



Fabricação de sensores microfluídicos em substrato de papel para a detecção colorimétrica simultânea de espécies relevantes clinicamente

Palavras-Chave: Dispositivos analíticos em papel, sensores colorimétricos, análises clínicas.

Autores/as:

Laura de Castro Motta [IQ - UNICAMP]

Prof. Dr. William Reis de Araújo [IQ - UNICAMP]

1. Introdução

Nas últimas duas décadas, o papel tem atraído interesse por seu potencial para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos de análise, comumente conhecidos na literatura como *microfluidic paper-based analytical devices* (μ PADs)¹. As vantagens de seu uso como plataforma para análises qualitativas e quantitativas são: abundância, baixo custo, fácil obtenção e manuseio, portabilidade, compatibilidade com produções em larga escala, fácil modificação física e química para bioensaios, fácil descarte por incineração tornando-se mais ambientalmente correto, utilização de volumes reduzidos de amostras (micro a nanolitros), coloração branca (adequada para testes colorimétricos), dentre outras².

Os dispositivos analíticos colorimétricos tornam-se atraentes para uso em áreas remotas, ou de baixa infraestrutura laboratorial, em que há baixa disponibilidade de profissionais experientes para aquisição do resultado analítico. Como solução, uma fotografia do teste feita por câmera de telefone celular poderia ser enviada a uma central, onde há pessoal treinado e que obteriam o resultado analítico com auxílio de um computador. Então, este seria enviado de volta por mensagem de texto, alertando sobre a presença, ou não, de determinado composto e/ou sua quantidade em uma amostra³.

A fabricação dos sensores em papel envolve a delimitação dos *spots* hidrofílicos, constituídos apenas pelo material celulósico do papel e uma região hidrofóbica ao redor desses spots. Outra possibilidade é a delimitação física pelo recorte do layout desejado. Para a delimitação com barreira hidrofóbica, utiliza-se a deposição física de polidimetilsiloxano (PDMS), poliestireno ou cera (técnica mais utilizada chamada de *wax printing* utilizando uma impressora com cartuchos de cera¹).

Sensores que possibilitem análises pelo próprio indivíduo permitem antecipar problemas maiores no quadro clínico e o contínuo monitoramento da eficácia dos tratamentos. Dentre os biomarcadores relevantes clinicamente, destacam-se nesse trabalho: glicose, nitrito e creatinina. A primeira

apresenta, em indivíduos saudáveis, uma faixa de concentração entre 4 a 5,5 mmol/L no sangue. Valores fora desta faixa tendem a provocar hipoglicemia ou hiperglicemia. Já a análise de nitrito (NO_2^-) desempenha um papel fundamental no diagnóstico de diferentes doenças de acordo com o fluido biológico. Na saliva, os níveis de concentração de nitrito podem estar associados à periodontite, causada por bactérias anaeróbias e nitrificantes ou à oxidação do óxido nítrico (NO) por enzimas NO sintases em resposta a infecções bacterianas. Também apresenta resultados qualitativos para o diagnóstico de infecções urinárias em concentrações superiores a 16 $\mu\text{mol/L}$ ^{5,6}.

Por fim, a creatinina é o produto de degradação da creatina fosfato nos músculos. A creatinina sérica, importante indicador da saúde renal, é um subproduto facilmente medido do metabolismo muscular e é excretada inalterada pelos rins. Os valores de referência estão na faixa de 53-115 $\mu\text{mol/L}$ em urina.

Em vista da relevância clínica destas espécies, desenvolvemos, até o momento, sensores colorimétricos em papel para a detecção de glicose, creatinina e nitrito como potenciais métodos portáteis e de baixo custo visando diagnósticos clínicos em biofluidos.

2. Metodologia:

2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico; das seguintes empresas: Synth®; Sigma-Aldrich®; NEON Reagentes Analíticos® e Quimis®. Os kits de testes enzimáticos foram obtidos da Vida Biotecnologia®. Foi utilizado papel de filtro qualitativo para a realização dos ensaios colorimétricos.

2.2 Confeção dos dispositivos

Os dispositivos foram fabricados utilizando uma cortadora a laser (Router Laser, Multivisi 50W). Folhas de papel filtro foram vedadas de um dos lados com fita adesiva e depois foram cortados *spots* de 1 cm de diâmetro. Em seguida, sobre uma grade desenhada em folha sulfite, com fita dupla face foram fixados 24 *spots* (3x8), permitindo a realização de oito ensaios em triplicata. Deste modo, a região hidrofílica do dispositivo é delimitada fisicamente pelo seu próprio tamanho.

3.3 Os testes colorimétricos

A detecção colorimétrica de nitrito foi feita pelo método de Griess, que forma um azo-composto de cor rosa^{4,6,7}. Em cada *spot* foram adicionados 10 μL de cada uma das seguintes

soluções na respectiva ordem: ácido clorídrico (1,2 mol/L); sulfanilamida (0,05 mol/L); dicloridrato de N-Naftil etilenodiamina (NFT; 0,01 mol/L). Em seguida, foram feitas adições de 10 µL de solução de nitrito diluída de 25 a 200 µmol/L para construção da curva analítica. Por último, foram obtidas fotos do dispositivo após 5, 15 e 30 minutos da adição de nitrito.

A detecção de glicose foi feita utilizando um teste enzimático baseado na enzima Glicose Oxidase (GOx) na presença de oxigênio. Então o peróxido de hidrogênio formado pela ação da GOx, na presença de peroxidase, forma um composto chamado quinoneimina de cor rosada pela reação com o fenol e 4-aminoantipirina. Os reagentes utilizados para este teste consistiram em: tampão fosfato (100 mmol/L; pH = 7,5); 4-aminoantipirina (0,3 mmol/L); fenol (10 mmol/L); peroxidase (1,5 KU/L) e GOX (15 KU/L). Pingou-se 30 µL desta mistura de reagentes, esperou-se 30 minutos e depois adicionou-se 6 µL de diluições de glicose de 1-7 mM. As imagens foram adquiridas depois de 10, 20 e 30 minutos da última adição.

O teste para a creatinina foi desenvolvido a partir da reação de Jaffé (picrato em meio fortemente alcalino). Foi feita a adição de 10 µL de solução de ácido pícrico (10 mmol/L), depois 10 µL de solução de NaOH (1 mol/L) e por último 10 µL de diluições de creatinina (25-175 µM). Foram adquiridas imagens com a câmera do celular após 5, 10 e 20 minutos da adição do analito.

Além dos testes específicos descritos, também foram feitos testes para avaliar a interferência de outros compostos presentes em saliva e urina humana, tais como: ácido láctico, uréia, ácido úrico e ácido ascórbico, além dos três analitos em questão. Sendo assim, foram feitos novos dispositivos e para o estudo de cada metabólito, foram adicionados os mesmos reagentes dos testes específicos. Adicionou-se 10 µL de cada possível interferente na concentração de 5 mmol/L para os estudos de seletividade do nitrito e da creatinina e 6 µL de cada interferente na concentração de 2,5 mmol/L para os testes de glicose. As imagens foram obtidas no mesmo intervalo de tempos referentes aos testes específicos.

3.4 Análises Colorimétricas

Os resultados colorimétricos dos *spots* foram extraídos com auxílio do software GNU Image Manipulation Program (GIMP®). Foram feitas fotos dos dispositivos utilizando uma câmera de celular com distância focal e luminosidade controlados por uma caixa de papelão de dimensões 32x20,5x8,5 cm, em que foi colocada iluminação por LEDs em suas laterais. Também foi feito um furo na tampa para encaixe da câmera do celular. Estas imagens podem ser adicionadas ao GIMP e o programa mostra a porcentagem de coloração em cada um dos *spots*. Para todos os testes

realizados foram obtidos dados RGB (inglês para: vermelho, verde e azul) e CMYK (inglês para: ciano, magenta, amarelo e preto). O padrão de cor que apresentou melhor correlação para os testes realizados foi o magenta e portanto, todas as curvas de calibrações foram plotadas em função deste parâmetro, utilizando o software OriginLab.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Começando pelo nitrito, a imagem obtida 15 minutos após a aplicação do analito (Figura 1a) foi a que apresentou melhor sensibilidade e com comportamento linear de resposta na faixa de 0 a 175 $\mu\text{mol/L}$ e coeficiente de determinação ($R^2 = 0,98$). Apesar de a menor concentração estudada ter sido 25 $\mu\text{mol/L}$, os resultados obtidos pelo sensor ainda são de relevância clínica. Em relação aos testes de interferência, todos os principais metabólitos analisados não apresentaram interferência significativa no teste, uma vez que de forma geral, apresentaram supressão de cor do resultado analítico, porém em porcentagens pequenas (de -0,8% a -1,8%) e não houve falsos positivos.

Em seguida, apesar de o teste para creatinina apresentar coloração amarelo-alaranjada, quando analisamos os padrões de cores, o magenta foi o que apresentou melhor correlação linear na faixa de concentração relevante clinicamente (Figura 1b). Foi possível verificar uma resposta linear na faixa de 0 a 175 $\mu\text{mol/L}$ de creatinina com $R^2 = 0,97$ na imagem registrada após 10 minutos da aplicação dos padrões analíticos. Em relação aos testes de interferência, assim como observado no teste de nitrito, todos os outros metabólitos não proporcionaram falsos positivos, porém houve a supressão de cor do resultado analítico de até 10%, exceto o nitrito que proporcionou a redução da intensidade de magenta em 12,6%.

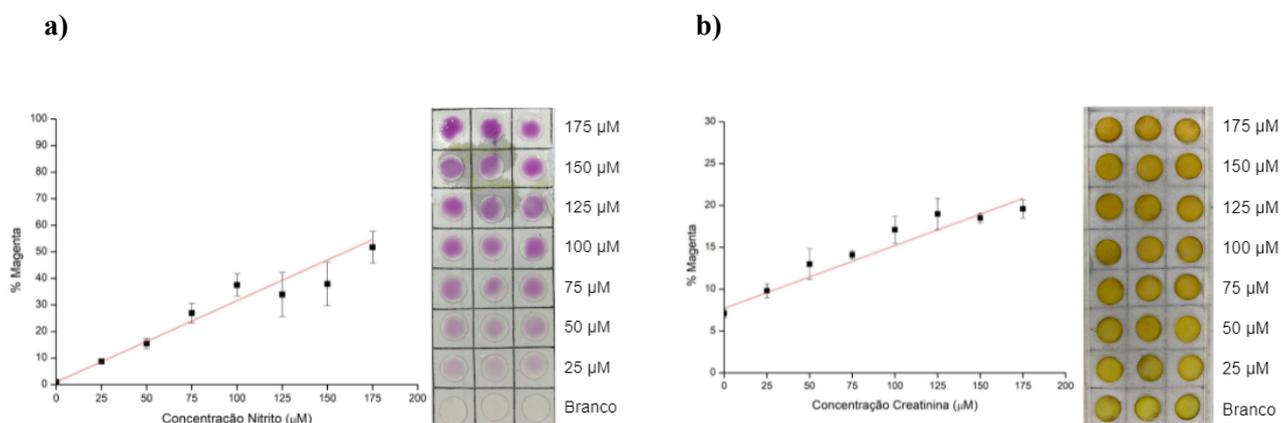


Figura 1: a) Imagem digital do teste colorimétrico para o nitrito e sua respectiva curva analítica ($y = 0,306x + 0,921$). **b)** Imagem digital do teste para a creatinina e sua respectiva curva analítica ($y = 0,0751x + 7,69$).

Por último, o teste da glicose (Figura 2) apresentou uma correlação linear com o aumento da concentração de glicose até 4 mmol/L e então apresentou um perfil de saturação de cor. A imagem que apresentou melhor sensibilidade e coeficiente de determinação na faixa linear ($R^2 = 0,98$) foi aquela registrada após 10 minutos da aplicação de glicose. A faixa de concentrações analisada é compatível com os níveis de glicose em fluidos biológicos e portanto apresenta relevância clínica. Em relação aos testes de

interferência, o resultado colorimétrico da glicose foi altamente afetado pelos outros metabólitos em supressões de 48,7% para o nitrito até 85,5% para o ácido láctico e estamos fazendo testes adicionais visando melhorar a seletividade deste bioensaio

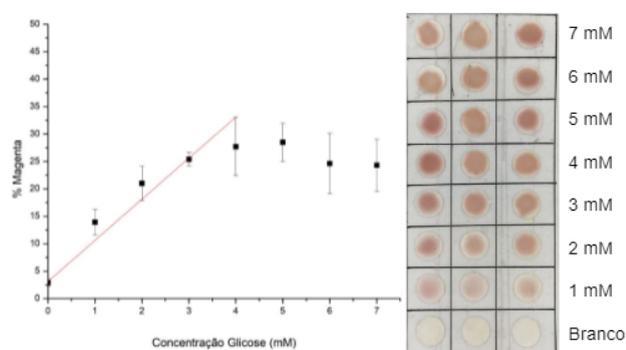


Figura 2: Imagem digital do teste colorimétrico enzimático para a glicose e sua respectiva curva analítica ($y = 7,49x + 3,13$).

CONCLUSÕES:

Foi possível realizar, até o momento, estudos de detecção e quantificação para três importantes biomarcadores do *status* de saúde humana (glicose, creatinina e nitrito) na faixa de concentrações relevantes clinicamente utilizando reações colorimétricas em *spots* de papel de filtro e câmera de celular como detector portátil e acessível. Os métodos colorimétricos demonstraram uma boa seletividade em relação aos principais metabólitos encontrados em biofluidos humanos. Estudos futuros visarão realizar os ensaios em amostras reais para quantificação e comparação dos resultados obtidos por técnicas analíticas instrumentais.

BIBLIOGRAFIA

- [1] OZER, Tugba; MCMAHON, Catherine; HENRY, Charles S. Advances in paper-based analytical devices. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 13, p. 85-109, 2020.
- [2] LIANA, Devi D. et al. Recent advances in paper-based sensors. *sensors*, v. 12, n. 9, p. 11505-11526, 2012.
- [3] MARTINEZ, Andres W. et al. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. *Analytical chemistry*, v. 80, n. 10, p. 3699-3707, 2008.
- [4] GARCIA, Paulo de Tarso et al. Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos de papel com superfície quimicamente modificada para ensaios clínicos utilizando detecção colorimétrica. 2014.
- [5] VIEIRA, Andreia Espíndola et al. Níveis de nitrito na saliva e no fluido peri-implantar em humanos. 2008.
- [6] WANG, Hg. *Comprehensive Organic Name Reactions*. Wiley, 2010.
- [7] CARDOSO, Thiago MG; GARCIA, Paulo T.; COLTRO, Wendell KT. Colorimetric determination of nitrite in clinical, food and environmental samples using microfluidic devices stamped in paper platforms. *Analytical Methods*, v. 7, n. 17, p. 7311-7317, 2015.