

Detecção de cloreto em μ PADs para diagnóstico de fibrose cística

Daniel Santos de Paula

Prof. Dr. Wendell K. T. Coltro

Hospital das Clínicas da UFG | EBSERH

Goiânia, 13 de setembro, 2024

Introdução

Os dispositivos microfluídicos são amplamente utilizados em teste de *point-of-care* (POC) devido ao seu baixo custo, acessibilidade, portabilidade e baixo volume de reagente. Destacam-se os dispositivos microfluídicos baseados em papel (μ PADs) devido a movimentação das amostras apenas pela capilaridade da celulose (Carrell et al., 2019). Associado a esses princípios, as técnicas de detecção colorimétrica são comumente acopladas aos μ PADs pela fácil obtenção de resposta analítica (Anushka et al., 2023). Dentre as modalidades dessa área, os testes em μ PADs baseados em distância recebem atenção devido resposta direta dada pela relação entre distância percorrida em um canal microfluídico isolado por uma barreira hidrofóbica e a concentração de um analito de interesse (Alsaed & Mansour, 2020). Dentre os desafios enfrentados pelos μ PADs, o mais preocupante para a técnica é a obtenção de reprodutibilidade satisfatória entre as análises (Carrell et al., 2019).

A fibrose cística é uma doença genética causada por uma mutação no gene CFTR, resultando em desregulação de eletrólitos e sintomas como inflamação das vias aéreas e falha pancreática (Cutting, 2015). A concentração de cloreto (Cl^-) no suor é um biomarcador essencial para o diagnóstico, sendo valores acima de 60 mmol L^{-1} indicativos da doença. A técnica padrão-ouro para essa determinação é a condutometria (Stern, 1997).

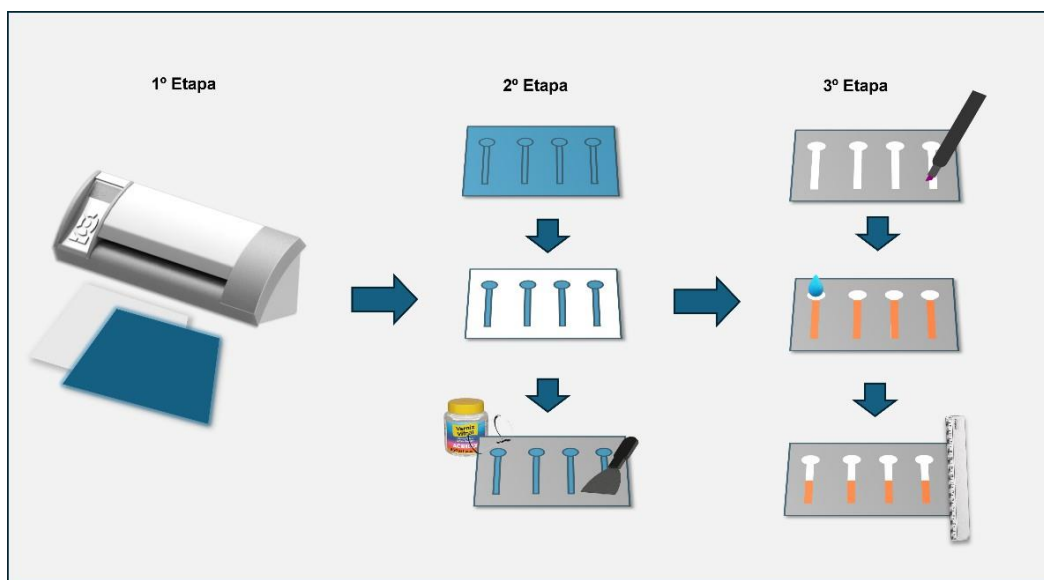
Portanto, visando a importância de um teste de fácil aplicação que demande baixo volume de amostra, propõe-se o uso de cloranilato de prata como agente precipitante em um teste colorimétrico acoplado com μ PADs baseados em distância, compondo um kit com caneta reabastecível e régua para leitura analítica.

Metodologia

O dispositivo foi fabricado usando-se papel cromatográfico laminado termicamente com Polaseal e coberto com vinil autoadesivo para o corte dos canais microfluídicos para perfazer a máscara. A barreira hidrofóbica foi criada com verniz vitral incolor inserindo-se o referido material sobre a máscara adesiva, com o auxílio de uma espátula, seguido da remoção da máscara. O dispositivo é composto por um canal de análise de 50 mm de comprimento, 2 mm de largura e uma zona circular de amostragem de 6 mm de diâmetro. A leitura dos dados foi realizada usando um paquímetro digital.

O procedimento de síntese do cloranilato de prata foi executado com base no protocolo usado por Bonifácio (Gomes Bonifácio, 2008.).

A solução de cloranilato de prata ($\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$) foi preparada com acetonitrila e tampão Britton-Robinson (pH 2). O precipitante foi aplicado no canal usando uma caneta marcadora de ponta de 3 mm. As análises de cloreto foram realizadas com soluções padrão de cloreto de sódio, variando de 0,5 a 5 mmol L^{-1} . Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.



Esquema 1 – Metodologia experimental.

Resultados e Discussão

Inicialmente, a reação de precipitação com o cloranilato de prata foi avaliada para verificar sua viabilidade como o agente precipitante. Através da espectroscopia em UV-Vis foi possível observar o decaimento da intensidade de absorção do comprimento de onda de 525 nm do composto após a adição de cloreto. O decréscimo de 0,20 UA para 0,16 UA representa o consumo do reagente devido a formação de cloreto de prata (AgCl).

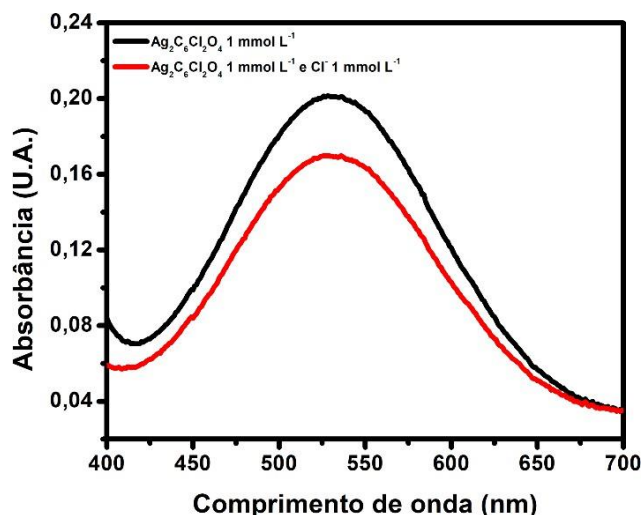


Figura 1 - Varredura no espectro do visível da absorvância do cloranilato de prata 1 mmol L^{-1} antes e após a reação com cloreto de sódio 1 mmol L^{-1}

Os primeiros parâmetros analíticos otimizados foram em relação ao preenchimento do canal com amostra e os tempos de análise. Os melhores resultados, considerando baixo desvio padrão e melhor intensidade de sinal, podem ser vistos na Figura 2. O volume de amostra necessário foi fixado em 35 μL . O tempo de secagem do agente precipitante foi de 2 minutos, enquanto o tempo para obtenção da leitura analítica foi de 25 minutos. A concentração do agente precipitante também foi otimizada, sendo selecionada a de 10 mmol L^{-1} uma vez que fornece o melhor desempenho analítico, como mostra a Figura 3.

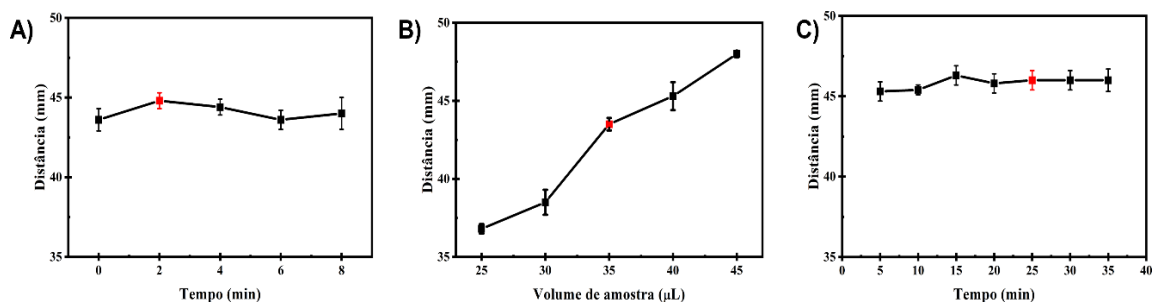


Figura 2 – Gráficos de A) tempo de secagem do agente precipitante, B) volume de amostra e C) tempo para leitura analítica. Amostra de Cl^- 1 mmol L^{-1} .

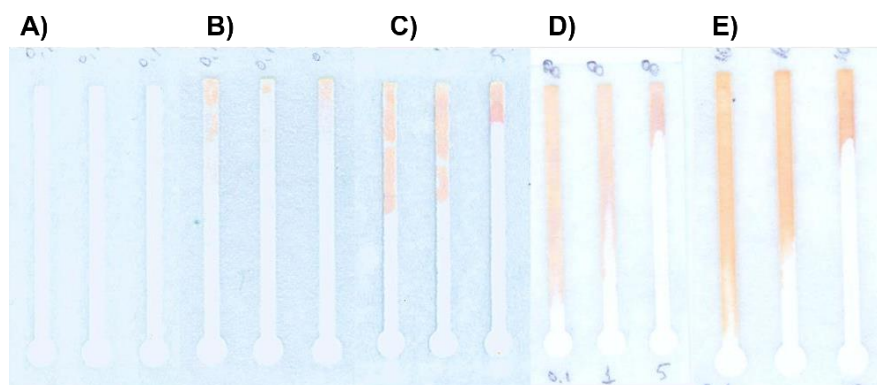


Figura 3 - Concentração de precipitante no canal do dispositivo: A) 2 mmol L⁻¹; B) 4 mmol L⁻¹; C) 6 mmol L⁻¹; D) 8 mmol L⁻¹ e E) 10 mmol L⁻¹.

A quantidade de agente precipitante depositada no canal microfluídico foi avaliada em relação ao número de aplicações com a caneta na superfície do papel. Como mostra a Figura 4, após mais de uma aplicação sequencial no μ PAD ocorre a deformação na superfície do papel, portanto, a passada única foi selecionada para prosseguir os testes.

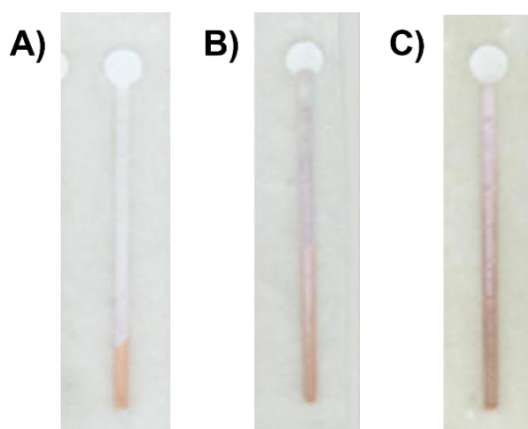


Figura 4 - Dispositivos após A) uma aplicação de precipitante, B) duas e C) três, com [Cl⁻] = 5 mmol L⁻¹.

O método tradicional de deposição de reagentes em canais microfluídicos por distância utiliza micropipetas demonstrou um DPR de 4,6% para medidas de Cl⁻ 1 mmol L⁻¹, enquanto a caneta apresentou um DPR de 4,8%, mostrado na Figura 5. Performando um teste estatístico F, com 5% de significância, com um p-valor igual a 0,2756, demonstrando que a aplicação com a caneta não apresenta desvantagem na repetibilidade em relação ao estabelecido em outros trabalhos.

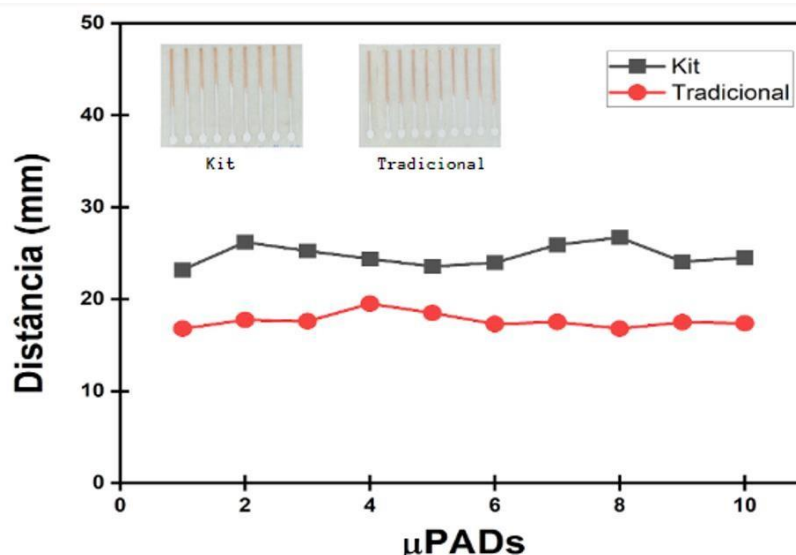


Figura 5 -Repetibilidade para aplicação com caneta (kit) e com a pipeta (tradicional) de $[Cl^-] = 1$ $mmol L^{-1}$.

A curva de equação igual a $y (mm) = \log[Cl^-] * 28 + 24$, com um coeficiente de determinação de 0,999 e um coeficiente de correlação igual a 0,999 (Figura 6). O limite de detecção (LOD) foi demonstrado experimentalmente, sendo igual a $0,17 mmol L^{-1}$, e o limite de detecção (LOQ) foi de $0,5 mmol L^{-1}$, utilizado como o primeiro ponto da curva construída. Estes valores para a caneta mostraram-se semelhantes aos obtidos com a pipeta. Amostras sintéticas de suor (Kumar et al., 2022) foram dopadas em dois níveis de concentração de cloreto (75 e $55 mmol L^{-1}$) para determinar a confiabilidade do método. As respostas analíticas obtidas foram de $79,1$ e $53,6 mmol L^{-1}$, um erro experimental baixo de $5,5\%$ e $2,4\%$, respectivamente, considerando os critérios na literatura para técnicas colorimétricas.

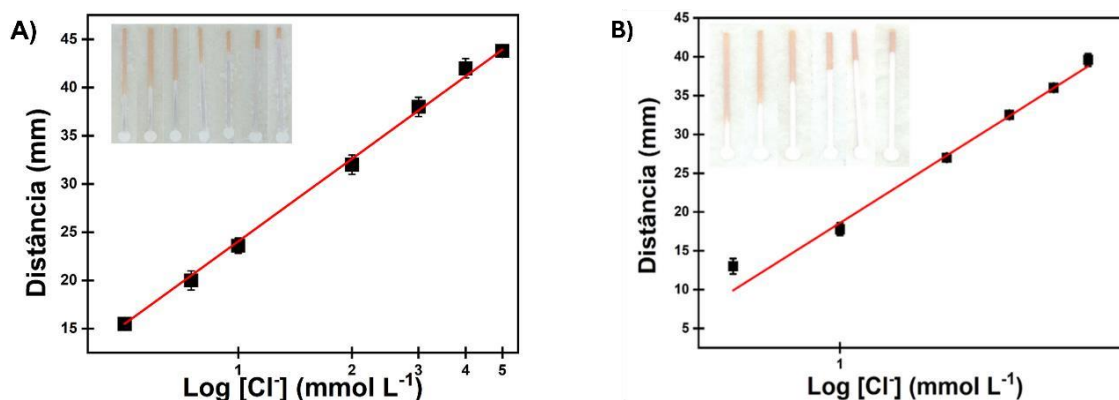


Figura 6 - Distância (mm) vs Concentração ($mmol L^{-1}$) com agente precipitante aplicado com A) caneta e B) micropipeta.

Outro estudo realizado foi o teste de seletividade na presença de potenciais interferentes, ou seja, de outras espécies características da matriz da amostra, em concentrações cinco vezes menores que de Cl^- , representativo da concentração geralmente encontrada no suor. A Figura 7 demonstra a distância percorrida por cada espécie. O teste t, com 5% de significância, demonstrou que não há diferença significativa na distância da amostra na presença dos interferentes.

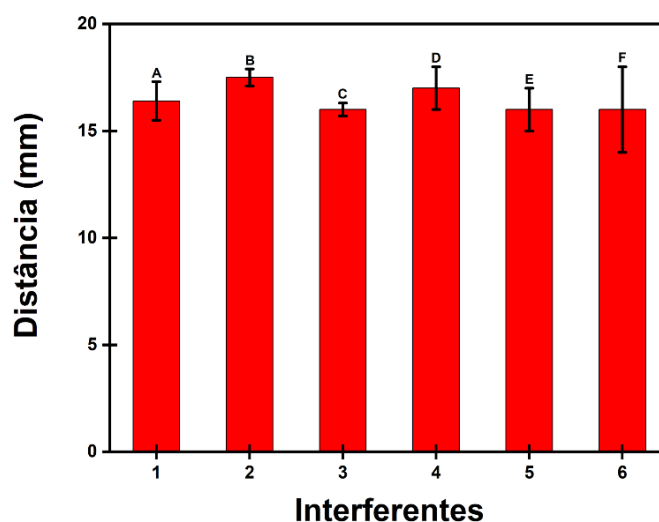


Figura 7 - Distância (mm) percorrida por A) cloreto 1 mmol L⁻¹ e por amostras contendo os interferentes B) ureia, C) iodeto, D) glicose, E) zinco e F) lactatose.

Conclusão

O uso do $\text{Ag}_2\text{C}_6\text{Cl}_2\text{O}_4$ com caneta para diagnóstico de fibrose cística em μPADs oferece uma alternativa acessível e portátil, com sensibilidade 120 vezes maior para detectar cloreto em amostras de suor. Isso facilita o manuseio de amostras de baixo volume e proporciona um diagnóstico simples, preciso e econômico, superando desafios de baixa seletividade da tradicional técnica de condutometria.

Referências

- Alsaeed, B., & Mansour, F. R. (2020). Distance-based paper microfluidics; principle, technical aspects and applications. In *Microchemical Journal* (Vol. 155). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104664>
- Anushka, Bandopadhyay, A., & Das, P. K. (2023). Paper based microfluidic devices: a review of fabrication techniques and applications. In *European Physical Journal*:

Special Topics (Vol. 232, Issue 6, pp. 781–815). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1140/epjs/s11734-022-00727-y>

Carrell, C., Kava, A., Nguyen, M., Menger, R., Munshi, Z., Call, Z., Nussbaum, M., & Henry, C. (2019). Beyond the lateral flow assay: A review of paper-based microfluidics. *Microelectronic Engineering*, 206, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.mee.2018.12.002>

Cutting, G. R. (2015). Cystic fibrosis genetics: From molecular understanding to clinical application. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 16, Issue 1, pp. 45–56). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg3849>

Gomes Bonifácio, V. (2008). UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTOS EM FLUXO ENVOLVENDO ESPECTROFOTOMETRIA CONVENCIONAL E COM LONGO CAMINHO ÓPTICO PARA DETERMINAÇÃO DE ÂNIONS EM ÁGUAS.

Kumar, P. A., Pradeep, A., Nair, B. K. G., Babu, T. G. S., & Suneesh, P. V. (2022). Silver-manganese nanocomposite modified screen-printed carbon electrode in the fabrication of an electrochemical, disposable biosensor strip for cystic fibrosis. *Microchimica Acta*, 189(9). <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05431-1>

Stern, R. C. (1997). The diagnosis of cystic fibrosis. *The New England Journal Of Medicine*, 336(7), 487–491.