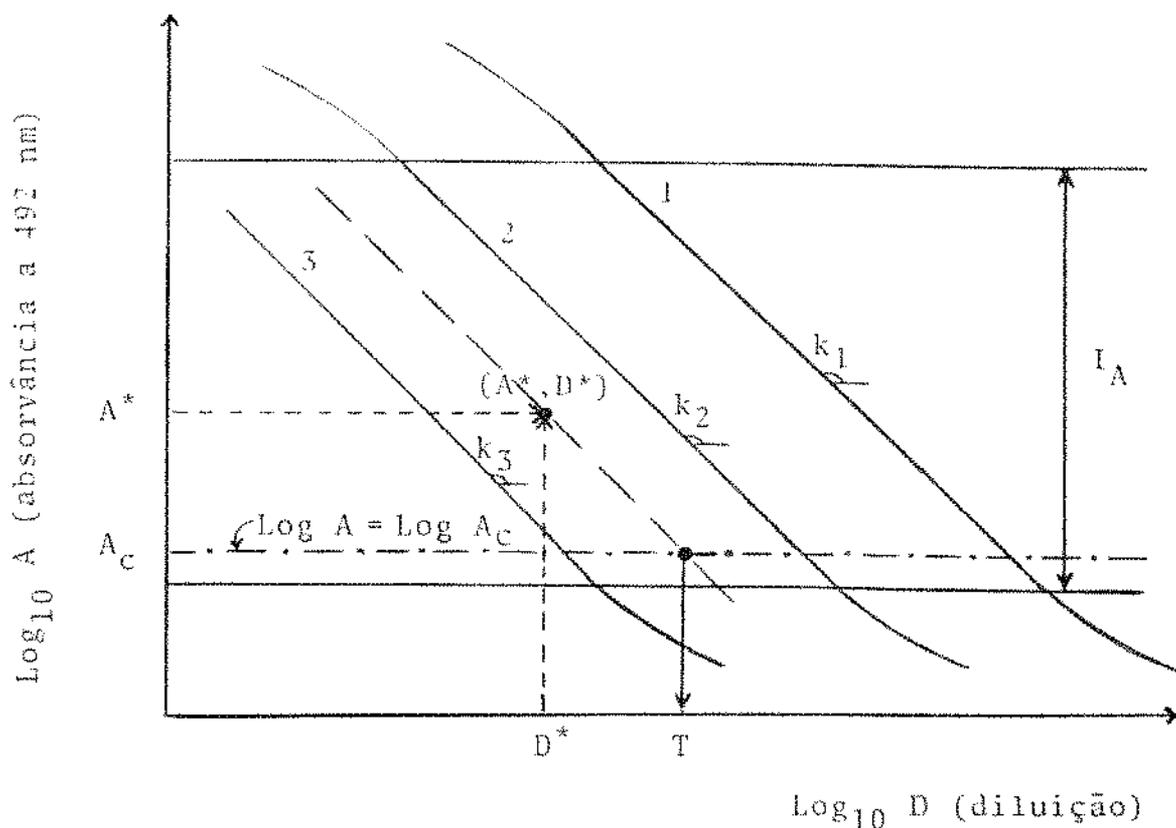


Figura 4.27 -Exemplo de Determinação do Título de um Soro Desconhecido a partir de uma Diluição apenas, pelo Teste ELISA com Discos.

Na Figura 4.27 estão apresentadas curvas dose-resposta para 3 soros positivos de intensidade variada : 1, 2 e 3 , que compõem parte de um painel de soros testado.

Para o Intervalo de Absorvância  $I_A$  , as curvas dose-resposta obtidas apresentaram o formato de retas em papel log-log, com coeficientes angulares  $k$  iguais ( $k = k_1 = k_2 = k_3$ ).

Estabelece-se então arbitrariamente a Absorvância de Corte ,  $A_C$  , como sendo a absorvância média obtida para um paí

nel de soros negativos, ensaiados na menor diluição usada para os soros positivos, mais 3 vezes o desvio-padrão. Traça-se, então, como na Figura 4.27, a reta  $\log A = \log A_C$ .

Tomando-se então uma amostra de um soro desconhecido, a uma diluição  $D^*$  qualquer, realiza-se o ensaio ELISA com disco, obtendo-se uma Absorvância  $A^*$ .

Obtem-se deste modo, um ponto da curva dose-resposta  $(D^*, A^*)$ , para esse soro desconhecido cujo título se deseja determinar.

Caso a absorvância lida  $A^*$ , tenha caído no Intervalo de Absorvâncias  $I_A$ , por este ponto  $(D^*, A^*)$  passará uma reta de coeficiente angular  $k$ , igual ao das retas 1, 2 e 3. Se a absorvância  $A^*$  estiver fora do intervalo  $I_A$ , o soro deverá ser mais diluído.

Conhecendo-se portanto um ponto desta reta,  $(D^*, A^*)$  e seu coeficiente angular  $k$ , ela está determinada.

A equação da reta generalizada é :

$$\log A = k \log D + B \quad (4.11)$$

onde  $B$  é o coeficiente linear, que pode ser determinado substituindo-se o ponto  $(D^*, A^*)$  na equação 4.11, obtendo-se :

$$B = \log \left( \frac{A^*}{(D^*)^k} \right) \quad (4.12)$$

Logo a reta dose-resposta para o soro desconhecido é:

$$\log A = k \log D + \log \left( \frac{A^*}{(D^*)^k} \right) \quad (4.13)$$

O título,  $T$ , deste soro desconhecido, é determinado co

mo sendo a Diluição  $D$  do soro a que se deve chegar, para se obter a Absorvância de Corte.

O Título  $T$  é obtido portanto, da intersecção da reta dose-resposta, que passa pelo ponto  $(D^*, A^*)$ , dada pela equação 4.13, com a reta da Absorvância de Corte :

$$\log A = \log A_C \quad (4.14)$$

Substituindo, a equação 4.14, na equação 4.13, obtém-se :

$$\log A_C = k \log T + \log \left( \frac{A^*}{(D^*)^k} \right) \quad (4.15)$$

a partir da qual, rearranjando-se, obtém-se :

$$T = D^* \cdot \left( \frac{A_C}{A^*} \right)^{1/k} \quad (4.16)$$

que é a expressão que se pode utilizar, para a determinação do título de um soro desconhecido,  $T$ , ensaiando-se apenas uma diluição  $D^*$ , em Teste ELISA com disco, desde que o valor de absorvância lido,  $A^*$ , caia no Intervalo de Absorvâncias  $I_A$ .

$T$  = título do soro em teste ;

$D^*$  = diluição do soro em teste ensaiada;

$A^*$  = absorvância lida para o soro em teste, na diluição ensaiada;

$k$  = coeficiente angular das retas dose-resposta, válido para o intervalo de absorvância  $I_A$ , determinado a partir de padronização prévia, com um painel de soros reativos;

$A_C$  = Absorvância de Corte, obtida a partir de padronização prévia de um painel de soros não-reativos.

$I_A$  = intervalo de absorvâncias lidas, para um painel de soros po  
sítivos, em que as curvas dose-resposta (Diluição X Absorv  
vância) devem ter o formato de retas, em papel log-log.

CAPÍTULO 5

Conclusões e Sugestões

### 5.1. Conclusões

O objetivo principal deste trabalho, que foi o desenvolvimento e caracterização preliminares, de um novo suporte para preparação de imunossorventes estáveis, com boa capacidade de ligação de proteínas e que permitissem a automação dos testes imunoenzimáticos do tipo ELISA em que seriam utilizados, foi atingido.

O Suporte-Resina estudado é composto por tecidos sintéticos, recobertos por resinas ou monômeros polimerizados, que apresentam grupos N-metilol capazes de reagir covalentemente com grupos funcionais característicos de proteínas, como grupos amino ou hidroxila.

O método de preparação do Suporte-Resina é simples e de fácil execução, sendo os materiais utilizados de fácil obtenção comercial e de baixo custo. O Suporte-Resina é utilizado no formato de discos de 8,3 mm de diâmetro, sendo que para cada m<sup>2</sup> de Suporte-Resina pode-se obter mais de 10000 discos, resultando numa alta produção.

Após a realização de vários testes, com diversas resinas e tecidos sintéticos, o Suporte-Resina escolhido como um dos mais promissores, foi o composto por malha de poliéster de gramatura de 292 g/m<sup>2</sup>, por possuir uma maior área superficial disponível (18,9 cm<sup>2</sup>/disco), revestido com N-metilolacrilamida (NMA), na concentração de 35 g de NMA/m<sup>2</sup> de Suporte-Resina, por ter apresentado melhores resultados em termos de capacidade de ligação de proteínas e de estabilidade.

Para este Suporte-Resina escolhido as condições prá

ticas para a reação de imobilização de proteínas nos discos, visando a ligação de quantidades suficientes de proteínas, foram determinadas como sendo: meio reacional tamponada (tampão fosfato 20mM) de pH 7,5 e tempo e temperatura de reação de 2 horas a 37°C, seguidas de 18 horas à temperatura de 4°C, sob suave agitação, para o estabelecimento de um melhor equilíbrio, embora após 2 horas a 37°C já se consiga ligar quantidades suficientes de proteína, para se obter determinações quantitativas em testes ELISA.

Os resultados obtidos dos experimentos realizados a respeito da influência da concentração de grupos Metilol, e da quantidade de resina depositada sobre o Suporte-Resina, na quantidade de proteína ligada, e de estimativas realizadas sobre a ordem de grandeza da densidade superficial de grupos Metilol na resina polimerizada, e da quantidade do anticorpo IgG que se poderia ligar por cm<sup>2</sup> de área superficial disponível do Suporte-Resina, sugerem que a imobilização da proteína se dá, em uma primeira camada, provavelmente através de ligação covalente com grupos N-metilol, presentes em excesso na superfície do retículo da resina.

Deve-se ressaltar que as estimativas realizadas para o número de grupos Metilol disponíveis à superfície do Suporte-Resina e para a área necessária para ligação de cada molécula de IgG estão por sua vez baseadas nas estimativas feitas das áreas superficiais das malhas de poliéster usadas, e na geometria e estrutura da molécula de IgG descritas na literatura<sup>2,3,4</sup>.

Experimentos realizados para obtenção de elementos

para a discussão da natureza da ligação, que ocorre entre a im  
noproteína IgG e o Suporte-Resina, sugerem que a ligação da im  
noproteína se dá, até o esgotamento da área superficial dispo-  
nível, através de ligação covalente com grupos N-metilol ou por  
adsorção química, podendo ocorrer a partir daí, para concentra-  
ções maiores de IgG na solução de sensibilização, a formação  
de multicamadas de IgG, immobilizadas sobre a primeira camada  
ligada quimicamente, através de ligações secundárias. Esta hi  
pótese é reforçada pelas quantidades de IgG que se conseguiu  
ligar por disco de Suporte-Resina com 35 g NMA/m<sup>2</sup>, de até  
174,4 µg IgG, muito superior à estimativa realizada de cerca de  
40 µg IgG/disco, para uma área de 1250 Å<sup>2</sup> por molécula de IgG.

O caráter de ligação química da proteína ao Su-  
porte-Resina, em uma primeira camada, foi reforçado pelos re  
sultados obtidos de experimentos realizados a respeito da esta-  
bilidade da ligação, que foi submetida à temperaturas de 37°C e  
56°C, durante períodos de estocagem de 8 meses e ao contato com  
soluções eluentes, sem ocorrer uma dissociação ou de  
sorção significativa.

O estudo de avaliação da capacidade de captação de  
IgG, em soluções a várias concentrações, realizado para im  
nosorventes preparados com discos de Suporte-Resina (35 g NMA/m<sup>2</sup>)  
com várias quantidades de Anti-IgG ligadas, mostrou que a uti-  
lização de discos como imunosorvente em Testes ELISA é per  
ffeitamente viável, pois as quantidades de pr  
oteína que ne  
le se consegue ligar de modo estável, são suficientes para de  
terminações quantitativas de antígenos ou anticorpos, nas con-  
centrações encontradas usualmente em soros.

Os resultados obtidos na avaliação do desempenho de discos de Suporte-Resina ( $35 \text{ NMA/m}^2$ ) com antígeno de Trypanosoma cruzi imobilizado, usados como imunosorvente em Testes ELISA para Doença de Chagas, mostraram que os discos proporcionaram características de sensibilidade, reprodutibilidade e especificidade ao Teste ELISA, muito semelhantes às obtidas para Testes ELISA com placas de poliestireno e outros testes sorológicos clássicos, como a Hemaglutinação ou Imunofluorescência, com a grande vantagem da estabilidade do imunosorvente, a longos períodos de estocagem.

Os problemas surgidos no Teste ELISA com discos para Doença de Chagas, foram reações cruzadas com anticorpos de Calazar, leituras de absorvância relativamente altas para soros negativos e variações diárias de absorvância para um mesmo sorro, que comprometem a sensibilidade e especificidade do teste.

Estes problemas são entretanto, em sua maior parte, decorrentes dos reagentes usados na rotina do teste e do processo de lavagem dos discos que precisa ser melhorado.

A utilização na sensibilização dos discos de um antígeno mais purificado, como a glicoproteína GP-25 obtida do Trypanosoma cruzi, que está sendo atualmente estudada no Instituto de Medicina Tropical, pode reduzir as reações cruzadas e as reações de fundo observadas para os soros negativos.

O uso de soluções cromógenas mais estáveis e de fácil padronização, além de conjugados enzimáticos rigorosamente padronizados, pode diminuir as variações diárias obtidas nos Testes ELISA, tanto com os discos como com placas de poliestireno, aumentando a reprodutibilidade do teste.

A automação do Teste ELISA com discos é facilitada pela viabilidade de se fazer uma análise quantitativa de anticorpos a partir de apenas uma diluição do soro em teste, como foi demonstrado para a Doença de Chagas e pela possibilidade de estocagem dos discos de imunosorvente.

O desenvolvimento desta nova tecnologia, até então não disponível no país, abre perspectivas para utilização do Teste ELISA com discos, em testes diagnósticos em larga escala para inúmeras doenças de interesse dos países em desenvolvimento e do Terceiro Mundo.

Este novo imunosorvente desenvolvido, pelo baixo custo do Suporte-Resina, não necessidade de processos químicos complexos para a imobilização da proteína, estabilidade do produto final, possibilidade de adaptação ao diagnóstico de várias doenças e possibilidade de automação que confere ao Teste ELISA, surge como uma alternativa à utilização preponderante de placas de poliestireno e pérolas de acrilamida sensibilizadas, como imunosorvente em Teste ELISA, que são na maioria das vezes importadas.

Este trabalho abre ainda interessantes perspectivas para outros estudos, incluindo a análise mais rigorosa dos possíveis mecanismos de ligação de proteínas, aos suportes sólidos desenvolvidos.

## 5.2. Sugestões

Para dar continuidade ao trabalho realizado e explorar novas possibilidades de uso para o Suporte-Resina desenvolvido, sugere-se a realização dos seguintes estudos:

- Utilização do Suporte-Resina desenvolvido sobre vários formatos: fibras e tecidos tratados, para imobilização de enzimas de interesse industrial e seu uso em reatores enzimáticos de leito fixo;
- Estudo mais aprofundado e sistemático sobre o mecanismo, natureza e condições da reação de imobilização de proteínas ao Suporte-Resina;
- Utilização das resinas N-metilolacrilamida e uréia-formaldeído polimerizadas e moídas a várias granulometrias, para imobilização de antígenos e anticorpos, com vista a seu uso como imunosorvente em colunas de purificação de antígenos e anticorpos (Colunas de Cromatografia de Afinidade);
- Padronização do Teste ELISA usando discos de Suporte-Resina com vários tipos de antígenos imobilizados, para determinações quantitativas de anticorpos de várias doenças: Doença de Chagas, Rubéola, Toxoplasmose, Herpes e outros, pela análise sistemática de extensos painéis de soros positivos e negativos, visando a determinação de intervalos de normalidade, reprodutibilidade, sensibilidade, especificidade e confiabilidade do teste;
- Estudo de microscopia eletrônica da estrutura da camada de resina sobre o suporte, para confirmação da ligação superficial da proteína ao Suporte-Resina;
- Estudo para o estabelecimento de um método analítico adequado para medida de grupos Metilol, em resina N-metilolacrilamida polimerizada;
- Estudo sobre a estabilidade da ligação de anticorpos ao Suporte-Resina;

- Desenvolvimento de "kits" comerciais automatizados para Testes ELISA com discos, aplicados a várias doenças.

Referências Bibliográficas

1. WISEMAN, A. & GOULD, B.J. Enzymes, Their Nature and Role. London, Hutchinson Educational, 1971.
2. BIER, O.G. et alii. Imunologia Básica e Aplicada. São Paulo, Editora Guanabara-Koogan S.A., 1982.
3. FERRI, R.G. et alii. Imunologia. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda, 1977, 317 p.
4. NEZLIN, R.S. Structure and Biosynthesis of Antibodies. New York, Plenum Publishing Corporation, 1977.
5. MOSS, A.J. et alii. Practical Radioimmunoassay. Saint Louis, The C.V. Mosby Company, 1976.
6. WIDE, L. & PORATH, J. Biochem. Biophys. Acta. 130: 257, 1966.
7. ENGVALL, E. & PERLMANN, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative assay of Immunoglobulin G. Immunochemistry, 8(9): 871, 1971.
8. VAN WEEMEN, B.K. & SCHUURS, A.W.M. Immunoassay using Antigen-Enzyme Conjugates. FEBS Letters, 10: 232, 1971.
9. ENGVALL, E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Chang, T.M.S., ed. Biomedical Application of Immobilized Enzymes and Proteins, vol. 2, New York, Plenum Press, 1977.
10. PRESSMAN, D. & EISEN, H.N. J. Immunol. 64: 273, 1950.
11. BERSON, S.A. & YALOW, R.S. Adv. Biol. Med. Phys. 6: 349, 1958.
12. CARLSSON, H.E. et alii. Infect. Immunity. 6: 703, 1972.

13. CARLSSON, H.E. et alii. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 48: 485, 1975.
14. LJUNGSTROM, I. et alii. Parasitology. 69: 24, 1974.
15. RUITENBERG, E.J. et alii. J. Bull. World Health Organ. 51: 108, 1974.
16. VOLLER, A. & ENGVALL, E. Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to Parasitic Diseases. In: Chang, T.M.S., ed. Biomedical Application of Immobilized Enzymes and Proteins. vol. 2, New York, Plenum Press, 1977.
17. CAMARGO, M.E. et alii. A practical Immunoenzymatic Test for Routine Serologic Diagnosis of Chagas' Disease. Abstracts. Congresso Internacional de Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Brasil, p. 218, 1979.
18. ————. Immunoglobulin G and Immunoglobulin M Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Defined Toxoplasmosis Serological Patterns. Infect. Immun. 21: 55, 1978.
19. GUIMARÃES, M.C.S. et alii. Rev. Med. Trop. de São Paulo. 25: 108, 1983.
20. VOLLER, A & BIDWELL, D.E. A Simple Method for Detecting Antibodies to Rubella. Brit. J. Exp. Pathol. 56: 338, 1975.
21. VOLLER, A. et alii. Microplate Enzyme-Linked Immunosorbent Assays in Virology. In: Chang, T.M.S. ed. Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins. New York, Plenum Press, 1977.
22. NAKANE, P.K. & PIERCE, G.B. J. Histochem. Cytochem. 14: 929, 1966.

23. AVRAMEAS, S. & URIEL, J. C.R. Acad. Sci. [D] (Paris).  
266: 2543, 1966.
24. MILES, L.E.M. & HILES, C.N. Nature. 219: 186, 1968.
25. NAKANE, P.K. New Development in Tissue Enzyme-Labelled Immunoassays. In: Clinical Laboratory Techniques for the 1980's. New York, Alan R. Liss. Inc, 1980.
26. AVRAMEAS, S. Bull. Soc. Chem. Biol. 50: 1169, 1968.
27. AVRAMEAS, S. & LESPINATS, G. C.R. Acad. Sci. [D] (Paris).  
265: 1148, 1967.
28. NAKANE, P.K. & KAWAOI, A. Peroxidase-Labelled Antibody. A New Method of Conjugation. J. Histochem. Cytochem.  
22: 1084, 1974.
29. ENGVALL, E. et alii. Biochem. Biophys. Acta. 251: 427, 1971.
30. ENGVALL, E. & PERLMANN, P. J. of Immunol. 109: 129, 1971.
31. KATO, K. et alii. Use of Rabbit Antibody IgG-loaded Silicone Pieces for the Sandwich Enzymeimmunoassay of Macromolecular Antigens. J. Biochem. 81: 155, 1977.
32. MARCIPAR, A. et alii. Polyamide-Linked Immunoabsorbents for Diagnostics: Trypanosoma cruzi as a Model System. IRCS Medical Science. 7: 178, 1979.
33. HENDRY, R.M. & HERMANN, J.E. Immobilization of Antibodies on Nylon for Use in Enzyme-Linked Immunoassay. J. Immunol. Meth. 35: 285, 1980.
34. Boletim Informativo da ABBOTT Laboratories - Diagnostic

- Division (USA). Rubazyme M - Enzyme Immunoassay for IgM Antibody to Rubella Virus. Dec. 1981.
35. Boletim Informativo da ABBOTT Laboratories - Diagnostic Division (USA) Rubazyme - Enzyme Immunoassay for IgG Antibody to Rubella Virus. Feb. 1982.
36. PERES, L. et alii. Desenvolvimento de Processo para Ligação Covalente de Imunoproteínas à Superfícies Poliméricas, para Utilização em Testes Sorológicos. Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Campinas, julho de 1984, p. 632.
37. MOSBACH, K. Enzymes Bound to Artificial Matrixes. Scientific American. 224: 26, 1971.
38. CARVALHO, M.B. Imunoabsorventes. Monografia apresentada, para obtenção de título de graduação em Ciências Biomédicas, na Faculdade de Santo Amaro, São Paulo, 1981.
39. AVRAMEAS, S. & GUILBERT, B. Biologically Active Water-insoluble Protein Polymers. Their Use for the Isolation of Specifically Interacting Proteins. Biochemie. 53: 603, 1971.
40. SRERE, P.A. & UYEDA, K. Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrixes. In: Mosbach, K. Methods in Enzymology, vol. 44, 1976.
41. CAMPBELL, D.H. et alii. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA). 37: 575, 1971.
42. GURVICH, A.E. et alii. Biokhimiya (Trad. em inglês). 26: 803, 1961.

43. SUTHERLAND, G.B. & CAMPBELL, D.H. J. Immunol. 80: 294, 1958.
44. JANGERDORFF, A.T. et alii. Biochim. Biophys. Acta. 78: 516, 1963.
45. WEETALL, H.H. & WEKELY, N. Biochim. Biophys. Acta. 107: 150, 1965.
46. AXÉN, R. et alii. Chemical Coupling of Peptides by Means of Cyanogen Halides. Nature. 214: 1302, 1967.
47. PORATH, J. et alii. Chemical coupling of proteins to agarose. Nature. 215: 1491, 1967.
48. WEKELY, N. et alii. Immunochemistry. 1: 219, 1964.
49. CUATRECASAS, P. J. Biol. Chem. 245: 3059, 1970.
50. CARPENTER, R.R. & REESBERG, M.A. J. Immunol. 100: 873, 1968.
51. VOLLER, A. et alii. Bull. World Health Organ. 51: 209, 1974.
52. TERNICK, T. & AVRAMEAS, S. Polyacrilamide Protein Immunosorbents Prepared with Glutaraldehyde. FEBS Letters. 23 (1): 24, 1972.
53. WILSON, B. & NAKANE, P.K. J. Immunol. Methods. 12: 171, 1976.
54. HORNBY, W.E. & GOLDSTEIN, L. Immobilization of Enzymes on Nylon. Methods of Enzymology. 44: 118, 1976.
55. HORNBY, W.E. & FILIPPUSON, H. Biochem. Biophys. Acta. 220: 343, 1970.

56. HORVATH, C. & SOLOMON, B.A. Biotechnol. Bioeng. 14: 885, 1972.
57. SUNDARAN, P.V. & HORNBY, W.E. Biochem. J. 147: 593, 1975.
58. MORRIS, D.L. et alii. Biochem. J. 147: 593, 1975.
59. HORNBY, W.E. et alii. FEBS Letters. 23: 114, 1972.
60. ATASSI, M.Z. Chemical Modification and Cleavage of Proteins and Chemical Strategy in Immunochemical Studies of Proteins. In: Atassi, M.Z. ed. Immunochemistry of Proteins. vol. 1, New York. Plenum Press, 1977.
61. MARK, H. et alii. Chemical After-treatment of Textiles. New York, Wiley Interscience, 1971.
62. SANDLER, S.R. & KARO, W. Polymer Synthesis. Organic Chemistry. A Series of Monographs, vol. 29-II. New York, Academic Press, 1977.
63. BILLMEYER, Jr., F.W. Textbook of Polymer Science. New York, John Wiley & Sons, 1970, 598 p.
64. DE JONG, J.I. & DE JONGE, J. Rec. Trav. Chim. 71: 890, 1952.
65. SMYTHE, L.E. J. Phys. Colloid. Chem. 51: 369, 1947.
66. ————. J. Am. Chem. Soc. 73: 2735, 1951.
67. PETERSEN, H. Textile Research Journal. 38 (2): 156, 1968.
68. Associazione Italiana Industriali Stampatori, Tintori Finitori Tessili. Il Controllo della Formaldeide nei trattamenti de Nobilitazione con Resine N-metiloliche. Le Misure di Sicurezza ed un Nuovo Metodo di Analise.

- I Quaderni, numero 31, Gennaio, 1982.
69. Boletim Informativo. Cyanamid, Industrial Chemicals Division. Wayne, New Jersey. Bulk Handling and Storage. N-methylol-Acrylamide (48% Aqueous Solution).
70. MEHTA, R.D. Textile Chemist and Colorist. 14 (10): 206, 1982.
71. FERREIRA, A.W.; BITTENCOURT, E. & CAMARGO, M.E. Processo de Produção de Reagentes para Testes Sorológicos e Produtos Obtidos Prêmio Governador do Estado de São Paulo. XI Concurso Nacional do Invento Brasileiro. DECET. Novembro, 1983.
72. MANO, E.B. Introdução a Polímeros. São Paulo, Editora Edgard Blücher Ltda., 1985 .111 p.
73. MORATH, J.C. & WOODS, J.T. Analysis of Amino-Formaldehyde Resins. Anal. Chem. 30 (8): 1437, 1958.
74. PERRY, R.S. et alii. Textile Chemist and Colorist. 13 (12): 311, 1981.
75. REID, J.D. et alii. American Dyestuff Reporter. 59 (6): 26, 1976.
76. BRICKER, C.E. & JOHNSON, H.R. Ind. Chem. Anal. Ed. 17: 400, 1945.
77. URBANSKI, J. et alii. Handbook of Analysis of Synthetic Polymer and Plastics. New York, John Wiley & Sons, 1977.
78. DE JONG, J.I. & DE JONGE, J. Rec. Trav. Chim. 71: 643, 1952.

79. WALKER, J.F. Formaldehyde. New York, Reinhold, 1953.
80. DE JONG, J.I. Rec. Trav. Chim. 72: 653, 1953.
81. BILLE, H. & PETERSEN, H. Melliand Textilberichte. 57: 155, 1976.
82. ANDREWS, B.A.K. et alii. Limitations of Cold Sodium Sulfite. Titration Methods for Free Formaldehyde in Textiles. Textile Research Journal. 53 (11): 688, 1983.
83. American Association of Textile Chemists and Colorists. AATCC - Technical Manual. Research Triangle Park, N.C. (Method 122-1978), 1978.
84. VAIL, S.L. & RHEINHARDT, R.M. What do Formaldehyde Tests Measure? Textile Chemist and Colorist. 13 (6): 131, 1981.
85. ANDREWS, B.A.K. & HARPER, R.J. Formaldehyde Release. Are Current Test Methods Realistic? Textile Research Journal. 50 (3): 177, 1980.
86. REGOECZI, E. Iodine-Labelled Plasma Proteins. CRC Press, vol. 1, 1984.
87. PARKER, C.W. Radioimmunoassay of Biologically Active Compounds. New Jersey, Prentice-Hall, 1976.
88. PERES, B.A. Fracionamento de extrato solúvel de Trypanosoma cruzi. Avaliação da Atividade Imunológica das Frações. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Médicas da USP. São Paulo, Brasil, 1977.
89. Notas de Aula da Disciplina Catálise Heterogênea, ministrada no Curso de Mestrado em Engenharia Química do Departa-

mento de Engenharia Química - UNICAMP, pelo Prof. Dr. Mário de Jesus Mendes.

90. Manual de Operação do Medidor de Área Superficial, fornecido pela C.G. Instrumentos Científicos Ltda., Modelo C.G. 2000.
91. PERRY, R.H. & CHILTON, C.H. Chemical Engineering Handbook Tokyo, McGraw Hill Kogakusha Ltd, 1973.
92. DILLMAN, W.J. & MILLER, I.F. J. Colloid. Sci. 44: 221, 1973.
93. KEMP, L. & RIDEAL, E.K. Proc. Roy. Soc. London. A 147: 1, 1934.
94. KIM, S.W. & LEE, R.G. Adsorption of Blood Proteins onto Polymer Surfaces. In: Baier, R.E. Applied Chemistry at Protein Interfaces, Advances in Chemistry Series, 145. American Chemical Society, 1975.
95. MORTON, W.E. & HEARLE, J.W. Physical Properties of Textile Fibres. London, Heineman Ltd, 2<sup>nd</sup> Edition, 1975. 660 p.
96. LOWRY, O.H. et alii. Protein Measurement with the Folin-phenol Reagent. J. Biol. Chem. 193: 265, 1951.
97. BIRD, C.L. & BOSTON, W.S. The Theory of Coloration of Textiles. London, Dyers Company Publications Trust, 1975.
98. SCHECHTER, M. et alii. Purified Trypanosoma cruzi Specific Glycoprotein for Discriminative Serological Diagnosis of South American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). Lancet, 2: 939, 1983.

99. SCHARFSTEIN, J. et alii. Trypanosoma cruzi: Description of a Highly Purified Surface Antigen Defined by Human Antibodies. J. Immunol. 131: 972, 1983.
100. CAMARGO, M.E. et alii. Trypanosoma cruzi. In: Methods of Enzymatic Analysis, H.U. Bergmayer, Wernheim, V.C.H. Germany (em publicação).
101. MICHAEL, M. et alii. N-Methylolacrylamide-coated Polyester Disks as Solid-phase Carriers in a Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Antibodies to Trypanosoma cruzi. Trabalho apresentado na Reunião sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambú, novembro de 1985.
102. MORITA, T. & ASSUMPTÃO, R.M.V. Manual de Soluções Reagentes & Solventes. São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 1972, 627 p.
103. BITTENCOURT, E., GUIMARÃES, M., CAMARGO, M.E., FERREIRA, A.W. e MAKINO, M.M. Immunoassays Conducted with Resin Treated Nylon Fabrics. J. of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 21: 717, 1983.
104. CAMARGO, M.E. et alii. Utilização de Resinas sobre Suportes Inertes, para Fixação Covalente de Componentes Antigênicos ou Anticorpos, como Fase Sólida em Testes Sorológicos. Anais da II Jornada Científica do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo, pag. 21. Novembro de 1983.