



“DETECÇÃO DE BIOMARCADORES DE DOENÇAS RENAIIS CRÔNICAS USANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN INTENSIFICADA POR SUPERFÍCIE”.

Palavras-Chave: DIAGNÓSTICO PRECOCE, SERS, FLUIDOS BIOLÓGICOS

AUTORES(AS):

THAIS CAROLINE DOS SANTOS, IQ – UNICAMP

BILLY DANIEL CHINCHIN, IQ – UNICAMP

PROF^(a). DR^(a). JAVIER ERICK LOBATÓN VILLA (ORIENTADOR(A)), IQ – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

A doenças renais crônicas (DRC) consiste na lesão renal e perda progressiva e irreversível da capacidade dos rins filtrarem resíduos metabólicos do sangue. Atualmente a falência de função renal é considerada um problema de saúde pública mundial com taxas crescentes de acometimento da população e, segundo a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), no Brasil a mais de 140 mil pacientes com DRC em estágio avançado. Esta prevalência do aumento nos casos de pacientes com DRC é decorrente da baixa eficiência no diagnóstico da doença, uma vez que sua manifestação clínica ocorre predominantemente com mais de 50% a 75% da função renal comprometida. Desta forma, o desenvolvimento de um diagnóstico precoce, eficiente e não invasivo se tornou pertinente e de extrema importância, sendo a busca por novos biomarcadores de DRC um dos principais alvos de pesquisa.

Neste contexto, a espectroscopia Raman intensificada por superfície (do inglês Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS) surge como uma alternativa interessante para detecção de biomarcadores devido à sua alta sensibilidade e rica informação química. SERS é uma técnica analítica que possibilita o ampliamto do sinal Raman no espalhamento inelástico através da interação eletromagnética e molecular de um analito sobre uma superfície metálica nanoestruturada e rugosa. Assim, o SERS se torna uma ferramenta altamente sensível para a detecção, quantificação e identificação de pequenas quantidades de moléculas. Diante deste fato, este estudo visa a análise de espectros SERS na identificação e detecção de biomarcadores em fluídos biológicos, como a urina, utilizando um equipamento Raman portátil para demonstrar a capacidade de realizar medições in-situ e futuramente permitir um diagnóstico precoce de doenças renais crônicas.

2. METODOLOGIA

2.1. ANÁLISE DA URINA SINTÉTICA

Inicialmente foram retirados espectros Raman do ácido úrico, creatinina e ureia, compostos orgânicos presentes na urina sintética, com a condição experimental de 1 exposição com 10 segundos de acumulação e 100% da capacidade do laser a partir de um espectrômetro Raman portátil modelo BWS465-785S iRaman Plus (B&W Tek) com resolução de $4,8 \text{ cm}^{-1}$, equipado a um laser na região do infravermelho com detecção de 785 nm, equivalente a 400 mW.

Após este procedimento, foram preparadas amostras de 2 mL dos compostos orgânicos correspondentes a composição química da urina sintética, apresentados da **Tabela 1**, em meio ácido (com a adição 10 μ L de 1,1 mol/L HCl), básico (com a adição 10 μ L de 1 mol/L NaOH) e neutro para serem depositados sobre papel com padrão de

impressão de círculos de 3 mm de diâmetro recoberto por nanopartículas de ouro com $\sim 51,5$ nm e $\sim 1,9 \times 10^{11}$ NPs/mL. Disto, espectros SERS foram retirados com condição experimental de 4 exposições com 50 segundos de acumulação e 10% da capacidade do laser a partir do mesmo espectrômetro Raman portátil utilizado no procedimento anterior.

| Composição química da urina sintética | | | | | |
|---------------------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|--|
| Composição | Concentração | Concentração média (g/L) | Preparação de 2 mL | | |
| | | | Diluição I | Diluição II | |
| Ureia | 22,5 g/1,4L | 16,0714 | 0,0322 g em 2 mL de água | - | |
| Ácido Úrico | <0,750 g/1,4L | 0,5357 | 0,0106 g em 2 mL de água | 0,2 mL de (I) em 1,8 mL de água | |
| Creatinina | Homens: 1,9455 g/1,4L | 1,3896 | 0,0278 g em 2 mL de água | 0,2 mL de (I) em 1,8 mL de água | |
| | Mulheres: 1,145 g/1,4L | 0,8178 | 0,0164 g em 2 mL de água | 0,2 mL de (I) em 1,8 mL de água | |

Tabela 1: Concentração dos compostos orgânicos presentes na urina sintética e preparação das amostras a serem analisadas.

Após esta análise, a urina sintética foi fabricada em laboratório e analisada em concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01%, sendo submetida à mesma condição experimental descrita anteriormente para a obtenção dos espectros SERS.

2.2. PRODUÇÃO DE SUBSTRATOS SERS À BASE DE PAPEL COM IMPRESSÃO EM CERA

O papel de sulfite A4 é submetido à impressão de cera com o padrão de círculos de 3 mm de diâmetro, e depois é colocado em uma prensa térmica por 30 segundos para fazer com a cera entre em contato com o papel e torne o meio hidrofóbico. Após este procedimento, ocorre a deposição de 10 μ L de solução concentrada de nanopartículas de ouro dentro dos círculos e secagem em temperatura ambiente.

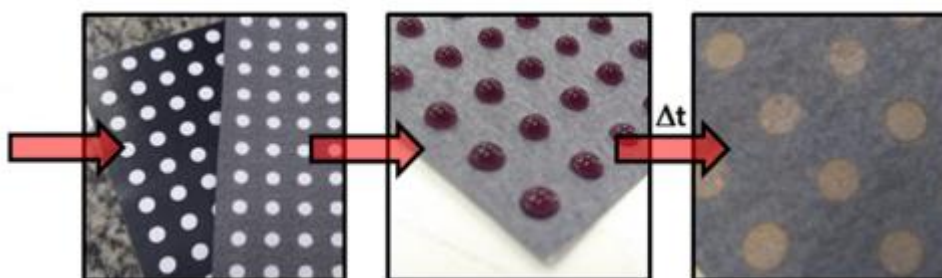


Figura 1: Procedimento para produção rápida de substratos SERS à base de papel envolvendo impressão de padrões de cera hidrofóbica, aquecimento, deposição de solução coloidal concentrada e etapas de secagem.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. URINA SINTÉTICA

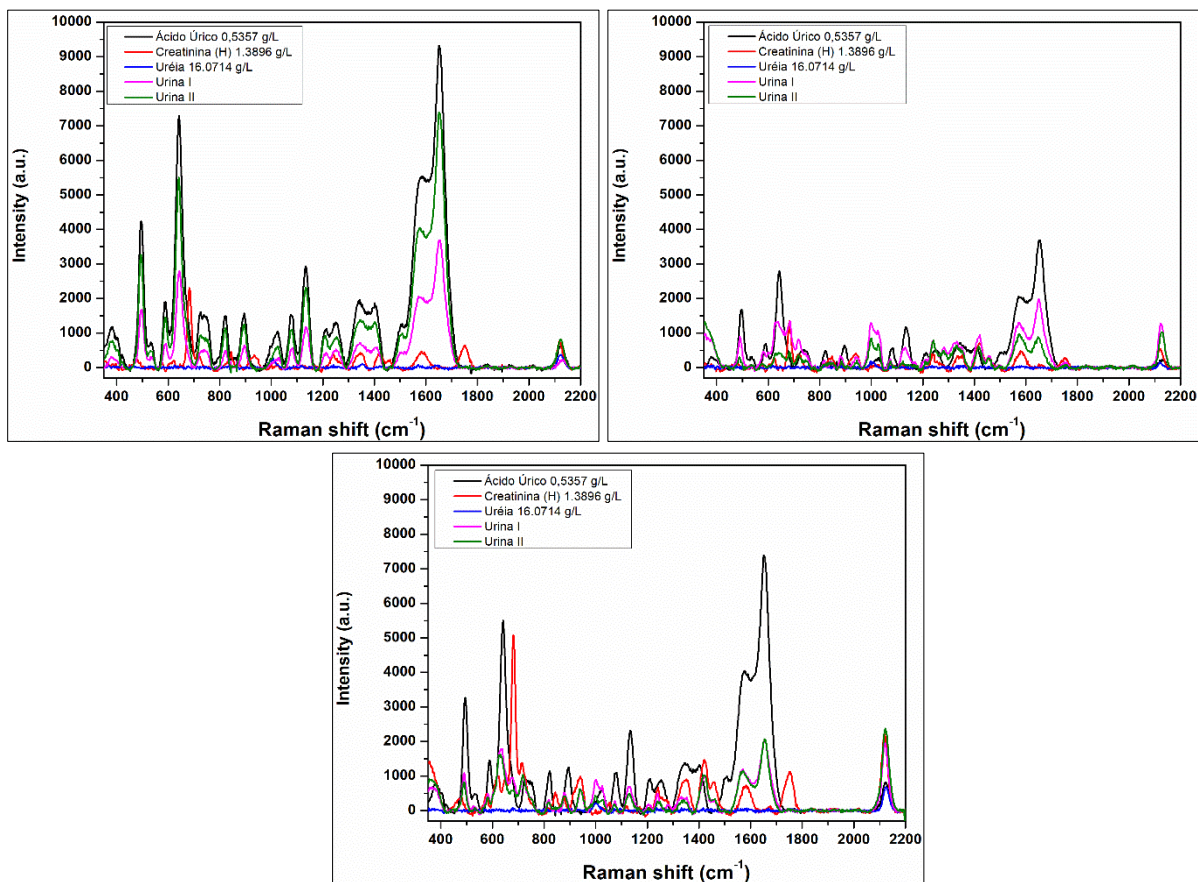


Figura 2: Espectros SERS da urina sintética em meio neutro (gráfico 1), ácido com a adição 10 μ L de 1,1 mol/L HCl (gráfico 2) e básico com a adição 10 μ L de 1 mol/L NaOH (gráfico 3). Condição da análise: 4 exposições, 50 segundos de acumulação e 10% da capacidade de laser. Urina I: saliva sintética à 100%; Urina II: saliva sintética à 50%.

A partir dos espectros (Figura 1), podemos notar a presença de bandas espectrais características do ácido úrico (468-555,70 cm⁻¹), da creatinina (1389,57-1493,67; 794,33-971,30 e 1523,0-1706,48 cm⁻¹) e da ureia (961,06-1056,45 cm⁻¹). Essa identificação de bandas SERS foi baseada nos espectros SERS puros obtidos dos componentes individuais da urina. E relacionando a urina sintética a 100% e 50% de concentração aos espectros de seus compostos orgânicos, observou-se que o espectro da urina é principalmente constituído pelo ácido úrico em ambos os meios (ácido, básico e neutro), ao contrário da ureia que pela intensidade baixa é pouco expressada no espectro. Já com relação a creatinina, em meio ácido foi possível visualizar uma banda correspondente ao redor de 690 cm⁻¹. Disto, para detecção dos níveis de creatinina em uma amostra biológica será necessário a adesão a um meio ácido.

Com a obtenção dos espectros SERS da urina sintética em concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (Figura 2), pudemos visualizar bandas características presentes em ambos os espectros, o que pode permitir a determinação da concentração de uma amostra desconhecida pela identificação da faixa de intensidade que ela sinaliza nos espectros.

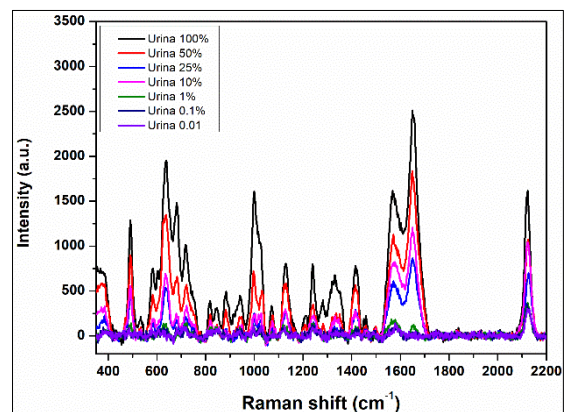


Figura 3: Sobreposição dos espectros SERS da urina sintética em concentrações de 100%, 50%, 25%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01%. Condição da análise: 4 exposições, 50 segundos de acumulação e 10% da capacidade de laser.

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos, podemos identificar bandas características de cada composto orgânico presentes na urina, sendo analisados em meio neutro, ácido e básico, e identificar as mesmas bandas em uma solução de urina sintética produzida em laboratório, apesar da ureia não expressar fortemente seus sinais característicos na solução.

Ademais, concluímos que o papel pode ser utilizado como um excelente substrato SERS devido a boa aderência de nanopartículas de ouro, o baixo custo, e uma alta intensificação de sinal.

5. BIBLIOGRAFIA

BASTOS, Marcus Gomes; BREGMAN, Rachel; KIRSZTAJN, Gianna Mastroianni. **Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável.** Revista da associação médica brasileira, v. 56, p. 248-253, 2010.

DUSSE, Luci Maria SantAna et al. **Biomarcadores da função renal: do que dispomos atualmente?.** Revista Brasileira de Análise Clínicas, 2017.

LANGARO, Ana Paula; MICHELUTTI, Kamylla Balbuena; DOS SANTOS NOBRAGA, Michele Aparecida. **SERS: Conceitos básicos e aplicações em sistemas biológicos.** ANAIS DO ENIC, n. 6, 2014.

TEIXEIRA, Carlos A.; POPPI, Ronei J. **based SERS substrate and one-class classifier to monitor thiabendazole residual levels in extracts of mango peels.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 229, p. 117913, 2020.

VILLA, Javier EL; PASQUINI, Celio; POPPI, Ronei J. **Surface-enhanced Raman spectroscopy and MCR-ALS for the selective sensing of urinary adenosine on filter paper.** *Talanta*, v. 187, p. 99-105, 2018.

BASTÚS, Neus G.; COMENGE, Joan; PUNTES, Víctor. **Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening.** *Langmuir*, v. 27, n. 17, p. 11098-11105, 2011.

TEIXEIRA, Carlos A.; POPPI, Ronei J. **Paper based SERS substrate and one-class classifier to monitor thiabendazole residual levels in extracts of mango peels.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 229, p. 117913, 2020.