

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES VESTÍVEIS PARA ANÁLISES NÃO INVASIVAS DE BIOMARCADORES PROTEICOS

Isadora Muriana de Arêa Lima Pereira

Lucas Aguiar Neves e Mariana Bortholazzi Almeida

Prof^a. Dr^a. Laís Canniatti Brazaca

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo

i.muriana@usp.br

Objetivos

Desenvolver um biossensor colorimétrico vestível baseado na adaptação da técnica *lateral flow* para a análise de biomarcadores proteicos em suor.

Métodos e Procedimentos

O dispositivo microfluídico para coleta e análise de suor foi preparado com adesivos dupla face (ARcare[®] 90106) cortados a laser de CO₂ (Cortadora KW 600, KAWAI) em dois tamanhos (40 e 50 mm de diâmetro) com entradas de suor de 2 mm, e com parâmetros otimizados (Velocidade - 95 mm/s; Power - 20% e Corner Power - 14%). Em uma face do adesivo foram coladas as membranas do teste *lateral flow* - de conjugação (similar à fibra de vidro), de detecção (nitrocelulose) e de absorção, também cortadas a laser - sendo estas recobertas por uma camada de plástico filme (Figura 1).

Para otimizar o design do dispositivo, foram realizados testes *in vitro*, adicionando 10 µL de água em cada entrada de amostra para medir o tempo de deslocamento do líquido pelo teste e otimizar a quantidade de entradas. Para avaliar a concentração ideal de anticorpo (Ab) para conjugação com AuNPs, foi realizada uma titulação com diferentes concentrações do anticorpo em PBS 1x. Após isso, foi adicionado NaCl (água ultrapura, 1 mol/L) para, através da agregação das AuNPs, verificar se estas estavam completamente revestidas com os Abs, por meio da mudança de coloração¹.



Figura 1: Dispositivo *lateral flow* vestível feito a partir do adesivo ARcare[®] 90106 e plástico filme. O protocolo geral otimizado de conjugação AuNP-Ab envolve a centrifugação de 1 mL de AuNPs por 15 minutos (9.000 rpm), seguida da ressuspensão em tampão de conjugação, bloqueio com BSA 1%, ressuspensão em tampão de lavagem e em tampão de conjugado. O *lateral flow* foi otimizado com diferentes pares antígeno-Ab nos tipos sanduíche e competitivo, através da modificação das membranas de conjugados e teste². Na primeira, aplicou-se 30 µL da solução de AuNP-Ab. Na segunda, foi adicionado 1 µL de antígeno (1 g/L) para o teste do tipo competitivo e 1 µL de Ab (1 g/L) para o teste do tipo sanduíche. Por fim, foi adicionado 10 µL de amostra em cada entrada e, ao controle, foi adicionado uma solução de 10 µL de tampão de corrida.

Resultados

Ao aderirmos os dispositivos em substratos flexíveis, estes não mostraram vazamentos, além de continuarem firmemente aderidos após a movimentação desta por cerca de 5 minutos,

sendo que os dispositivos de 50 mm de diâmetro continuaram aderidos por toda a sua extensão. Na otimização do design, observou-se que dispositivos com mais entradas foram mais eficientes, levando tempos mais curtos para o líquido percorrer o teste. Isso é comprovado quantitativamente pela Figura 2, que demonstra que o tempo para o líquido percorrer o teste é menor no dispositivo de 5 entradas.

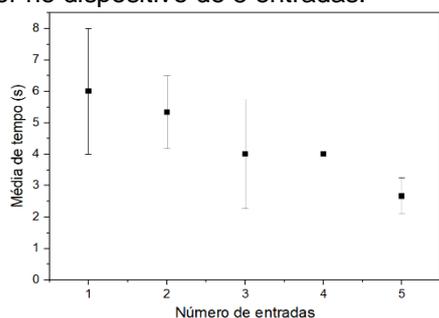


Figura 2: Comparação entre os dispositivos de 1 a 5 entradas de amostra nos testes *in vitro*.

Na titulação, os resultados demonstraram que a concentração mínima de anticorpo necessária para o conjugado não agregar é de 10^{-4} g/mL. O protocolo de conjugação eletrostática foi otimizado ajustando a composição dos tampões e os parâmetros de centrifugação. O protocolo de conjugação 3 foi o mais bem-sucedido (Tabela 1), sem apresentar perda de coloração ou AuNPs, e com o conjugado migrando no papel mesmo após secagem.

Tabela 1: Condições usadas em cada uma das conjugações AuNP + Anti-BSA.

Condições	Conjugação 1 (A)	Conjugação 2 (B)	Conjugação 3 (C)
Concentração	Baixa	Alta (1/5 e 1/10 do	Alta (\approx 1/11 do
AuNP	(1/2 do volume)	volume)	volume)
Parâmetros	30 minutos	30 minutos	15 minutos
centrifugação	(10000 rpm)	(10000 rpm)	(9000 rpm)
Bloqueio	Sem bloqueio	Sem bloqueio	Caseína 1%/Sem bloqueio

Diversos testes *lateral flow* foram realizados utilizando pares de anticorpo-antígeno distintos, incluindo o par da proteína S do SARS-CoV-2 e da clusterina. A partir disso, o *lateral flow* foi otimizado no que tange ao volume de conjugados e ao tipo de teste - sanduíche ou competitivo. Nesse sentido, o teste com maior sucesso foi o realizado a clusterina, sendo do tipo competitivo, conforme previsto pela literatura³, e com a adição de 10 μ L da solução

de conjugados na membrana de amostra (Figura 3). O teste com a proteína S do SARS-CoV-2 falhou, provavelmente, devido à sua desnaturação por estar armazenada há longos períodos.



Figura 3: Teste *lateral flow* otimizado do tipo competitivo. À esquerda, teste com adição do antígeno (+) e à direita, teste sem a presença de antígeno.

Conclusões

Os resultados indicam que o dispositivo microfluídico com adesivo dupla-face é uma alternativa simples e barata à litografia macia, com boa eficiência em testes *in vitro*. Ademais, o dispositivo integrado ao *lateral flow* se apresenta como um potencial biossensor colorimétrico vestível para análise rápida e de baixo custo de biomarcadores proteicos no suor.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa Unificado de Bolsas (PUB) e a FAPESP (Processos 2023/15245-0 e 2023/10141-2).

Referências

- 1 MBAMBO, A. T. et al. Fabrication and application of a gold nanoparticle-based colorimetric device for the determination of NaCl in seawater and estuarine water. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 21, n. 7, 25 jun. 2019.
- 2 PAROLO, C. et al. Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays. *Nature Protocols*, v. 15, n. 12, p. 3788–3816, 1 dez. 2020.
- 3 BRAZACA, L. C. et al. Colorimetric Paper-Based Immunosensor for Simultaneous Determination of Fetuin B and Clusterin toward Early Alzheimer's Diagnosis. *ACS Nano*, v. 13, n. 11, p. 13325–13332, 29 out. 2019.