

PLATAFORMA MICROFLUÍDICA PARA ANÁLISE DE ALBUMINA SÉRICA

Driély Stocco Cerqueira

Emanuel Carrilho

Mariana Bortholazzi Almeida

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

drileycerqueira@usp.br

Objetivos

Analisar a reação colorimétrica entre a albumina bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) e o verde de bromocresol (BCG, do inglês *bromocresol green*) em dispositivos microfluídicos para aplicação em diagnósticos clínicos rápidos, precisos e simples.

Métodos e Procedimentos

Foram feitas reações no modo *spot test* utilizando recortes de 6 mm de diâmetro como substrato. Inicialmente foram avaliados diferentes substratos para a reação: papel Whatman nº1 e 5 diferentes tipos de fibras de vidro, a fim de se determinar o melhor material suporte para a reação colorimétrica.

O reagente colorimétrico utilizado foi o verde de bromocresol 0,66 mmol/L em solução tampão citrato 95 mmol/L pH 4,2. A albumina bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) foi utilizada como molécula de estudo por apresentar similaridade com a humana. Diferentes soluções de BSA foram preparados em tampão fosfato-salino 0,01 M (PBS) pH 7,4 para a obtenção da curva analítica na faixa de 5 a 100 g/L. Também foram feitas curvas de adição de padrão com BSA em plasma humano comercial. Em todas análises foi usado uma proporção de 1:1 (BCG:BSA) em

relação ao volume, sendo o BCG depositado e seco previamente à adição da amostra.

O experimento foi realizado em temperatura ambiente e com aquecimento brando (40 °C) e a reação colorimétrica foi monitorada a cada 2 minutos com tempo máximo de 50 minutos. As condições experimentais foram otimizadas em relação à quantidade de amostra adicionada e à concentração do BCG.

As imagens digitais de todos os resultados foram tratadas pelo software *ImageJ*, avaliando os canais RGB, HSB, L*a*b e CMYK. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistica* (Tibco).

Resultados

A dosagem da albumina sérica pode auxiliar na investigação de doenças cardiovasculares, e pode ser facilmente realizada pela reação entre a albumina e o BCG pela formação de um complexo azul. Reações colorimétricas são vantajosas pela adaptabilidade a dispositivos microfluídicos de baixo custo. Neste contexto, avaliou-se o melhor substrato para a reação a partir de 6 diferentes materiais suportes: papel de filtro qualitativo Whatman nº1, fibra de vidro VF2, fibra de vidro GF/DVA, fibra de vidro MF1, fibra de vidro LF1 e fibra de vidro Fusion5 (Whatman, Cytiva). Todos os substratos foram avaliados na faixa dinâmica de 5 a 100 g/L de BSA. A fibra de vidro Fusion5 e o papel filtro,

apresentaram melhor uniformidade da cor e uma diferenciação nítida a olho nu entre as concentrações estudadas. Contudo, a reação realizada na Fusion5 apresentou melhor distinção entre as concentrações e comportamento linear satisfatório ($r^2 > 0,975$). A reação realizada sob temperatura ambiente não foi suficiente para promover a distinção das concentrações avaliadas, mesmo após 50 minutos. Porém, quando avaliadas as condições de 40 °C por 10 minutos a coloração obtida apresentou melhora significativa. O uso de papel absorvente para reter o excesso dos reagentes também contribuiu para a uniformidade da coloração (Figura 1a).

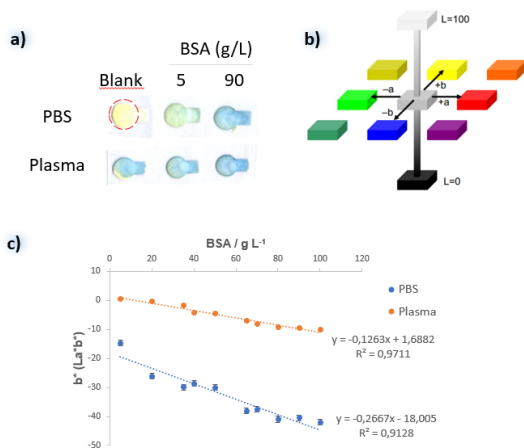


Figura 1. Teste colorimétrico de albumina com verde de bromocresol. a) Coloração obtida para ensaio em PBS e soro humano. Tracejado vermelho indica local de análise da imagem. b) Espaço de cor $L^*a^*b^*$. c) Curva analítica obtida em PBS e em soro humano na faixa de 5 a 100 g/L de BSA.

Dentre os canais de cores avaliados, o melhor componente para a análise dos resultados foi o b do padrão $L^*a^*b^*$, que justamente explica a variação da cor no eixo amarelo-azul (Figura 1b), similar à reação colorimétrica realizada, já que o branco apresenta coloração amarela e quanto maior a concentração de BSA mais intenso o azul, até um certo limite.

Através da análise dos resultados (Figura 1c) foi possível observar que o método apresentou significativo efeito matriz impactando na sensibilidade do mesmo. Contudo é possível distinguir faixas de baixa (<30 g/L), média e alta concentrações de BSA com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) (ANOVA-Tukey). Ainda é necessário um aperfeiçoamento do método a fim de se obter melhores distinções entre as concentrações.

Conclusões

O método apresentou tendência na distinção visual das concentrações baixa e média-alta., Entretanto é necessário aperfeiçoar este experimento para a obtenção de melhores resultados analíticos e para a diferenciação com clareza entre os valores abaixo da faixa normal de albumina, dentro e acima desta, para ser usado em diagnósticos clínicos.

Agradecimentos

Agradeço a todos os integrantes do BioMicS, em especial a minha orientadora Dr^a. Mariana Bortholazzi Almeida por todo apoio e suporte durante a pesquisa. Agradeço também ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências

- GIRI, Basant. Laboratory Methods in Microfluidics. 1 ed. Elsevier, 2017, 159 p., p. 21-27.
- YANG, R.; TSENG, C.; JU, W.; FU, L. & SYU, M.. Integrated microfluidic paper-based system for determination of whole blood albumin. Sensors and Actuators B: Chemical, v. 273, p. 1091-1097. 2018
- YANG, R.; TSENG, C.; JU, W.; WANG, H. & FU, L.. A rapid paper-based detection system for determination of human serum albumin concentration. Chemical Engineering Journal, v. 352, p. 241-246. 2018
- Kent's Technology of Cereals, Fifth Edition <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100529-3.0007-4>