



Ana Luísa Mateus Chocalheiro

Licenciada em Bioquímica

Lab on Paper: biossensores colorimétricos de papel para a detecção de membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL
Co-orientador: João José Inácio Silva, Prof. Doutor, U. Brighton, UK
Co-orientador: Miguel Viveiros Bettencourt, Prof. Doutor, IHMT

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Pedro António de Brito Tavares
Arguentes: Prof. Doutor Hugo Manuel Brito Águas
Vogal: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014

Ana Luísa Mateus Chocalheiro

Licenciatura em Bioquímica

***Lab on Paper: biossensores colorimétricos de papel
para a detecção de membros do complexo
Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL

Co-orientador: João José Inácio Silva, Doutor, U. Brighton, UK

Co-orientador: Miguel Viveiros Bettencourt, Prof. Doutor, IHMT

Departamento de Química
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

Setembro de 2014

***Lab on Paper: biossensores colorimétricos de papel
para a detecção de membros do complexo
Mycobacterium tuberculosis***

Copyright © 2014 – Todos os direitos reservados. Ana Luísa Mateus Chocalheiro. Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicado à ciência! Este é o meu contributo.

“Think like a proton. Always positive.”

De acordo com a legislação em vigor, reserva-se ao autor a opção de não aplicar o novo acordo ortográfico.

Agradecimentos

Acima de tudo, é com grande satisfação e prazer que chego ao fim de mais uma etapa da vida.

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto *Lab on Paper*, desenvolvido no Centro de Investigação de Materiais (CENIMAT) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT - UNL).

Tive o imenso privilégio e orgulho de me envolver neste projecto com os meus orientadores Professora Elvira Fortunato, Doutor João Inácio e Professor Miguel Viveiros. Um grande obrigado pela partilha de conhecimentos, sugestões e disponibilidade.

Como o trabalho de investigação científica, é sobretudo um trabalho de equipa, gostaria de agradecer também aos colegas de laboratório, investigadores, doutorandos e bolseiros por toda ajuda e auxílio, em especial à Mafalda Costa pelos conhecimentos ensinados e pela paciência demonstrada.

Quero ainda agradecer a disponibilidade quer dos equipamentos quer dos laboratórios, não só no CENIMAT mas no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e a todo o grupo de investigação do professor Ricardo Franco, bem como ao grupo de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e a todo o grupo de investigação do Professor Miguel Viveiros.

Por fim, agradeço aos meus pais, irmão e amigos pelo apoio e o carinho sempre demonstrados.

Resumo

Um factor importante para a prevenção e tratamento de doenças é um diagnóstico preciso e precoce. Em 2004, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu directrizes para o desenvolvimento de meios de diagnóstico adequados a países em via de desenvolvimento e situações de escassez de recursos, sumarizadas pela sigla ASSURED (*Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need*). Os métodos de detecção de marcadores, que indiquem estados patológicos, devem ser rápidos e quantitativos para assegurar um diagnóstico fiável, de maneira a permitir um tratamento eficaz e, assim, diminuir o impacto da doença na população.

Neste projecto, é desenvolvido um biossensor colorimétrico (tendo como base o teste de diagnóstico comercial Milenia[®] Hybridetect) para a detecção molecular do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o agente da tuberculose, através da exploração da tecnologia da microfluídica em papel. O biossensor consiste num pedaço de papel de cromatografia onde são impressos canais hidrofóbicos com cera. Estes canais são delimitados por barreiras hidrofóbicas impressas na superfície do papel e difundidas a 140 °C ao longo da espessura deste. O biossensor apresenta quatro diferentes áreas: a área de deposição da amostra, as linhas de teste e controlo e a área de depósito. Após a deposição dos reagentes de teste nas áreas específicas, a ocorrência da reacção de bioreconhecimento é detectada pela mudança de cor. Esta detecção é baseada na ocorrência de reacções de hibridação entre oligonucleótidos marcados com digoxigenina com total complementaridade com uma sequência específica de ácidos nucleicos, marcada com biotina, específica da micobactéria causadoras de tuberculose (IS6110). Este complexo é aprisionado na linha de teste por ligação com anticorpos anti-digoxigenina imobilizados na linha e, detectado pela mudança de cor, devido à acumulação de nanopartículas de ouro (AuNP) funcionalizadas com estreptavidina (que se liga à biotina). Estas nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de Turkevich. Na linha de controlo é depositada biotina, e quando ocorre ligação com as AuNP funcionalizadas com estreptavidina, aparece uma coloração vermelha na linha.

Palavras-chave: Biossensor, Estreptavidina, Biotina, Digoxigenina, Nanopartículas de ouro, Tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*

Abstract

An important factor for the prevention and treatment of diseases is an accurate and early diagnosis. In 2004, the World Health Organization (WHO) established guidelines for the development of appropriate diagnostic methods in underdeveloped countries and in shortages of resources, summarized by the acronym ASSURED (Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to Those in need). Methods for the detection of markers indicating disease states should be rapid and quantitative to ensure reliable diagnosis, in order to allow effective treatment, thereby decreasing the impact of disease in the population.

In this study we develop the basis of colorimetric biosensors (based on Milenia[®] Hybridetect's commercial diagnostic test) for the molecular detection of *M. tuberculosis* complex, the agents of tuberculosis, by exploring the technology of paper microfluidics. The biosensor consists in a piece of chromatography paper where microfluidic channels were patterned using hydrophobic wax. These patterns were printed on the paper surface and diffused at a temperature of 140 °C throughout its thickness. The biosensor has four different areas: sample deposition area, test and control lines and the waste area. After deposition of the testing reagents in specific areas, the occurrence of biorecognition reactions is detected by a color change. The detection is based on the occurrence of hybridization reactions between a digoxigenin-labeled oligonucleotide with fully complementary biotin-labeled nucleic acids specific of tuberculous mycobacteria (IS6110). This complex is trapped in the test line by ligation to immobilized anti-digoxigenin antibodies and detected by a color change due to the accumulation of gold nanoparticles functionalized with streptavidin (that binds to biotin). Gold nanoparticles were synthesized through the Turkevich method. In the control line biotin is deposited and a red spot appears after binding of gold-labeled streptavidin.

Keywords: Biosensor, Streptavidin, Biotin, digoxigenin, gold-nanoparticles, tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*

Lista de Acrónimos

Abs	Absorvância
ASSURED	<i>Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid and robust, Equipment-free and Delivered to those in need</i>
AuNP	<i>Gold nanoparticles</i> (Nanopartículas de ouro)
BAAR	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
BIO	Biotina
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albumina de soro bovino)
CENIMAT	Centro de Investigação de Materiais
CIT	Citrato
DIG	Digoxigenina
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDS	<i>Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
EUA	Estados Unidos da América
FCT	Faculdade de Ciências e Tecnologia
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i>
TB	Tuberculose
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis Complex</i>
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MUA	<i>Mercaptoundecanoic acid</i> (Ácido 11-mercaptoundecanóico)
NALF	<i>Nucleic Acid Lateral Flow</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão fosfato de sódio)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacção de polimerase em cadeia)
PDB	<i>Protein Data Base</i>

PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i> (Dimetil polissiloxano)
POC	<i>Point Of Care</i>
RGB	<i>Red Green Blue</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SA	Estreptavidina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SEM-FIB	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopia electrónica de varrimento)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Plasmónica de Ressonância de Superfície)
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tris-Ácido Bórico-EDTA
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i> (Microscopia electrónica de transmissão)
Trp	Triptofano
UNL	Universidade Nova de Lisboa
UK	<i>United Kingdom</i>
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
μPAD	<i>Paper-based microfluidic device</i> (Dispositivo de análise de microfluídica em papel)

Lista de Símbolos

Au	Ouro
Å	Angström
Cl⁻	Ião cloreto
c	Concentração
C	Carbono
C₁₀H₁₆O₃N₂S	Biotina
cm	Centímetro
E	Energia
f.d.	Factor de diluição
g	Força gravítica
h	Horas
H₂O	Água
HAuCl₄	Ácido cloroáurico
keV	Kiloelectrão Volt
Km	Kilómetro
kDa	Kilodalton
K_d	Constante de dissociação
l	Percurso óptico
M	Molar (mole /L)
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mM	Milimolar
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
mg	Miligrama
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
N	Azoto
NH₄OH	Hidróxido de amónia

Na⁺	Ião sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
Pb	Pares de bases
p/v	Peso por volume
U	Unidades
u.a.	Unidades arbitrárias
V	Volts
ε	Coefficiente de extinção molar
μL	Microlitro
°C	Grau centígrado
%	Percentagem
y, x	Coordenadas da equação da recta
m	Declive da equação da recta
b	Constante da equação da recta

Índice de Matérias

Agradecimentos	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Lista de Acrónimos	xv
Lista de Símbolos	xvii
Índice de Matérias	xix
Índice de Figuras	xxi
Índice de Tabelas	xxiii
Enquadramento e Objectivos	xxv
1 Introdução	3
1.1 Papel	
1.1.1 Composição do papel	3
1.1.2 Fabrico do papel	5
1.2 Biossensores	6
1.2.1 Biossensores em papel	7
1.2.2 Ensaio de fluxo lateral	8
1.3 Microfluídica	11
1.3.1 Microfluídica em papel	12
1.4 Bionanotecnologia	15
1.4.1 Conceitos Gerais	15
1.4.2 Nanopartículas	15
1.4.2.1 Nanopartículas metálicas	15
1.4.2.2 Nanopartículas de ouro (AuNP)	17
1.4.2.3 Síntese e determinação da concentração de AuNP	18
1.4.2.4 Estabilidade e funcionalização de AuNP	19
1.5 Tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect	21
1.5.1 Princípio de funcionamento das tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect	22
1.6 Tuberculose	23
1.6.1 Estado de arte na detecção de tuberculose	26
1.6.2 Lab on paper: detecção de tuberculose	27
1.6.2.1 Estreptavidina	28
1.6.2.2 Biotina	28
1.6.2.3 Interação Proteína - Ligando	29
1.6.2.4 Digoxigenina	30
2 Materiais e procedimento experimental	35
2.1 Materiais	35

2.2 Biomoléculas de reconhecimento	35
2.3 Alvo de reconhecimento	36
2.4 Tiras comerciais de teste rápido Milenia[®] Hybridetect	36
2.5 Síntese, funcionalização e estabilidade das AuNP	37
2.6 Formação e estabilidade dos Bionanoconjugados	38
2.6.1 Preparação dos Bionanoconjugados de Estreptavidina e AuNP – MUA	38
2.6.2 Estabilidade dos Bionanoconjugados por aumento da força iónica.....	39
2.7 Preparação e produção do substrato	39
2.8 Fabrico do dispositivo	40
2.9 Dispositivo para detecção de alvos genómicos do MTBC	41
3 Apresentação e Discussão de resultados	45
3.1 Caracterização das tiras comerciais de teste rápido Milenia[®] Hybridetect	45
3.1.1 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM).....	45
3.1.2 Aplicação das tiras comerciais de teste rápido Milenia [®] Hybridetect	49
3.2 Preparação do substrato (papel Whatman n^o1)	50
3.3 Síntese, caracterização e estabilidade das nanopartículas de ouro por espectrofotometria UV/Visível	52
3.3.1 Estudo da funcionalização das nanopartículas de ouro	53
3.3.2 <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	54
3.3.3 Estudo da variação da razão AuNP-MUA-SA	55
3.3.4 Estudo da variação da concentração de NaCl para AuNP-MUA-SA.....	58
3.4 Aplicação desenvolvida	61
3.4.1 Dispositivo para detecção do alvo genómico IS6110	61
4 Conclusões	69
Bibliografia	73
ANEXOS	83

Índice de Figuras

Figura 1.1: Composição da celulose, adaptado [6].....	4
Figura 1.2: componentes de um biossensor, adaptado [15]	7
Figura 1.3: Arquitectura de um ensaio de fluxo lateral, adaptado [21].	10
Figura 1.4: Esquema representativo da interacção de radiação electromagnética com uma nanoesfera metálica, adaptado [48].	16
Figura 1.5: Espectro de UV/Visível de uma solução de AuNP e fotografia de uma suspensão de AuNP. ...	18
Figura 1.6: Esquema representativo de AuNP a) revestidas com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e b) funcionalizadas com estreptavidina (SA), formando um bionanoconjugados.....	21
Figura 1.7: Representação esquemática da estrutura e funcionamento da tira comercial Milenia® Hybridetect, adaptado [86 - 87]	22
Figura 1.8: Incidência de tuberculose estimada por 100 mil pessoas em 2008, segundo a OMS [90].....	24
Figura 1.9: Representação esquemática dos componentes biológicos do biossensor e da sua ligação. ...	27
Figura 1.10: Visão geral das propriedades estruturais streptavidina. Estruturas de cristalografia de raios-X dos tetrâmeros da streptavidina (PDB 1mk5). A superfície molecular (1,4 Å) é apresentada a cinza transparente. As quatro moléculas de biotina estão representadas pelas esferas de <i>Van der Waals</i> [103].	29
Figura 2.1: Sistema de interruptores de fluxo utilizados para depositar reagentes nas linhas de teste e controlo dos dispositivos, adaptado: A) precisão de cortes; B) interrupção do canal; C) secagem dos reagentes e incubação do papel; D) interrupção do fluxo da solução e E) restabelecimento do fluxo da solução [106].	40
Figura 2.2: Representação esquemática do biossensor com os locais específicos de deposição dos analitos. 1) local de deposição da amostra; 2) local de deposição da streptavidina conjugada com nanopartículas de ouro; 3) linha de teste (com anticorpo anti-digoxigenina) e 4) linha de controlo (biotina).	41
Figura 3.1: Imagens de SEM das AuNP na zona de conjugação das tiras comerciais: A) ampliação de 100x; B) ampliação de 5 Kx e C) Imagem EDS da ampliação B) em que se observa o elemento químico ouro...	46
Figura 3.2: Imagens de SEM da membrana de nitrocelulose das tiras comerciais: A) ampliação de 10 Kx e B) ampliação de 20 Kx.	46
Figura 3.3: Imagens de SEM da linha de teste (após o uso) das tiras comerciais: A) ampliação de 10 Kx; B) ampliação de 20 Kx; C) Imagem EDS da ampliação B) em que se observa o elemento químico ouro.	47
Figura 3.4: Imagens de SEM da linha de controlo (após o uso) das tiras comerciais: A) ampliação de 1 Kx; B) ampliação de 10 Kx; C) Imagem EDS da ampliação B) em que se observa o elemento químico ouro. .	47
Figura 3.5: Espectros EDS das partes (substratos) da tira comercial Milenia® Hybridetect em estudo.....	48

Figura 3.6: Resultado do teste às tiras comerciais Milenia [®] Hybridetect: amostra positiva (em cima) e negativa (em baixo). O rectângulo da esquerda corresponde à linha de teste e o da direita à linha de controlo.	49
Figura 3.7: Análise de distribuição dos valores de RGB: Controlo corresponde à linha de controlo; Positivo corresponde à linha de teste na amostra positiva; Negativo corresponde à linha de teste na amostra negativa e Branco corresponde à nitrocelulose imediatamente a seguir ao autocolante azul que aparece na tira com a indicação do fluxo.	49
Figura 3.8: Ilustração das etapas de impressão, difusão da cera e efeitos da condução de fluidos pelo substrato.	50
Figura 3.9: Ilustração do sistema de interruptores utilizados na deposição de reagentes nas linhas de teste e de controlo.	51
Figura 3.10: Espectro de AuNP obtido após a síntese.	52
Figura 3.11: Espectro UV/Visível das diferentes funcionalizações estudadas para as AuNP.	54
Figura 3.12: Análise da média de diâmetro das nanopartículas de ouro e diferentes conjugados, segundo análise DLS.	55
Figura 3.13: Espectro UV/Visível das razões SA / AuNP-MUA entre 0 e 50.	56
Figura 3.14: Variação do estado de agregação em 24 horas entre as razões 0 e 50.	57
Figura 3.15: Espectro UV/Visível da razão 5 AuNP-MUA-SA logo após a incubação e no dia seguinte.	57
Figura 3.16: Estudo de agregação com NaCl para a razões em 0 e 5 (de A a F).	58
Figura 3.17: Gráfico da razão de agregação com NaCl entre razões 0 e 5 de SA.	60
Figura 3.18: Análise de valores RGB para a linha de teste, local de depósito e local sem reacção (branco) no dispositivo em papel.	61
Figura 3.19: Análise de valores RGB para AuNP-MUA-SA-BSA (teste respectivo à direita).	62
Figura 3.20: Análise de valores RGB para AuNP-MUA-SA (1h depois BSA) (teste respectivo à direita).	63
Figura 3.21: Análise de valores RGB para AuNP-CIT-SA-BSA (teste respectivo à direita).	63
Figura 3.22: Análise de valores RGB para AuNP-CIT-SA (1h depois BSA) (teste respectivo à direita).	63
Figura 3.23: Análise de valores RGB para a biotina a 0,204 M dissolvida em NH ₄ OH, em dispositivos de papel (testes respectivos à direita).	64
Figura 3.24: Análise de valores RGB para a biotina imobilizada indirectamente via oligonucleótidos marcados com esta molécula (a 100 μM), em dispositivos de papel (testes respectivos à direita).	64
Figura 3.25: Análise de valores RGB para a biotina a 8 x10 ⁻⁴ M dissolvida em H ₂ O, em dispositivos de papel (testes respectivos à direita).	65
Figura 3.26: Análise de valores RGB para a biotina a 8 x10 ⁻⁴ M dissolvida em H ₂ O, imobilizada em nitrocelulose (testes respectivos à direita com negativo em cima e positivo em baixo).	65
Figura 3.27: Análise de valores RGB para a biotina a 0,204 M dissolvida em NH ₄ OH, imobilizada em nitrocelulose (testes respectivos à direita com negativo em cima e positivo em baixo).	65

Índice de Tabelas

Tabela 3.1: Concentrações de estreptavidina para as diferentes razões de AuNP-MUA-SA.56

Tabela 3.2: Determinação dos valores de razão de agregação para as razões AuNP-MUA-SA estudadas.56

Enquadramento e Objectivos

Este trabalho teve como objectivo principal, o desenvolvimento de um biossensor em papel, adaptando as tiras comerciais Milenia[®] Hybridetect, para a detecção molecular de sequências específicas do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Um dos factores mais importantes na prevenção e tratamento de doenças é o acesso a um meio de diagnóstico simples e fiável que permita detectar estas doenças o mais cedo possível. Apesar de estes meios de diagnóstico estarem normalmente disponíveis apenas em países muito desenvolvidos, é sobretudo nos países em vias de desenvolvimento que fazem mais falta. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), deveria ser dada prioridade ao desenvolvimento destes testes para serem implementados nos países em vias desenvolvimento.

Para alcançar o objectivo inicial, após pesquisa científica, começou-se pela caracterização das tiras comerciais já existentes, para depois então tentar produzir um sistema funcional de diagnóstico molecular rápido e barato. Com o desenvolvimento de testes de diagnóstico rápidos, surge a utilização de microfluídica em papel. Esta é uma técnica que utiliza papel como suporte para se definirem microcanais e zonas de teste hidrófilas, delimitadas por paredes ou regiões hidrófobas. A reacção de determinados componentes das amostras com reagentes imobilizados nas zonas de teste origina uma alteração na cor dessas zonas, cujo resultado pode ser facilmente comparado com uma referência de cores que pode estar impressa no próprio dispositivo. Depois de utilizados, estes dispositivos em papel podem ser facilmente eliminados através da incineração, evitando contaminações.

É um tema com bastante actualidade internacional e enquadra-se no âmbito da Biotecnologia, Ciências da Vida e Engenharia de Materiais, com a vantagem de ter uma aplicação prática muito grande não só em termos laboratoriais mas também em termos dos resultados que se esperam alcançar, tendo por base alguns resultados já alcançados pela equipa da FCT-UNL.

Capítulo 1

1 Introdução

Neste trabalho propõe-se desenvolver e otimizar procedimentos que permitam o fabrico de dispositivos microfluídicos em papel, recorrendo a técnicas simples e de baixo custo. O objectivo global é então produzir um protótipo de um biossensor baseado em microfluídica, tendo como suporte papel de origem celulósica, que permita identificar micobactérias do *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC). As reacções de bioreconhecimento vão basear-se na hibridação de sondas de DNA com ácidos nucleicos específicos do MTBC, e na imobilização e detecção colorimétrica destes complexos nas zonas de teste na matriz de papel.

1.1 Papel

Por definição, o papel é um material fino, leve e flexível, constituído por redes de fibras de celulose naturais, feito a partir de uma pasta aquosa que posteriormente é seca. Desde cedo que o papel tem sido essencial ao homem, devido à sua fácil obtenção. No entanto, por ser de origem vegetal, o papel exhibe elevada complexidade tanto a nível químico como a nível morfológico. A nível químico, a sua constituição apresenta sobretudo ligações de hidrogénio. Como muitas vezes é necessário obter determinadas características no produto final (quer seja absorvidade ou força do papel), este passa por diferentes processos ao longo do seu fabrico. A sua utilização é muitas vezes associada à escrita, desenho, impressão e embalagens, no entanto, existem outras aplicações deste material, como saquetas de chá, papel cirúrgico, filtros e isolamento eléctrico [1, 2].

1.1.1 Composição do papel

A composição química do papel depende da fonte de celulose e do tratamento químico ao qual a madeira foi submetida para produzir a pasta de papel. Quando a pasta de papel não é tratada quimicamente a sua composição é muito semelhante à composição da fonte de celulose. As fibras de celulose utilizadas para o fabrico do papel, requerem alguns requisitos especiais tais como o alto conteúdo em celulose, baixo custo e fácil obtenção. Daí a necessidade de se usarem as fibras de origem vegetal. Estas fibras são maioritariamente

formadas por polissacáridos (celulose e hemicelulose), lenhina, e uma pequena porção de extractos orgânicos e inorgânicos [3].

A celulose é o composto mais abundante na composição do papel. De origem natural é um polissacárido linear homogéneo baseado em monómeros de glucose (β -1,4-D-glucopiranosose) (Figura 1.1), com grau de polimerização entre 3000 e 15000. O grau de cristalinidade da celulose depende da sua fonte. Encontra-se presente na parede celular dos vegetais, assumindo funções estruturais importantes. Devido ao seu elevado grau de polimerização e cristalinidade a celulose é responsável pela resistência das fibras. As ligações de pontes de hidrogénio entre os grupos hidroxilo dos monómeros de glucose que constituem a forte interacção existente entre as moléculas de celulose, originam a formação das fibras. Também na formação da folha de papel é esta interligação de pontes de hidrogénio que proporciona a interacção entre as fibras de celulose que constituem o papel, proporcionando a resistência necessária para a sua formação [1, 4, 5].

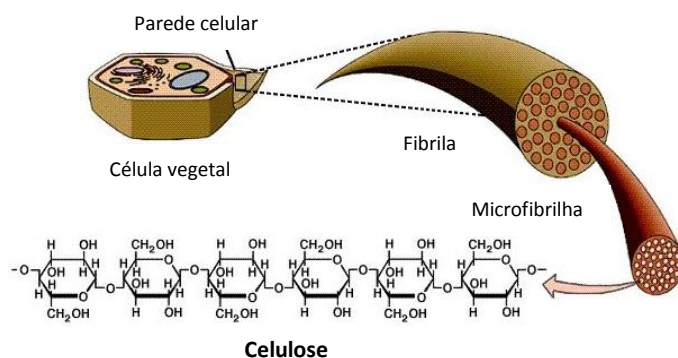


Figura 1.1: Composição da celulose, adaptado [6].

As hemiceluloses são um grupo de polissacáridos heterogéneos, não estruturais e com baixo peso molecular. Não estão relacionadas com a celulose uma vez que são formadas biossinteticamente por outra via. Formam uma matriz que envolve as microfibrilas de celulose através de interações entre pontes de hidrogénio e forças de *Van der Waals* que desempenham um papel importante na ligação entre a celulose cristalina e a lenhina amorfa. As hemiceluloses são benéficas para as propriedades da pasta e consequentemente, do papel, muito embora as razões para tal não sejam ainda totalmente claras. A resistência à tração do papel está correlacionada positivamente com o conteúdo de hemicelulose [1].

A lenhina é um polímero aromático presente na madeira com uma estrutura complexa, que representa cerca de 20 % do peso de madeira seca. Funciona como um agente de

fortalecimento da estrutura da madeira e também assiste na resistência da mesma a ataques de microrganismos e ao apodrecimento. Quase todas as propriedades da lenhina são indesejáveis para o fabrico de papel. Obtém-se papel de melhor qualidade a partir de pastas das quais a maioria da lenhina foi retirada. Além disso, as suas propriedades hidrofóbicas permitem o controlo do conteúdo de água. A presença de lenhina torna o papel frágil, amarelado e escurecido devido à oxidação fotoquímica. A lenhina encontra-se apenas em pastas provenientes de madeira, pelo que o processo de fabrico engloba vários tratamentos no sentido de a remover [1].

1.1.2 Fabrico do papel

Apesar dos avanços tecnológicos dos últimos anos, continuam a ser necessárias várias etapas no fabrico do papel. Após a trituração obtém-se pequenos pedaços de madeira (cavacos) que passam por quatro fases: 1) fabrico da polpa; 2) branqueamento; 3) formação da folha e 4) acabamento [7]. Para se transformar a madeira em polpa (matéria-prima do papel), é necessário separar a lenhina, a celulose e a hemicelulose. Para isso são necessários vários processos, sendo os principais mecânicos e os químicos. A qualidade e propriedades do papel produzido dependem da concentração de cada constituinte das células vegetais na pasta que o formará [1, 2].

O processo de fabrico do papel é altamente sofisticado, envolvendo processos de filtração a alta velocidade, o que produz um rede fibrosa molhada. Apesar de ser frágil, esta rede deverá ser puxada, prensada e seca continuamente, por bobines a alta velocidade (cerca de 60 km/h). Para evitar pausas e se obter uniformidade do produto, recorre-se ao controle por tecnologias e engenharias mais actuais. O produto final que se obtém consiste numa rede de fibras interligadas numa estrutura tridimensional com espessura entre 30 e 300 μm . Uma folha de papel tem em média 5 a 10 fibras de espessura [1]. Dependendo da aplicação do papel, podem existir adições de substâncias à pasta de fibras ou tratamentos superficiais, com o objectivo de melhorar determinadas características do mesmo [8, 9].

1.2 Biossensores

De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry*, um biossensor é "um dispositivo integrado que é capaz de fornecer informação quantitativa ou semi-quantitativa específica usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que é mantido em contacto directo com um elemento de transdução". O receptor actua sobre um mecanismo bioquímico, enquanto o transdutor pode ser de natureza diversa (um eléctrodo quimicamente modificado de condução eléctrica, semicondutores ou material condutor iónico, entre outros), e está em contacto directo com o receptor bioquímico [10].

Um biossensor é assim um dispositivo analítico que consiste num bioreceptor, um sistema de reconhecimento de uma substância biológica, e um transdutor, um sistema de transformação de actividade num sinal mensurável. São utilizados fundamentalmente para a monitorização nos campos da saúde e ambiente. A capacidade de detectar indicadores de patologias ou estados fisiológicos relevantes com grande sensibilidade e especificidade permite um diagnóstico numa fase inicial de uma condição, que pode reduzir de maneira relevante o custo associado ao tratamento do paciente [11, 12].

O homem sempre realizou bioanálises utilizando as suas capacidades sensoriais como células nervosas do nariz ou reacções enzimáticas na língua. Com o desenvolvimento do conhecimento do meio que nos rodeia, vários sistemas de detecção bioquímica presentes na natureza começaram a ser adaptados e controlados para efeitos de análise. Esta evolução na utilização de elementos de biorechecimento, combinados com métodos de transdução, permitiu a criação e expansão dos biossensores que podem ser classificados de acordo com o seu tipo de bioreceptor ou transdutor. Os bioreceptores mais utilizados baseiam-se nas interacções de anticorpo/antigénio, ácidos nucleicos, enzimas e células. No caso dos transdutores, as técnicas mais utilizadas são medidas ópticas, electroquímicas e sensíveis à massa e à variação térmica (Figura 1.2) [13]. Os biossensores modernos baseiam-se em técnicas de micro ou nano escala que melhoram os seus métodos de detecção e podem torná-los mais rápidos, baratos, fáceis de usar bem como aumentar a sua portabilidade – vantagens para o diagnóstico *Point Of Care* (POC) [14].

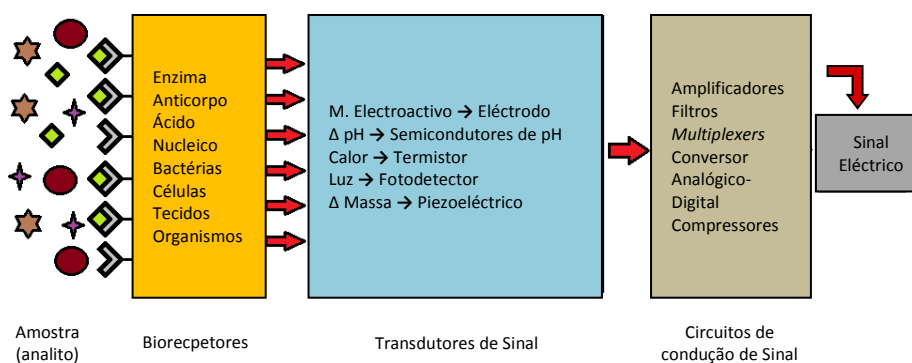


Figura 1.2: Componentes de um biossensor, adaptado [15]

1.2.1 Biossensores em papel

O papel é um bom meio para testes colorimétricos porque fornece um contraste forte devido à elevada relação superfície-volume que facilita e acelera a evaporação de soluções. Além disso, o papel é inflamável, por isso os testes de diagnóstico podem ser eliminados após o uso por incineração, facilmente e com segurança [2, 16].

Sabe-se que sistemas analíticos baseados em papel são adequados para aplicação em diagnósticos POC. Uma abordagem interessante combina o uso de plataformas baseadas em papel barato e análise digital de imagens para identificação de analitos relevantes. Este conceito faz uso de correlações colorimétricas quantitativas através de câmaras de telefones para digitalizar resultados, permitindo a medição da intensidade da cor. O processo de fabrico envolve duas operações principais: a impressão de padrões em cera sobre a superfície do papel e a sua fusão de modo a formar barreiras hidrofóbicas [2, 16].

A OMS estabeleceu sete directrizes para o desenvolvimento de diagnósticos em ambientes pobres em recursos. Estes testes devem ser: (i) economicamente acessíveis (*Affordable*), (ii) sensíveis (*Sensitive*), (iii) específicos (*Specific*), (iv) de fácil utilização (*User-friendly*), (v) rápidos e robustos (*Rapid and Robust*), (vi) independentes da utilização de equipamentos (*Equipment-free*), e (vii) acessíveis a quem deles precisa (*Delivered to those in need*), o que corresponde à sigla “ASSURED”. Embora o baixo custo continue a ser uma prioridade, os principais mercados estão a exigir maior sensibilidade e especificidade nos ensaios de diagnósticos rápidos. A utilização de papel nos biossensores para diagnóstico ou monitorização da saúde permite potencialmente a aproximação às características atrás indicadas [5].

Os biossensores em papel podem ser divididos em três categorias: testes de tira (*dipstick*), testes de fluxo lateral (LFA) e dispositivos de análise de microfluídica em papel (μ PAD). Os testes *dipstick* são os mais simples já que são baseados na imersão da amostra de uma tira de papel com reagentes pré-depositados. O melhor exemplo deste tipo de biossensor é o teste de análise de urina [17]. Os testes LFA são dispositivos que também têm os reagentes armazenados mas a amostra depositada move-se através de um fluxo lateral, num percurso predefinido na membrana porosa. Os LFA apresentam maior flexibilidade em relação aos testes *dipstick* pois promovem o contacto de uma mesma amostra com diversos reagentes, em instantes diferentes. Podem ser utilizados vários formatos como o de sanduíche, o competitivo ou o de multideteção. As principais desvantagens deste formato de biossensor são a impossibilidade de obter uma análise quantitativa rigorosa e uma capacidade limitada de multideteção de diferentes analitos [18]. Os μ PAD resolvem esses problemas porque integram as vantagens do papel, enquanto material, com as da microfluídica, enquanto tecnologia. Requerem um baixo volume de amostra para obter análises múltiplas e quantitativas. Os dispositivos μ PAD podem utilizar vários tipos de detecção, entre os quais óptica simples, através de leitores de microplacas, quimioluminescente, electroquímica e piezoresistiva. Alguns destes métodos requerem o uso de equipamentos externos complexos para leitura de resultados, o que impossibilita os objectivos pretendidos. Contudo, para detecção óptica, foi sugerida a utilização de uma câmara digital, ou mesmo uma câmara integrada num *smartphone*, de maneira a obter os resultados das análises dos biossensores [18 - 20]. A detecção colorimétrica é provavelmente a melhor opção para este tipo de dispositivos, devido aos resultados poderem ser observados a olho nu, sem uso de equipamento adicional [5].

1.2.2 Ensaio de fluxo lateral

A tecnologia básica dos ensaios de fluxo lateral (LFA, *lateral flow assay*) foi descrita pela primeira vez na década de 1960, mas a primeira aplicação comercial foi um teste de gravidez caseiro de *Unipath's Clearview* lançado em 1988. Desde então, esta tecnologia tem sido empregue para desenvolver uma vasta e crescente gama de testes para aplicações clínicas, veterinária, agrícola, indústria de alimentos, água, contaminantes e ambientais [10, 21].

Normalmente, estes testes são usados para diagnósticos médicos ou uso em laboratório. A aplicação mais usual e conhecida é o teste de gravidez em casa, no entanto os testes rápidos

baseados em sensores de derivados de papel (nitrocelulose, acetato de celulose) estão disponíveis para uma ampla gama de aplicações, incluindo: testes de HIV, de malária, da gripe aviária, de drogas de abuso, de fertilidade, de doenças respiratórias, entre outros. Os testes clínicos podem ser utilizados com urina, saliva, sangue ou amostras de fezes [10, 22]. No diagnóstico de doenças, a detecção precoce é essencial para que um tratamento seja bem-sucedido. Ao utilizar dispositivos de microfluídica baratos baseados em papel, podem ser feitos diagnósticos acessíveis a todos e de resultado rápido [8].

Os testes de fluxo lateral com base nos princípios da imunocromatografia são dispositivos simples destinados a detectar a presença ou ausência de um analito alvo na amostra, sem a necessidade de equipamento especializado e dispendioso, de forma qualitativa ou quantitativa. São altamente engenhosos podendo provar detecções do tipo “sim/não” de uma larga escala de analitos [2, 11]. É possível fazer diversas variações destes testes, mas todos eles têm em comum a formação de um complexo entre um reagente detector ligado a partículas coloridas (que migram na corrente da amostra) e um reagente de captura que está ligado à membrana na posição da linha de teste. É também viável medir a intensidade da linha de teste para determinar a quantidade de analito na amostra [23].

Estes dispositivos apresentam alta sensibilidade e selectividade, na maioria dos casos, estas características são alcançadas pela combinação de cromatografia em camada fina, diminuindo o uso de analitos específicos, e pela marcação do analito ou do elemento de reconhecimento. Podem ser utilizados para determinar vários alvos, incluindo ácidos nucleicos (NALF, *Nucleic Acid Lateral Flow*), proteínas, enzimas, células microbianas e compostos orgânicos [10, 12]. Para os ensaios de ácidos nucleicos, a disponibilidade de bons iniciadores durante o processo de amplificação é indispensável. No formato NALF, as sondas complementares são normalmente hibridadas com os fragmentos de amplificação. Esta amplificação, realizada normalmente através da reacção de polimerase em cadeia (PCR), é feita muitas vezes antes do processo cromatográfico [10].

Os imunoenaios de fluxo lateral pode ser subdivididos em dois tipos principais: directos (ou seja, ensaios do tipo “sanduíche de anticorpos”) e competitivos (isto é, inibidores). Qualquer um dos ensaios consiste tipicamente numa série de segmentos que se juntam e são suportados por uma placa de apoio, dentro de uma caixa de plástico. Estes segmentos incluem a zona de amostra, o conjugado, a membrana de reacção (local onde ocorre a detecção) e a

zona de absorção. Os testes referidos podem ser constituídos por diversos materiais ou por um só material funcionalizado por zonas [3, 18].

Estes dispositivos envolvem a deposição de biomoléculas que se ligam de modo específico aos alvos a reconhecer nas linhas de teste como se observa na Figura 1.3. Depois de secas, é depositada uma amostra na extremidade do dispositivo correspondente à zona de deposição dessa amostra. Esta etapa é frequentemente seguida por adição de uma solução tampão para facilitar o fluxo capilar. Pode haver ainda uma zona de conjugação, entre o local de deposição da amostra e as linhas de teste do dispositivo, onde é colocado um outro analito (geralmente utilizam-se nanopartículas de ouro (AuNP)) que se ligará à amostra. Com o percorrer do fluxo ao longo do dispositivo haverá interacção entre a amostra-analito e entre as biomoléculas-alvos específicas, na linha de teste. Pelo menos duas linhas são projectadas: a linha de teste e a linha de controlo. Na linha de teste, o reconhecimento entre um alvo e a amostra originará um resultado positivo. Caso não ocorra reconhecimento, designa-se por resultado negativo. A resposta positiva na linha de controlo confirma a validade do dispositivo [3].

Podem ser projectadas mais linhas de teste no dispositivo para permitir que sejam feitos testes de multianálitos. O líquido movimenta-se devido a forças de capilaridade do material, mas para manter um fluxo contínuo, existe uma zona de absorção que se encontra na extremidade oposta do dispositivo. Depois de passar pelas zonas de reacção, o fluido entra no material poroso final, onde este actua como um recipiente de resíduos. Quando o dispositivo engloba uma zona de absorção, a quantidade de amostra pode ser maior, resultando num aumento da sensibilidade. Na maioria das vezes são usados filtros de celulose [10, 24]. A zona onde a amostra é depositada também pode ser impregnada com, por exemplo, proteínas, detergentes, potenciadores de viscosidade e sais de tampão [10].

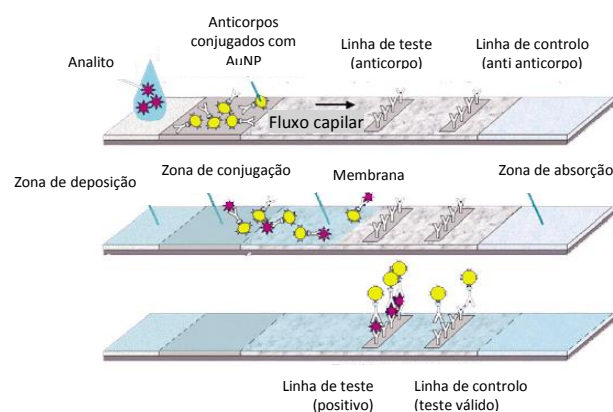


Figura 1.3: Arquitectura de um ensaio de fluxo lateral, adaptado [21].

Os testes demoram pouco minutos a revelarem os resultados. Geralmente há uma correlação entre tempo e sensibilidade - testes mais sensíveis podem precisar de mais tempo para a revelação. Uma outra vantagem deste formato de teste em comparação com outros ensaios é a simplicidade do teste - tipicamente requerem pouca ou nenhuma pre-preparação das amostras ou dos reagentes [19].

1.3 Microfluídica

A microfluídica é uma ciência multidisciplinar, sobre a construção de dispositivos em tamanho micro ou mini, para contenção e escoamento de fluidos [25]. Apresenta diversas vantagens sobre as tecnologias convencionais sobretudo na redução do consumo de reagentes, do tempo de obtenção de resultados e da simplicidade da sua análise. Estas, associadas à facilidade de produção em massa tornam a microfluídica muito atractiva. Actualmente encontra-se presente nos domínios da biologia, química, medicina e materiais.

O comportamento dos fluidos numa escala microscópica rege-se por forças diferentes da macroscópica. Um efeito muito importante é a elevada relação superfície-volume, pois qualquer reacção química na microescala é acelerada. Na análise das propriedades físicas de um microsistema é importante ter em conta os factores de escala que expressam a variação de quantidades físicas em função do tamanho do sistema ou do objecto em estudo, mantendo quantidades como tempo, pressão e temperatura constantes. Deste modo, determinadas forças que têm grande factor de impacto macroscopicamente tornam-se menos influenciáveis a uma escala microscópica. À escala dos sistemas *lab on a chip*, as forças volúmicas (inércia ou gravidade) tornam-se muito pouco significativas, enquanto as forças de superfície tornam-se dominantes (tais como a tensão superficial e a viscosidade) [22, 26].

A microfluídica deu os seus primeiros passos na análise química através de ensaios de cromatografia, onde factores como a pequena quantidade de amostras e reagentes necessários, separações e detecções com alta resolução e sensibilidade, baixo custo e resultados num curto intervalo de tempo são determinantes [25]. Comercialmente já existem diversos dispositivos que utilizam a microfluídica com sensores de leitura de resultados e módulos de pré-preparação das amostras a analisar (*lab on a chip*). Estes sistemas apresentam

vantagens para a sua aplicação no desenvolvimento de testes POC eliminando a necessidade de métodos convencionais utilizados em laboratórios de países desenvolvidos.

Os testes POC tornaram-se comuns nos países desenvolvidos, mas também necessários nos países em vias de desenvolvimento pois permitem reduzir o número de deslocações aos serviços clínicos e, conseqüentemente, as despesas médicas, para além de providenciarem meios de rastreio em regiões sem acesso a infra-estruturas médicas e hospitalares [27]. Os sistemas têm de ser baratos, precisos, fiáveis e robustos de maneira a serem utilizados em contextos médicos e sociais, próprios de países em vias de desenvolvimento, nomeadamente por uma detecção portátil, no local e em tempo real [8, 28, 29].

1.3.1 Microfluídica em papel

A microfluídica em papel é uma técnica recente que utiliza papel como substrato. Neste são impressas microestruturas para criar complexas funções microfluídicas, nas quais o volume é controlado no interior do papel. O papel é um material orgânico muito barato, acessível e compatível com a grande maioria das aplicações químicas, bioquímicas e médicas. Para além disso, a rede fibrosa que o constitui permite o transporte de líquidos através de forças capilares [2]. Sabe-se que a taxa de penetração de um líquido num tubo por acção capilar é directamente proporcional ao raio do capilar, ao ângulo de contacto e ao rácio entre a tensão de superfície e a taxa de penetração, enquanto a viscosidade é inversamente proporcional ao comprimento do percurso já preenchido pelo líquido [30]. Logo, quando a aderência do líquido às paredes do capilar, na presença do ar, excede a coesão do próprio líquido, este tende a espalhar-se pelo sólido. A capacidade que os fluidos têm de se movimentarem ao longo de um canal, mesmo contra a força da gravidade, ou por indução de um campo magnético é conhecida como o fenómeno de capilaridade [31].

A condução dos fluidos é realizada pela rede de fibras do papel, dispersas aleatoriamente, que criam espaços livres e que se comportam como tubos capilares. Através da pressão capilar, os líquidos são conduzidos sem necessidade de aplicar uma força externa, de modo autossuficiente. O manuseamento de líquidos no papel é conseguido pela construção de canais hidrofílicos, onde os líquidos são conduzidos por acção capilar, delimitados por regiões hidrofóbicas em que as propriedades do papel estão alteradas de modo a impedirem a propagação do fluxo. O papel, dependendo do seu processo de fabrico, é um material

hidrofílico cuja dimensão dos poros criados pela malha de fibras de celulose permite o fluxo de soluções aquosas por capilaridade [32 - 34].

As vantagens da utilização do papel como elemento de microfluídica são o facto de ser um substrato muito barato, portátil, abundante e de fácil utilização, compatível com uma grande variedade de químicos e aplicações biomédicas, e por ter a capacidade de transportar líquidos apenas por acção de forças de capilaridade [32 - 34]. Pode ainda servir de base a várias reacções bioquímicas sem contaminações cruzadas. Além disso, a diminuição da dimensão das zonas de reacção minimiza o consumo de reagentes dispendiosos e de amostras limitadas. Estas vantagens tornam a tecnologia de microfluídica em papel cada vez mais interessante, para aplicação sobretudo em países com poucos recursos [35]. Estes dispositivos em papel proporcionam um novo conceito com novas capacidades de bioanálise, tais como os múltiplos ensaios, capacidade de armazenar e misturar reagentes e analisar volumes controlados de amostra [2]. As desvantagens do uso de papel em sistemas de microfluídica prendem-se com a complexidade do estudo do fluxo de uma solução em canais completamente aleatórios (formados pela disposição de fibras de celulose que compõem a estrutura do papel) que dificulta também a própria padronização de canais, e com a influência da humidade e da temperatura na condução de fluidos no papel [36, 37].

No fabrico de dispositivos de papel, a escolha de técnicas e materiais que atendem aos critérios de baixo custo, simplicidade e eficiência do processo de produção, precisam de ser tidos em conta. Existem várias técnicas e processos que envolvem a modificação química e/ou deposição física que poderiam ser usados para ajustar as propriedades do papel. Desta forma, o papel torna-se disponível para outras modificações ou utilização directa de uma variedade de aplicações, incluindo indústria alimentar e química [8, 38]. Actualmente, das técnicas mais utilizadas, destacam-se a fotolitografia, o tratamento a laser e a deposição de PDMS (polidimetilsiloxano) que proporcionam um bloqueio físico dos poros no papel, a serigrafia e impressão a cera que depositam uma substância hidrófoba à superfície, o tratamento por plasma que modifica quimicamente a superfície das fibras, ou o simples corte do papel [24, 25].

Podem ser impressos padrões de cera sólida na superfície do papel, seguidos de um aquecimento para a derreter e impregnar, formando canais bem definidos por milímetros de

espessura. Este método de impressão de padrões a cera no papel é caracterizado pela sua simplicidade, velocidade de produção (5 a 10 minutos) e ser amigo do ambiente [35].

Esta técnica é preferencial no caso de fabrico em larga escala de sensores, devido aos poucos passos envolvidos na formação de barreiras hidrofóbicas, quando comparado com a fotolitografia [8]. O tempo de duração da impregnação da cera sobre o papel depende da temperatura utilizada. O processo de aquecimento permite que a cera penetre vertical e horizontalmente na matriz do papel. O facto de a cera espalhar verticalmente, confina o fluxo da solução pela região desejada. No entanto, devido à natureza da matriz de fibras, o papel tende a alinhar a cera na horizontal em vez de na vertical. Como resultado, a cera espalha-se mais rapidamente na horizontal, o que causa uma linha mais larga comparada com a original (quando a cera é aplicada). Depois da modelação dos canais pelo papel, o passo final no fabrico dos dispositivos é a adição de reagentes para os diversos ensaios [8, 38 - 40].

A taxa de fluxo capilar é outro parâmetro importante para a microfluídica baseada no papel, sendo definida como a velocidade de migração de uma amostra, ao longo do comprimento do dispositivo. É essencial no desempenho do ensaio devido à concentração efectiva da substância a analisar, presente na amostra, ser inversamente proporcional ao quadrado da variação da taxa de fluxo. Esta taxa de fluxo é crítica na obtenção de sensibilidade constante, dependendo da localização da linha de teste. Quando a linha de teste é colocada mais afastada da entrada, o analito demorará mais tempo a chegar a esta. O tempo do fluxo capilar está inversamente relacionado com a taxa de fluxo e está implicitamente relacionado com o desempenho do ensaio. O tamanho e distribuição dos poros são parâmetros importantes na selecção de materiais porosos para a construção destes dispositivos [3].

Estes dispositivos são compatíveis com soluções aquosas (a vários pH), soluções ácidas e básicas, de tal maneira que não atravessam a barreira hidrofóbica, mesmo com grande excesso de fluido. As soluções de ácidos e bases fortes podem dissolver o papel, caso sejam deixadas durante longos períodos de tempo (dias). No entanto não são compatíveis com solventes orgânicos, nomeadamente xilenos, acetonas, cloreto de metileno, álcoois, entre outros, porque destroem a barreira hidrofóbica. Já no caso do diclorometano e da acetona, sabe-se que lavam a maioria do corante da cera, juntamente com a frente de solvente, mas que após evaporação do mesmo, a barreira hidrofóbica ainda permanece intacta. Esta permeabilidade pode surgir como novas oportunidades para outros ensaios experimentais [39].

1.4 Bionanotecnologia

1.4.1 Conceitos Gerais

A Nanotecnologia é a ciência que estuda as aplicações tecnológicas de materiais à escala nanométrica e corresponde a uma área de interface entre várias disciplinas científicas [41]. O desenvolvimento das nanotecnologias e das nanociências proporcionaram novas descobertas e aplicações extremamente promissoras para os materiais em escala nanométrica. Assim, foi possível criar uma nova classe de materiais com novas propriedades, que não se encontram à escala macroscópica, denominados nanomateriais. Estes apresentam propriedades distintas devido ao tamanho e área de superfície, especialmente evidentes para dimensões entre 1 e 100 nm [42, 43].

A Bionanotecnologia surge como a área de interface entre a Nanotecnologia e a Biotecnologia. A base da bionanotecnologia está na conjugação entre os materiais usados na nanotecnologia, como por exemplo as nanopartículas metálicas com biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, anticorpos) [41].

1.4.2 Nanopartículas

As nanopartículas tendem a apresentar propriedades distintas daquelas que o mesmo material apresenta na forma à macroescala. São estruturas intermédias entre os materiais e as estruturas atómicas ou moleculares. Na natureza existem diversos tipos de nanopartículas que apresentam propriedades únicas de elevado interesse, como nanotubos de carbono, pontos quânticos (*quantum dots*) e nanopartículas metálicas [43].

1.4.2.1 Nanopartículas metálicas

Um qualquer material tem propriedades físicas constantes e independentes do seu tamanho, no entanto à escala nanométrica são observadas propriedades dependentes do tamanho. Isto acontece devido ao aumento da contribuição de átomos à superfície e consequente aumento da área superficial das nanopartículas, comparativamente aos materiais à macroescala [44, 45]. Estas propriedades são determinadas pelo tipo de movimento que os electrões realizam no espaço em que estão confinados. Nos metais, os electrões estão altamente deslocalizados

no espaço, ou seja, estão menos confinados devido ao desaparecimento da separação entre as bandas de condução e as bandas de valência, dando assim ao metal as suas propriedades condutoras [46].

As propriedades das nanopartículas metálicas diferem das propriedades do mesmo material à macroescala. Por exemplo, o ouro é amarelo mas uma suspensão de nanopartículas de ouro sintetizadas por via coloidal apresenta cores entre vermelho, azul ou roxo, dependendo do tamanho. A diversidade de cores observada para estes materiais está relacionada com as oscilações dos electrões de condução, em ressonância com a luz incidente, denominada ressonância plasmónica de superfície (SPR). A formação desta ressonância plasmónica de superfície dá-se através do campo eléctrico da radiação incidente que irá induzir a formação de um dipolo na nanopartícula (Figura 1.4). Existe uma força restauradora que tenta compensar este dipolo, de modo a que apenas uma única frequência de ressonância corresponda a esta oscilação colectiva de electrões dentro da nanopartícula [47].

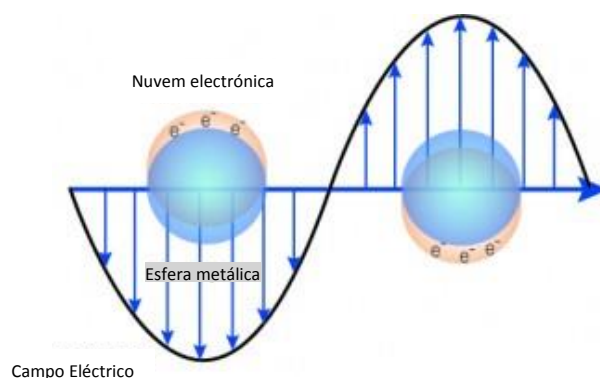


Figura 1.4: Esquema representativo da interação de radiação electromagnética com uma nanoesfera metálica, adaptado [48].

Para as nanopartículas metálicas, a frequência da plasmónica situa-se na zona visível do espectro UV (entre 200 e 800 nm) [49] levando a uma forte absorção nesta zona, o que provoca uma intensa coloração destas suspensões coloidais. A posição e a forma da banda plasmónica de superfície no espectro UV/Visível dependem de factores como o tamanho e forma da nanopartícula, interações entre as mesmas e do índice de refração do meio [46, 47, 50 - 52].

A interacção entre nanopartículas é, provavelmente, o factor que mais influência tem sobre a banda da plasmónica. À medida que diminui a distância entre nanopartículas em suspensão, a

banda da plasmónica vai sofrendo desvios para comprimentos de onda maiores, ficando esta completamente alargada. Quando a separação entre as nanopartículas é muito pequena, comportam-se como nanopartículas de grandes dimensões e devido às interações dipolo-dipolo contíguas, adaptando a forma de um filme de metal contínuo, acabam por perder a absorção no espectro UV/Visível [47]. O índice de refração do meio também altera ligeiramente a banda SPR devido a interações com a superfície da partícula. Com o aumento do índice de refração, esta sofre um ligeiro aumento de intensidade e um desvio de poucos nanómetros [50, 51, 53 - 55].

Uma das principais dificuldades em sintetizar nanopartículas metálicas é a obtenção de suspensões coloidais estáveis, dado que possuem uma elevada energia superficial, favorecendo a imediata agregação para a formação de ligações metal-metal. De modo a evitar a agregação, a preparação de sistemas coloidais é efectuada normalmente na presença de espécies denominadas estabilizadores, como o citrato de sódio, que adsorvem sobre as superfícies das nanopartículas, formando uma camada auto-organizada que impede a coalescência [56].

1.4.2.2 Nanopartículas de ouro (AuNP)

As nanopartículas de ouro são conjuntos de átomos de ouro (entre 3 e 1×10^7 átomos) que possuem propriedades interessantes, como comportamento espectral ajustável e facilidade de funcionalização com biomoléculas como anticorpos ou DNA. Por estas razões as AuNP têm sido exaustivamente estudadas para a utilização na biomedicina, especificamente na produção de ensaios de reconhecimento molecular altamente sensíveis, específicos e simultaneamente económicos. Estas partículas pode ser facilmente sintetizadas por redução de um sal de ouro e funcionalizadas com oligonucleótidos modificados com tiol, resultando naquilo que é conhecido como Au-nanossonda. Podem ser utilizadas numa grande variedade de estratégias de detecção para o reconhecimento de sequências de DNA ou RNA específicas [57 - 59].

As propriedades que apresentam interesse biotecnológico, como área específica de superfície, viscosidade e comportamento de agregação, são influenciadas pelo seu tamanho. A agregação das partículas provoca um deslocamento da banda SPR para comprimentos de onda mais elevados (600 nm) e uma mudança de cor para azul. Este é o processo pelo qual duas ou mais partículas se agrupam (agregam), mas não se fundem numa única partícula. As AuNP encontram-se estabilizadas por uma camada superficial de iões que mantêm uma carga fixa de

igual sinal, promovendo a repulsão electrostática mantendo-as afastadas (cineticamente estáveis). No entanto, por adição de um electrólito, a força iónica do meio é aumentada, atenuando a repulsão electrostática entre as partículas e a suspensão coloidal passa a ser cineticamente instável, originando a agregação [54].

As estratégias de detecção baseiam-se tipicamente na interacção entre as biomoléculas (por exemplo anticorpos) ligadas a nanoestruturas e as moléculas alvo às quais se ligam especificamente. A molécula alvo actua como uma ponte entre várias nanopartículas, resultando esta interacção numa mudança no sinal óptico mensurável, devido à agregação. Este método é conhecido por *cross-linking* [60]. Também é conhecido o método *non-cross-linking* em que a agregação é induzida pela adição de um terceiro elemento (por exemplo sal) à solução. Neste caso, quando não existe a molécula alvo complementar, o sal existente no meio promove a agregação das nanopartículas ligadas a biomoléculas [16].

1.4.2.3 Síntese e determinação da concentração de AuNP

Existem diversos métodos de preparação de nanopartículas de ouro que resultam em nanopartículas de diferentes formas e tamanhos. O método mais comum foi introduzido em 1951 por *Turkevich*, em que se utilizam soluções aquosas onde o ião citrato é o agente redutor de ácido cloroáurico (HAuCl_4), (redução de Au^{3+} para Au^0) e estabilizante coloidal por intermédio de repulsões electrostáticas. Apesar de inicialmente este método ter estado limitado a nanopartículas com cerca de 20 nm, posteriormente foi adaptado a sínteses de nanopartículas com tamanhos médios de 16 a 147 nm, variando-se a razão entre o reagente de ouro e o agente estabilizador/redutor. A ligação do ião citrato à superfície da nanopartícula é relativamente fraca, facilitando possíveis reacções de substituição [61, 62]. As suspensões de AuNP com cerca de 20 nm de diâmetro apresentam coloração vermelha e uma banda plasmónica de superfície situada a 520 nm (Figura 1.5).

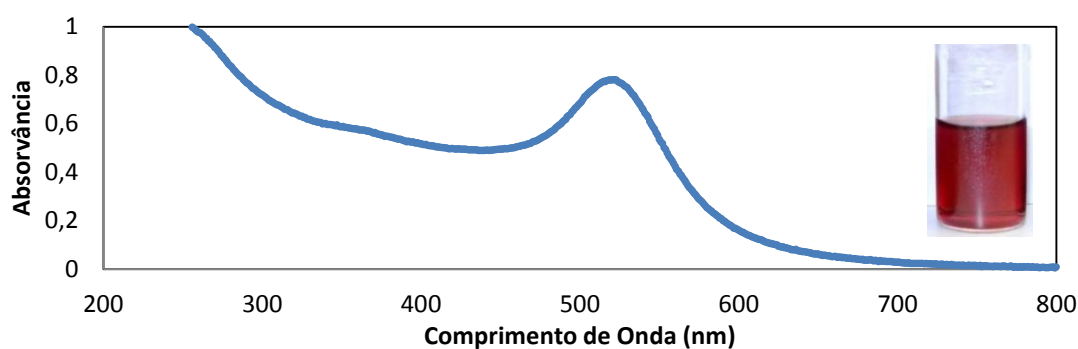


Figura 1.5: Espectro de UV/Visível de uma solução de AuNP e fotografia de uma suspensão de AuNP.

Algumas técnicas utilizadas na caracterização de nanopartículas são a microscopia electrónica de transmissão (TEM) que transmite uma imagem “tipo sombra”, da amostra observada e com a qual é possível aferir acerca do diâmetro das nanopartículas e a *dynamic light scattering* (DLS) acoplada ou não a potencial zeta que permite saber se a suspensão colóide se encontra ou não estável. Através da espectrofotometria de UV/Visível de nanopartículas em suspensão é possível calcular o tamanho e a concentração das mesmas [62].

O método desenvolvido por Haiss et *al.* [63] permite determinar a concentração e o diâmetro a partir do espectro UV/Visível, calculando a razão entre a absorvância do máximo da banda SPR e a absorvância a 450 nm. Cada diâmetro de AuNP estudado por este método tem uma razão de $Abs_{SPR}/Abs_{450\text{ nm}}$ respectiva. O comprimento de onda de 450 nm é importante pois a absorvância não é influenciada por efeitos de dispersão de luz, provocada por agregados de nanopartículas. Esta absorvância que apenas tem em conta os efeitos da redução do ouro, tem um valor de coeficiente de extinção molar definido para cada um dos valores de diâmetro estudados. Assim, após a determinação do diâmetro é possível calcular a concentração a partir do valor de absorvância a 450 nm e do coeficiente de extinção molar respectivo para o diâmetro determinado [63].

1.4.2.4 Estabilidade e funcionalização de AuNP

A solução de AuNP é uma solução coloidal em que as partículas estão estáveis numa fase líquida. As AuNP encontram-se dispersas no meio líquido devido às interacções electrostáticas repulsivas entre elas, provocadas pelo agente de revestimento. As AuNP sintetizadas pelo método de redução com citrato (CIT) estão revestidas por estas moléculas que lhe conferem carga negativa à superfície, havendo assim a repulsão necessária à sua estabilização.

A estabilidade coloidal de uma solução de nanopartículas pode ser alterada pelo aumento da força iónica e pela alteração do pH do meio. O aumento da força iónica do meio leva ao aumento da quantidade de iões que irão competir, com as AuNP, pelas moléculas de água responsáveis pela solvatação destas. Ao diminuir a solvatação das AuNP, as cargas negativas à superfície ficam disponíveis para serem canceladas por parte dos catiões adicionados à solução. As AuNP para poderem estar estabilizadas numa solução têm que possuir um agente de revestimento para haver a necessária repulsão entre nanopartículas. No entanto o agente de revestimento não tem necessariamente que ser aquele que é conferido durante a síntese.

O citrato é um agente de revestimento muito lábil e facilmente substituído por outros agentes, dependendo da aplicação das AuNP [50, 64]. A funcionalização das nanopartículas é feita tendo em conta a grande afinidade dos grupos tiol (sulfidriolo) para o ouro [65, 66]. Assim, a maioria dos agentes de revestimento para aplicações biotecnológicas são moléculas tioladas de forma a garantir uma ligação forte entre o agente de revestimento e as AuNP [50, 65].

A aplicação das AuNP em métodos clínicos tem sido amplamente estudada [59] utilizando anticorpos conjugados, otimizados para a detecção de antígenos de microrganismos, responsáveis por doenças infecciosas em amostras de sangue do paciente [67 - 68].

Devido ao seu tamanho relativamente pequeno, as partículas de ouro coloidal, podem ser depositadas em elevado volume no dispositivo de teste. Outra vantagem de utilizar o ouro coloidal é o de ter uma maior intensidade de cor em comparação com outras partículas. Em ensaios de microfluídica em papel e nitrocelulose, a viabilidade da utilização de detecção baseada em nanopartículas foi demonstrada com metabolitos e agentes bacterianos, no diagnóstico de doenças, como o HIV, a malária, a tuberculose (requerendo amplificação prévia por PCR de ácidos nucleicos específicos) e em aplicações de monitorização ambiental [3, 8]. As nanopartículas de ouro também são utilizadas em métodos clínicos na libertação controlada de fármacos e medicamentos. A libertação é localizada especificamente nos tecidos afectados, aumentando a eficiência do tratamento e diminuindo os problemas de toxicidade de certos fármacos e medicamentos [69, 70].

A utilização de proteínas conjugadas directamente com AuNP também tem sido alvo de intenso estudo, devido à interacção electrostática AuNP-proteína, ou pela ligação covalente entre o grupo tiol das cisteínas presentes na proteína [71 - 74]. No entanto, este tipo de ligações entre proteína e AuNP não é muito favorável pois uma ligação covalente pode criar tensão na estrutura da proteína levando à desnaturação, alterações conformacionais ou perda da actividade [71, 74 - 77].

Assim foram estudadas moléculas que actuassem como agentes de revestimento e ligandos intermédios entre as AuNP e as proteínas. Das moléculas estudadas, destacam-se os pequenos péptidos e os alcanotióis. Os pequenos péptidos podem ser uma sequência peptídica curta (cerca de 5 aminoácidos, por exemplo), em que o resíduo que faz a ligação com a AuNP é uma cisteína, devido à afinidade dos grupos tiol [77]. A cisteína é tipicamente seguida por uma alanina e uma leucina que ao possuírem cadeiras laterais hidrofóbicas irão permitir o rearranjo

dos péptidos na superfície das AuNP através de interações hidrofóbicas intermoleculares. O resíduo na extremidade oposta à AuNP é um resíduo carregado de forma a garantir tanto a estabilidade das nanopartículas em solução, como a interacção com outras biomoléculas [78]. Dos alcanotióis destaca-se o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), que é uma molécula muito utilizada em técnicas de conjugação de AuNP com proteínas. O grupo tiol, numa das extremidades da molécula, liga-se covalentemente às AuNP e o grupo carboxílico, na outra extremidade, confere uma carga negativa uniforme à superfície das nanopartículas, o que possibilita interacções electrostáticas com as biomoléculas (Figura 1.6) [65].

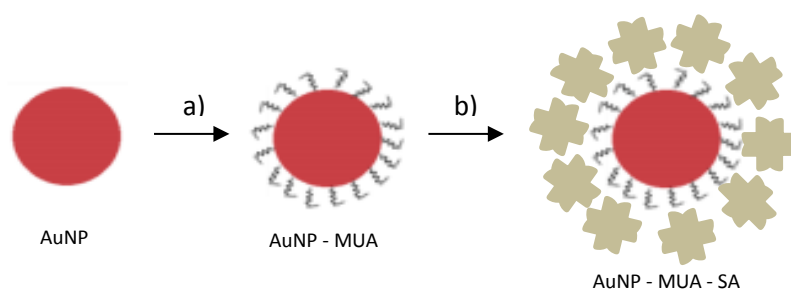


Figura 1.6: Esquema representativo de AuNP a) revestidas com ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e b) funcionalizadas com estreptavidina (SA), formando um bionanoconjugados.

As nanopartículas de ouro conjugadas com proteínas (bionanoconjugados) têm sido analisadas quanto à interacção da proteína com a nanopartícula (que permite determinar e compreender o mecanismo de interacção de forma a controlar a conjugação [65 - 81]) ou com a utilização do conjugado em aplicações biotecnológicas como biossensores [71, 72, 74]. Após a formação dos bionanoconjugados é necessário provar efectivamente a conjugação entre os dois componentes. Existem várias técnicas para provar esta conjugação, como espectroscopia de UV/Visível ou electroforese em géis de agarose [81, 82].

1.5 Tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect

Devido à necessidade emergente de testes de diagnóstico, incluindo moleculares, cada vez mais rápidos, precisos e economicamente acessíveis, com importância extrema em países com poucos recursos, as tecnologias e engenharias da actualidade têm apresentado novas alternativas de diagnóstico. Surgiram assim neste contexto as tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect que abrangem uma ampla gama de diagnósticos [83 - 85].

1.5.1 Princípio de funcionamento das tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect

As tiras Milenia® Hybridetect são tiras genéricas de testes rápidos qualitativos, passíveis de serem adaptadas ao desenvolvimento de testes de diagnóstico para diversas doenças. Funcionam pela tecnologia de fluxo lateral, utilizando nanopartículas de ouro, para a detecção simultânea de um ou dois analitos diferentes (proteínas, anticorpos ou ácidos nucleicos), que têm de ser duplamente marcados com FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) e biotina ou digoxigenina. É assim necessário preparar duas soluções específicas na utilização destes testes antes da sua utilização. A solução A contém um detector (por exemplo anticorpos ou sondas específicas) marcado com FITC, que se liga ao analito a detectar (solução B; por exemplo proteínas ou ácido nucleico complementar à sonda, respectivamente), marcado previamente com biotina e/ou digoxigenina.

A mistura das soluções anteriores (amostra), contendo complexos duplamente marcados com FITC e biotina ou digoxigenina, é depois colocada em contacto com a tira comercial, por imersão desta na mistura. Na tira, os complexos ligam-se a anticorpos anti-FITC conjugados com nanopartículas de ouro (Figura 1.7), que se difundem depois ao longo da tira, por capilaridade. Os complexos, ligados a nanopartículas de ouro, ficarão depois imobilizados nas respectivas linhas de teste via ligação da biotina ou digoxigenina aos seus respectivos ligandos imobilizados nessas linhas (por exemplo estreptavidina ou anticorpo anti-DIG, respectivamente), formando uma banda de cor vermelho-azulada devido à acumulação das AuNP. As partículas de ouro que não forem capturadas serão absorvidas no final da tira comercial por um suporte de absorção [86, 87].

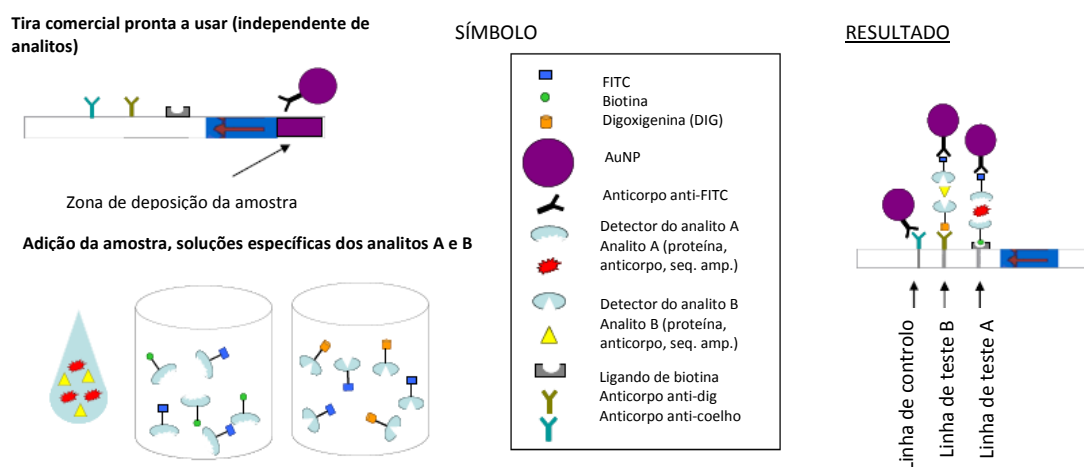


Figura 1.7: Representação esquemática da estrutura e funcionamento da tira comercial Milenia® Hybridetect, adaptado [86 - 87]

1.6 Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa curável, causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). Segundo a Organização Mundial de Saúde, permanece como a infecção mais grave do mundo, sendo responsável por cerca de 1,4 milhões de mortes e 8,7 milhões de novos casos, só em 2011 [5, 16]. Além disso, também tem havido um ressurgimento da doença em todo o mundo por causa do aumento nos estados imunocomprometidos causados pela SIDA, regimes de quimioterapia ou terapias imunossupressoras [88]. Apesar de estarem disponíveis no mercado tratamentos eficazes para combater a infecção, continua a ser um grave problema de saúde mundial. As micobactérias, incluindo as causadoras de tuberculose, apresentam a característica de serem bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), podendo resistir a desinfetantes fracos e ao ácido gástrico com a capacidade de sobreviver em estado latente durante várias semanas. O isolamento de uma micobactéria do tipo BAAR implica geralmente a identificação da sua espécie de modo a aferir se pertence ao MTBC [89].

Tipicamente, a tuberculose afecta os pulmões (TB pulmonar) mas pode também afectar outros órgãos (TB extrapulmonar). A doença pode ser transmitida por via aérea (tosse, espirro ou expectoração) através da expulsão de bactérias por pessoas infectadas ou por disseminação de gotículas de saliva em suspensão no ar. Em geral, apenas uma pequena parcela das pessoas infectadas com o agente patogénico desenvolve a doença, no entanto, sem tratamento a taxa de mortalidade é elevada. Actualmente a prevenção da tuberculose baseia-se na vacina *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). No entanto, para a tuberculose não existe imunidade humoral (adquirida por via natural ou artificial) com a produção de células B de memória, pelo que a vacina torna-se relativamente ineficaz contra a TB pulmonar. Em contrapartida, é extremamente eficaz para prevenir formas graves de tuberculose em crianças, como a meningite tuberculosa [60].

A maioria dos casos de tuberculose ocorre na Ásia e em África, continentes com zonas pouco desenvolvidas economicamente (Figura 1.8). Nestes locais, a incidência pode chegar a atingir os 1000 casos por 100 mil habitantes. A TB, como infecção oportunista é a principal causa de morte nas pessoas que vivem com HIV. Dos 9,4 milhões de casos de TB em 2008, 1,4 milhões estavam co-infectados com o HIV (cerca de 15 %) [90].

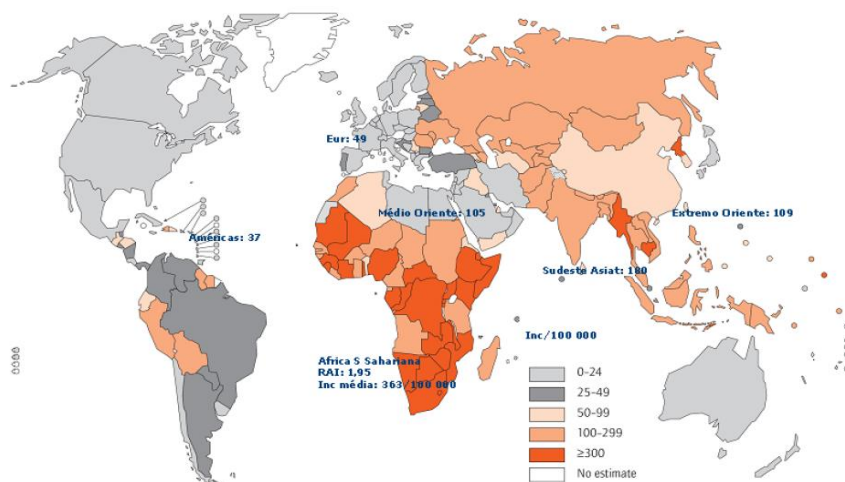


Figura 1.8: Incidência de tuberculose estimada por 100 mil pessoas em 2008, segundo a OMS [90].

A União Europeia com uma incidência de 16,7 em cada 100 mil habitantes em 2008, é uma região de baixa incidência de tuberculose (21 dos 27 países têm menos de 20 casos em cada 100 mil habitantes) e continua a diminuir ao ritmo médio de 3,3 % ao ano. Portugal, com 24 casos em cada 100 mil habitantes em 2009, menos 8 % que em 2008, tem um decréscimo anual médio de 7,3 %, consistente nos últimos 7 anos, mas ainda não passou para baixo da fasquia, que lhe conferia a categoria de país de baixa incidência [90].

A multirresistência das micobactérias responsáveis pela TB aos antibióticos usados no seu controlo é uma ameaça global. Atinge todos os países, mas com maior incidência nos países de Leste da Europa e Sudeste Asiático. Se não houver uma intervenção enérgica, constituirá uma nova epidemia potencialmente intratável [90].

Estima-se que emergem 440 mil novos casos de TB multirresistente em cada ano, dos quais, menos de 10 % são diagnosticados, e muito menos são tratados adequadamente, vindo a morrer 150 mil pessoas por ano. Contudo, em mais de 65 % dos casos de TB não há factores de risco identificados. Este facto traduz ainda a existência de um elevado potencial de transmissão. Globalmente, a ameaça da tuberculose continua a aumentar, agravada pelo fenómeno da multirresistência, difícil de controlar devido à extrema escassez de meios nos países mais afectados [90].

A transmissão de *Mycobacterium tuberculosis* depende do número de microrganismos expelidos, da concentração destes no ar, do intervalo de tempo em que o indivíduo exposto respira ar contaminado e do estado imunológico do mesmo, quando exposto ao agente [89]. O

controlo da tuberculose depende do diagnóstico precoce e do início do tratamento adequado, de modo a reduzir as fontes de infecção e o risco de transmissão e reduzir a morbilidade e mortalidade causada pela tuberculose. O diagnóstico clínico é muitas vezes difícil, devido aos sintomas inespecíficos e frequentemente insidiosos e a apresentação radiológica pode ser muito diversificada.

Actualmente, o diagnóstico de tuberculose ainda depende de exames microbiológicos, os quais requerem um manuseio cuidadoso e um transporte rápido da amostra [89]. O método mais utilizado mundialmente para diagnóstico de TB é a baciloscopia, desenvolvido há mais de cem anos, no qual as bactérias são observadas microscopicamente em amostras de expectoração. Este método é relativamente insensível e não pode ser utilizado para identificar a forma extrapulmonar. Em países com acesso a infra-estruturas especializadas, a TB é diagnosticada via crescimento de culturas do agente, que é actualmente o método mais sensível [91].

O desenvolvimento de metodologias simples e baratas, capazes de identificar a tuberculose, sobretudo em países com poucos recursos, é de extrema relevância para um diagnóstico atempado e eficiente. O diagnóstico molecular desta infecção tem como objectivo reduzir o tempo de laboratório de semanas para dias, sendo ainda necessário o recurso a técnicos especializados e métodos sofisticados de laboratório intensivo. Um diagnóstico POC é crucial para o controlo de TB e para a identificação e caracterização rápidas do agente, que podem permitir aos pacientes terem tratamento imediato [16].

As técnicas bioquímicas (adenosina desaminase) e moleculares (testes de amplificação de ácidos nucleicos) fornecem uma informação rápida ao clínico. Na maioria dos casos, o diagnóstico de tuberculose assenta numa combinação adequada de diferentes métodos de diagnóstico, o que requer tempo até se obter um resultado. Mesmo assim, em alguns casos não se consegue obter confirmação microbiológica, sendo o diagnóstico e o tratamento estabelecidos com base na suspeição. Deste modo, os meios complementares (hemograma, radiologia, estudo micobacteriológico, identificação de estirpes, testes de diagnóstico rápidos, sensibilidade aos antibacilares, estudo bioquímico de amostras e anatomia patológica) de diagnóstico desempenham um papel primordial em termos de abordagem desta doença [92].

1.6.1 Estado de arte na detecção de tuberculose

Devido à maioria dos casos de novas infecções serem registados em países em vias de desenvolvimento, onde os laboratórios clínicos e pessoal treinado para o diagnóstico e tratamento eficaz são escassos, é necessário um teste simples, rápido, de baixo custo e de elevada precisão para detecção no local, por forma a fazer um melhor controlo de gestão e da infecção dos pacientes. Depois de mais de um século de desenvolvimento de métodos de diagnóstico, desde a identificação de tuberculose em 1882, uma plataforma de diagnóstico sensível, rápida e de baixo custo continua a ser um desafio. Em pacientes com tuberculose, um espécime de biópsia positivo para baciloscopia em combinação com coloração de Ziehl-Neelsen é uma maneira rápida, acessível e barata para a obtenção dos resultados em minutos, em áreas de incidência elevada. No entanto, este método de identificação tem uma sensibilidade de apenas cerca de 50 % (34 - 80 %). Especialmente em pacientes infectados pelo HIV, pelo que métodos de diagnóstico adicionais são necessários para confirmar os resultados negativos. As culturas de bacilos podem ser consideradas como um método padrão para a detecção de tuberculose num centro clínico. No entanto, o resultado não pode ser obtido de imediato porque o bacilo requer 3 a 6 semanas de crescimento em meios de cultura sólidos e 9 a 16 dias, utilizando meios mais rápidos de cultura líquida.

Os métodos baseados em PCR podem ser usado para identificar os agentes de TB com uma sensibilidade e uma precisão de 95 e 92 %, respectivamente [88]. Uma questão que impede a plena aplicação destes métodos em locais remotos pode ser a necessidade de preparação de amostras de DNA, de que depende a amplificação por PCR, sendo estes também processos relativamente demorados e dispendiosos. No entanto, estão a ser feitos esforços no sentido de otimizar estes sistemas de diagnóstico molecular por meio da remoção dos passos limitantes [16].

Uma chave para prevenir a propagação da TB é o desenvolvimento de diagnósticos que permitam identificar rapidamente o agente da doença para que se possa tratar adequadamente ou, em alguns casos graves, colocar em quarentena um paciente. Tem havido grandes avanços tecnológicos nesta área, mas o diagnóstico de doenças infecciosas ainda é maioritariamente baseado em tecnologias dos anos 50 que são limitadas pela velocidade da análise, necessidade de trabalhadores qualificados, por um limiar de detecção inadequado e incapacidade de detectar agentes infecciosos múltiplos. Para combater a propagação desta e de outras doenças infecciosas, tanto investigadores como clínicos necessitam de ferramentas

precisas para a detecção e identificação de agentes patogénicos, para que possam avaliar a gravidade da doença de um paciente e aconselhar o tratamento adequado. O dispositivo ideal de diagnóstico precisa de ser um sistema de detecção de baixo custo, portátil, altamente sensível e que possa diferenciar vários agentes patogénicos [60]. A OMS desenvolveu um plano de acção que enuncia os componentes essenciais para o combate à TB, entre os quais se encontra o desenvolvimento de novos dispositivos de diagnóstico POC [93]. Os avanços recentes no diagnóstico molecular da tuberculose melhoraram a capacidade de detecção do agente patogénico, mas a maioria destes métodos ainda requer técnicos especializados e equipamento laboratorial complexo e dispendioso. Um diagnóstico POC é crucial para o controlo da tuberculose, pois a identificação e caracterização rápida do agente patogénico permitem um tratamento precoce, passo vital para o combate desta pandemia [60].

1.6.2 Lab on Paper: detecção de tuberculose

Neste sentido, foi objectivo neste trabalho desenvolver um dispositivo para detecção e identificação de micobactérias causadoras de tuberculose, com base no conceito das já existentes tiras comerciais Milenia® Hybridetect, mas utilizando o papel como substrato. Este funciona por fluxo lateral, utilizando também AuNP, para a detecção simultânea de diferentes analitos. O reconhecimento molecular é feito através da hibridação de uma sequência de DNA conhecida - sonda (complementar ao alvo, uma sequência de inserção IS6110, específica do complexo *M. tuberculosis*) - com uma sequência de DNA desconhecida (o analito alvo). Este dispositivo LFA é composto por uma linha de teste onde é detectado o alvo específico e uma linha de controlo que permite validar o teste, como apresentado na Figura 1.9.

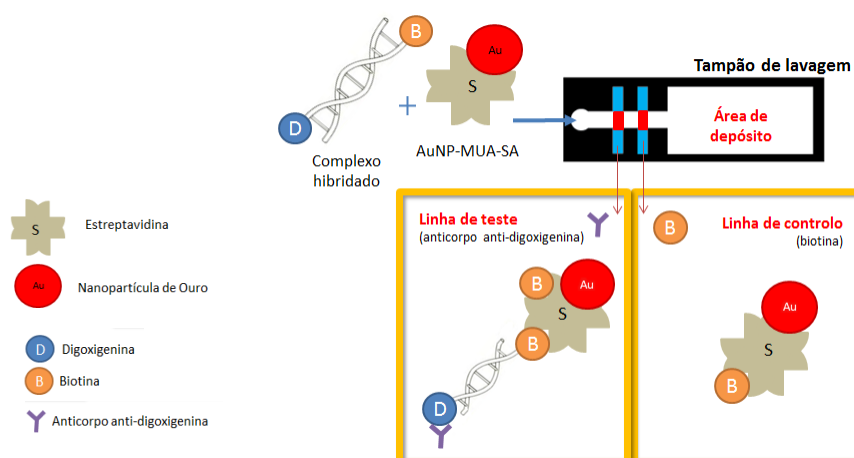


Figura 1.9: Representação esquemática dos componentes biológicos do biossensor e da sua ligação: B - biotina; D - digoxigenina; S - estreptavidina e Au - Nanopartículas de ouro.

Devido à importância de cada um dos marcadores biológicos utilizados neste sistema, houve a necessidade de se estudar cada componente individualmente, quanto às suas características e modo de funcionamento.

1.6.2.1 Estreptavidina

A estreptavidina (descoberta pela primeira vez em 1989 por *Hendrickson et al* [94]) é uma proteína tetramérica, purificada a partir da bactéria *Streptomyces avidinii*, com cerca de 52,8 kDa. Apresenta uma afinidade extremamente elevada para a biotina ($K_d = 10^{-14}$ a 10^{-16} M), sendo considerada como uma das interações não covalentes mais fortes conhecidas na natureza [95]. Esta proteína é utilizada sobretudo na biologia e bionanotecnologia, devido à resistência do complexo biotina-estreptavidina, para solventes orgânicos, desnaturantes, detergentes e extremos de temperatura e pH [96 - 98].

Apresenta um comprimento total de 159 resíduos, sendo necessária a remoção dos terminais N e C para a ligação à biotina. A estrutura secundária de cada monómero é composta por oito cadeias antiparalelas β -, que se dobram de forma a criar uma estrutura terciária antiparalela em barril β -. A ligação da estreptavidina com a biotina ocorre nas extremidades de cada barril β -, em conjunto com o Trp120 (triptofano na posição 120 da cadeia), de forma a conservar a subunidade adjacente. Assim, cada uma das subunidades contribui para o local de ligação da subunidade adjacente (Figura 1.10) [98, 99].

1.6.2.2 Biotina

A biotina ($C_{10}H_{16}O_3N_2S$), também conhecida como vitamina B7 ou vitamina H funciona como coenzima. É essencial no metabolismo das proteínas e dos hidratos de carbono, tendo como principal função a neutralização do colesterol. É produzida por bactérias do intestino mas pode ser encontrada nas leveduras, arroz integral, frutas e outros substratos [100].

É possível adicionar moléculas de biotina a determinadas proteínas e outras biomoléculas, como o DNA, por um processo conhecido como biotinylation. A biotina exibe duas características que a tornam a “molécula ideal” para se ligar a proteínas e macromoléculas. Além de ser comparativamente mais pequena que as proteínas globulares (o que minimiza a interferência com outras proteínas e proporciona a ligação de várias biotinas na mesma molécula), apresenta na sua configuração um ácido valérico (cadeia lateral) que pode

facilmente ser derivatizado de forma a ser conjugado com outras estruturas químicas, sem afectar a função da ligação biotina-molécula [101]. A biotinação é utilizada para permitir o isolamento, separação ou concentração, no processo e análise de biomoléculas. Este processo torna-se essencial para garantir uma alta eficiência de ligação [102]. Deste modo, a biotinação de um anticorpo primário ou sonda de ácido nucleico é um processo simples em que a biotina é ligada de forma covalente à proteína ou sonda.

1.6.2.3 Interação Proteína - Ligando

A função biológica de muitas proteínas é desencadeada e modulada pela ligação dos ligandos. Por esta razão, o conhecimento do mecanismo de interação proteína-ligando é essencial para uma compreensão detalhada da função da proteína, ao nível molecular. A ligação ao ligando, na maioria dos casos, envolve a formação de ligações não covalentes de superfícies específicas que interagem entre a proteína e o ligando (Figura 1.10). Esta ligação pode ser acompanhada por alterações conformacionais no local da proteína que, por vezes, são propagadas ao longo de toda a molécula. É desejável ter uma maneira de monitorar essas mudanças estruturais para compreender todas as novas propriedades adquiridas pelo complexo.

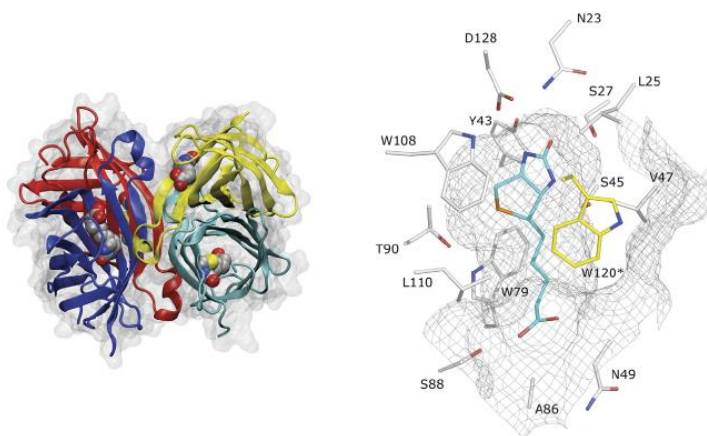


Figura 1.10: Visão geral das propriedades estruturais da estreptavidina. Estruturas de cristalografia de raios-X dos tetrâmeros da estreptavidina (PDB 1mk5). A superfície molecular (1,4 Å) é apresentada a cinza transparente. As quatro moléculas de biotina estão representadas pelas esferas de *Van der Waals* [103].

A forte ligação entre a estreptavidina e a biotina pode ser usada para unir várias biomoléculas entre si, ou a um suporte sólido. São necessárias condições severas para romper a interação estreptavidina-biotina, que muitas vezes desnatura a proteína de interesse a ser

purificada. No entanto, sabe-se que uma curta incubação em água acima de 70 °C irá quebrar reversivelmente a interacção sem desnaturar a estreptavidina, permitindo a reutilização do suporte sólido. A estreptavidina também tem sido utilizada no campo em desenvolvimento da bionanotecnologia com a utilização de moléculas biológicas, tais como proteínas ou lípidos que criam dispositivos/estruturas à nanoescala [96]. A alta afinidade de ligação biotina-estreptavidina, não só oferece vantagens bioanalíticas úteis mas também faz com que este seja um modelo atractivo para estudar interacções proteína-ligando [104].

A estreptavidina não é a única proteína capaz de se ligar à biotina com elevada afinidade. A avidina é a outra proteína notável de ligação à biotina. Originalmente isolada a partir de clara de ovo, a avidina tem apenas 30 % de identidade de sequência com a estreptavidina mas as estruturas secundária, terciária e quaternária são quase idênticas. As funções biológicas da avidina e da estreptavidina ainda foram pouco estudadas, mas sabe-se que a avidina apresenta uma afinidade mais elevada para a biotina em contraste com a estreptavidina, que é glicosilada, carregada positivamente e tem uma maior tendência para a agregação [95, 105].

1.6.2.4 Digoxigenina

A digoxigenina (DIG) é um esteróide encontrado exclusivamente nas flores e folhas das plantas *Digitalis purpurea* e *Digitalis lanata*. O termo '*genin*' no final de digoxigenina, refere-se apenas à parte sem o açúcar da molécula, assim a digoxigenina é a componente esteróide da digoxina - menos o resíduo de açúcar que lhe confere especificidade [94]. Devido ao facto de ser um hapteno (substância não proteica de baixo peso molecular que sozinha não consegue induzir uma resposta imunológica [105]), a DIG pode ser conjugada covalentemente a biomoléculas (proteínas ou ácidos nucleicos), de forma a ser detectada em ensaios futuros.

Geralmente, os anticorpos anti-digoxigenina são utilizados numa grande variedade de imunoensaios biológicos, devido à sua elevada afinidade e especificidade. Podem ser marcados com corantes, enzimas ou compostos fluorescentes, de forma directa ou indirecta, para a visualização e detecção dos resultados.

Capítulo 2

2 Materiais e procedimento experimental

2.1 Materiais

Para o desenvolvimento deste projecto foram inicialmente estudados dois substratos diferentes, com o intuito de escolher o substrato com as características que potenciem o funcionamento dos biossensores. Os substratos analisados foram i) papel de cromatografia Whatman nº1 (Whatman Internacional Ltd) e ii) membranas de nitrocelulose (Blotting membrane, BiotraceTM NT e Lateral flow nitrocelulose FF120HP). A membrana de nitrocelulose, substrato vulgarmente utilizado no fabrico de dispositivos de fluxo lateral, foi avaliada a título de comparação, uma vez que um dos principais objectivos do presente trabalho foi a utilização do papel como substrato para a condução dos fluídos.

Em paralelo, foram utilizadas as tiras comerciais de teste rápido Milenia[®] Hybridetect, para servirem de controlo e para se compreender o funcionamento.

Na realização deste trabalho foi utilizado diverso tipo de material laboratorial como micropipetas, material de vidro, material de corte preciso, placa de aquecimento Heidolph MR Hei-Tec (Schwabach, Germany), exsiccador, entre outros. Utilizou-se um espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian, EUA) para a aquisição dos vários espectros e uma impressora HP Photosmart C3100 series (EUA) para a digitalização e posterior análise, dos resultados obtidos ao longo do projecto.

2.2 Biomoléculas de reconhecimento

Foi utilizado um anticorpo anti-digoxigenina (Roche, Suíça), concentração de 1 mg/mL em tampão PBS 20 mM a pH 7,2 e uma solução de biotina (Sigma Aldrich[®], EUA), dissolvida com concentração de 0,2 mg/mL em água Milli-Q para as linhas de teste e controlo dos testes, respectivamente.

Para a síntese das nanopartículas de ouro foi necessário uma solução de ácido tetracloreáurico (HAuCl₄) (99,99% Sigma Aldrich[®], EUA) a 1 mM e uma solução de citrato de sódio 1% (p/v) (99,99% Sigma Aldrich[®], EUA); para a sua funcionalização utilizou-se ácido mercatoundecanóico (MUA) (95% Sigma Aldrich[®], EUA) a 10 mM em etanol, solução de estreptavidina (SA) (Sigma Aldrich[®], EUA), numa concentração de 1 mg/mL em água Milli-Q, solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Aldrich[®], EUA), numa concentração de 10 mg/mL em água Milli-Q ou em tampão PBS 20 mM a pH 7,2.

2.3 Alvo de reconhecimento

Foi seleccionado como alvo genómico a sequência de inserção IS6110, presente especificamente nos genomas dos membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Para a optimização dos testes, como alvo de reconhecimento para os dispositivos, recorreu-se à utilização de um fragmento oligonucleotídico comercialmente sintetizado, correspondente a uma porção da região IS6110, marcado com biotina (BIO) na sua extremidade 5' (BIO-5'-TGAACCGTGAGGGCATC-3') e, posteriormente, sujeito a uma hibridação com uma sonda de DNA complementar, marcada com digoxigenina (DIG) (DIG-5'-GATGCCCTCACGGTTCA-3'). Nos testes iniciais de optimização dos dispositivos, recorreu-se também, alternativamente, a um fragmento de DNA comercialmente sintetizado e duplamente marcado com biotina e com digoxigenina (DIG-5'-GATGCCCTCACGGTTCA 3'-BIO).

2.4 Tiras comerciais de teste rápido Milenia[®] Hybridetect

O desenvolvimento do teste das tiras comerciais Milenia[®] Hybridetect, adaptado a este trabalho, baseia-se: i) numa reacção de polimerase em cadeia (PCR) de modo a amplificar e marcar com biotina, fragmentos de DNA específicos de espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, neste caso da sequência de inserção IS6110; ii) na hibridação deste fragmento amplificado com uma sonda oligonucleotídica complementar marcada com FITC; iii) mistura de 8 µL do produto da hibridação anterior com 100 µL do tampão fornecido juntamente com o teste comercial; e, por fim, iv) na incubação da tira comercial com a solução anterior durante cerca de 10 minutos.

A amplificação por PCR foi realizada num volume final de 25 μL contendo 9 μL de água bidestilada, 2,5 μL de tampão da polimerase de DNA (10x), 2 μL de MgCl_2 a 25 mM (Bioline, Alemanha), mistura de dNTP (200 μM cada, Invitrogen[®], Reino Unido), 1 μL de *primers* a 20 μM (F3_IS6110: 5'-TCAACCGGAGCCCAG-3' e B3_IS6110: 5'-TTTGCCGCGGGTGGTC-3'), 0,2 μL de *Taq polymerase* 1 U (BIOTAC[®] DNA Polymerase, Bioline, Alemanha) e 5 μL de amostra de DNA (fragmentos de DNA de culturas de *M. tuberculosis*, provenientes de extracção de ácidos nucleicos).

A reacção de amplificação foi realizada num termociclador Tpersonal[®] (Biometra, Alemanha) nas seguintes condições: um período inicial de 5 minutos a 95 °C para desnaturação do DNA e activação enzimática, 35 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 60 segundos a 65 °C e 60 segundos a 72 °C, e um período de 6 minutos a 72 °C para extensão final.

Depois deste passo, os produtos de amplificação foram testados nas tiras Milenia[®] Hybridetect, como descrito atrás e de acordo com as instruções do fabricante. Para o teste do funcionamento do dispositivo comercial foram utilizados fragmentos de DNA alvo amplificados a partir de culturas de *M. tuberculosis* (alvo complementar) e outros fragmentos de DNA de outras espécies não-MTBC (alvo não complementar), para usar como amostra positiva e negativa, respectivamente. Como amostra controlo de contaminações, substituiu-se nas reacções o fragmento de DNA a amplificar por água bidestilada.

A realização destes testes rápidos foi feita no Departamento de Micobactérias do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) em Lisboa.

2.5 Síntese, funcionalização e estabilidade das AuNP

A síntese das nanopartículas de ouro baseia-se no método de redução por citrato previamente descrito por Turkevich *et al* [61] (anexo II). As AuNP foram sintetizadas pela redução de uma solução de HAuCl_4 1 mM com uma solução de citrato de sódio 1% (p/v). A solução de 50 mL de HAuCl_4 foi aquecida num balão de síntese, em refluxo, até à ebulição e, antes de iniciar a redução adicionou-se 5 mL de solução de citrato de sódio 1% (p/v) preparada de fresco (anexo I). O aquecimento foi desligado 15 minutos após a coloração da solução se tornar vermelha e foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente.

Todo o material de vidro utilizado na síntese foi previamente lavado com água-régia (mistura de ácido nítrico com ácido clorídrico uma proporção 1:3) para evitar qualquer tipo de contaminação que eventualmente poderiam resultar em sínteses mal feitas ou agregação por parte das partículas. Após a síntese arrefecida, foi traçado um espectro UV/Visível das AuNP entre 200 e 800 nm e determinado o diâmetro e concentração das mesmas [63].

O revestimento de AuNP com MUA (Anexo I) foi feito adicionando este último à solução de AuNP numa proporção molar de 5000:1 (segundo um estudo realizado no laboratório) e deixando-se a incubar pelo menos 2 horas a 4 °C antes de proceder à funcionalização com estreptavidina.

2.6 Formação e estabilidade dos Bionanoconjugados

2.6.1 Preparação dos Bionanoconjugados de Estreptavidina e AuNP – MUA

Os bionanoconjugados de estreptavidina (SA) e AuNP-MUA foram preparados adicionando à solução de AuNP-MUA, a quantidade adequada de estreptavidina para obter a solução de bionanoconjugados de razão [SA] / [AuNP-MUA] (Anexo I) desejada e deixou-se a incubar a 4 °C durante a noite.

Para tal, a uma solução de AuNP-MUA ($2,5 \times 10^{-9}$ M), adicionou-se estreptavidina, diluída em tampão PBS 20 mM a pH 7,2. Os bionanoconjugados sofrem um processo tripartido de centrifugação e ressuspensão: i) centrifugação 20 minutos a 7500 g a 4 °C, eliminação do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em BSA 10 mg/mL, com 1 hora de incubação a 4 °C protegido da luz, ii) centrifugação 20 minutos a 7500 g a 4 °C, eliminação do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em 250 µL de tampão PBS 5 mM a pH 7,2 e iii) centrifugação 10 minutos a 7500 g a 4 °C, eliminação do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em 250 µL de tampão PBS 5 mM a pH 7,2 para um volume final de cerca de 300 µL. Após a formação dos bionanoconjugados, foi traçado um espectro UV/Visível das AuNP-MUA-SA entre 200 e 800 nm. Todas as centrifugações foram efectuadas numa centrífuga Centurion Scientific K3 Series.

2.6.2 Estabilidade dos Bionanoconjugados por aumento da força iónica

Este estudo de estabilidade dos bionanoconjugados a diferentes concentrações de NaCl foi efectuado adicionando a diferentes tubos, contendo a mesma concentração de bionanoconjugado com a razão [SA] / [AuNP-MUA] pretendida (entre 0 e 50), quantidades determinadas de uma solução de NaCl entre 0 e 2 M (Panreac 99,9 %) de modo a obter na solução a força iónica desejada. Foi feito um espectro de UV/Visível antes e imediatamente após a adição de NaCl e consequente homogeneização.

A síntese, funcionalização e caracterização das nanopartículas de ouro e bionanoconjugados foram executadas no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologias (FCT-UNL) na Caparica.

2.7 Preparação e produção do substrato

O substrato *Whatman Celulose Chromatography Paper Grade 1* foi utilizado em formato A5 (148 x 210 mm) para poder ser directamente colocado numa impressora de tinta de cera. Foi armazenado em ambiente seco e sem qualquer tipo de tratamento antes da sua utilização. A arquitectura das tiras de microfluídica foi projectada no programa de computador *Adobe Illustrator* e posteriormente impressa com tinta de cera na superfície do substrato. Para a impressão utilizou-se a impressora Xerox ColorQube 8570 que utiliza blocos sólidos de cera. Ao fazer a impressão, a impressora aplica um ligeiro aquecimento de modo a fundir a cera pelo papel, com o padrão anteriormente definido. De acordo com Costa *et al* [5], difundiu-se a cera ao longo da espessura do papel, aquecendo este numa placa de aquecimento, a 140 °C durante 2 minutos, de modo a criar uma barreira hidrofóbica para o biossensor, criando canais hidrofílicos por onde se deslocarão as soluções aquosas e ocorrerá a reacção de bioreconhecimento.

O substrato nitrocelulose foi utilizado em formato rectangular (1 x 2 cm) para poder mimetizar um teste de *spot* com a gota colocada no centro do dispositivo. Foi armazenado em ambiente seco e sem qualquer tipo de tratamento antes da sua utilização.

2.8 Fabrico do dispositivo

O dispositivo para detecção de alvos genómicos específicos dos membros do MTBC (Anexo III) foi implementado de modo a reproduzir um teste de fluxo lateral disponível comercialmente (Milenia[®] Hybridetect), utilizando papel Whatman em substituição de nitrocelulose.

A implementação das linhas de controlo e de teste passa pela deposição de reagentes em zonas específicas e bem delimitadas a meio do canal. O facto destas regiões rectangulares com cerca de 1,5 mm de comprimento não estarem delimitadas lateralmente por barreiras hidrófobas, torna mais complexa a deposição dos reagentes. Para resolver esta situação utilizou-se o sistema de interruptores (Figura 2.1), descrito por Li *et al* [33].

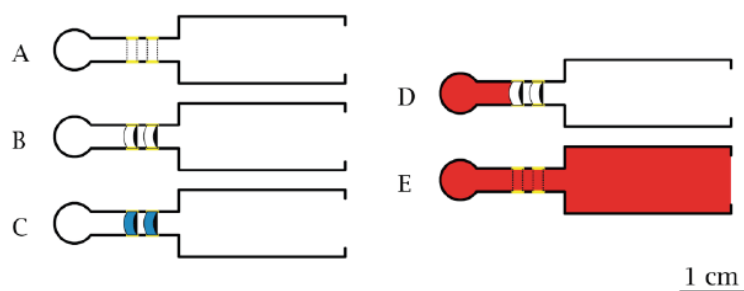


Figura 2.1: Sistema de interruptores de fluxo utilizados para depositar reagentes nas linhas de teste e controlo dos dispositivos, adaptado: A) precisão de cortes; B) interrupção do canal; C) secagem dos reagentes e incubação do papel; D) interrupção do fluxo da solução e E) restabelecimento do fluxo da solução [106].

A precisão das linhas é essencial na revelação do resultado. A concentração dos reagentes numa área bem definida permite mais tarde a correcta sinalização e leitura dos resultados colorimétricos, por contraste com a região circundante. A difusão dos reagentes por uma área para além da sinalizada pode levar a uma redução deste contraste e, conseqüentemente, a uma interpretação incorrecta dos resultados.

2.9 Dispositivo para detecção de alvos genómicos do MTBC

O dispositivo para detecção de alvos genómicos do MTBC (Figura 2.2) foi desenhado tendo como base as tiras comerciais genéricas Milenia® Hybridetect, utilizadas em diversas aplicações de diagnóstico. Os quatro locais essenciais deste biossensor colorimétrico são: 1) local de deposição da amostra (neste caso, para a optimização do teste, uma mistura do oligonucleótido marcado com biotina hibridado com uma sonda de DNA marcada com digoxigenina, descritas anteriormente neste capítulo); 2) local de deposição da estreptavidina conjugada com nanopartículas de ouro; 3) linha de teste (contendo anticorpo anti-digoxigenina) e 4) linha de controlo (contendo biotina).

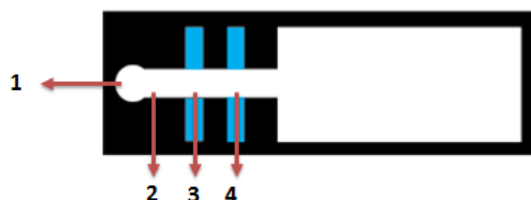


Figura 2.2: Representação esquemática do biossensor com os locais específicos de deposição dos analitos. 1) local de deposição da amostra; 2) local de deposição da streptavidina conjugada com nanopartículas de ouro; 3) linha de teste (com anticorpo anti-digoxigenina) e 4) linha de controlo (biotina).

No caso específico do dispositivo desenvolvido neste projecto, foi necessário juntar os locais 1 e 2, no primeiro sítio de depósito de modo a evitar a inserção de variáveis ainda não estudadas, como o caso da deposição de nanopartículas de ouro sobre o papel. Assim, a mistura da sonda oligonucleotídica marcada com biotina, hibridada com a sonda marcada com digoxigenina e dos bionanoconjugados foi efectuada em solução antes da sua deposição no papel no local indicado pelo número 1 (Figura 2.2).

Na linha de teste foram depositados 5 μ L de solução de anticorpo anti-digoxigenina e na linha de controlo 5 μ L de solução de biotina, ficando o dispositivo a secar na *hotte* durante cerca de 20 minutos. A partir do momento que o biossensor já não está húmido, pode-se realizar o ensaio, pela deposição dos bionanoconjugados e do amplificado de DNA marcado com digoxigenina no início do canal hidrofílico.

Foram também realizados testes de *spot* em nitrocelulose, nomeadamente para confirmar a correcta ligação entre digoxigenina e anticorpo anti-digoxigenina, e entre biotina e estreptavidina conjugada com nanopartículas de ouro. Nestes testes são realizadas as seguintes etapas: i) colocação de 2,5 μ L de solução de analito (anticorpo, biotina, entre outros) sobre um pedaço quadrangular de nitrocelulose; ii) mergulho da nitrocelulose numa solução de BSA a 10 mg/mL durante 5 minutos, para bloquear a ocorrência de eventuais ligações não específicas; iii) após secagem, colocação de 50 μ L de solução de bionanoconjugados de forma a cobrir a zona do analito na nitrocelulose, ficando este a incubar durante 5 minutos e, por fim, iv) lavagem em tampão PBS 20 mM pH 7,2 durante 2 minutos. Entre cada uma das etapas, excepto na colocação de bionanoconjugados, foi necessário esperar cerca de 20 minutos até que o substrato estivesse seco.

Cada um dos testes do dispositivo, independentemente do substrato utilizado, foi repetido pelo menos duas vezes e os resultados obtidos, em papel e/ou em nitrocelulose foram posteriormente observados, utilizando um programa informático gratuito de análise RGB (Image J).

Este dispositivo, desde a preparação do substrato até ao seu fabrico foi desenvolvido no CENIMAT, na Faculdade de Ciências e Tecnologias (FCT-UNL) na Caparica.

Capítulo 3

3 Apresentação e Discussão de resultados

3.1 Caracterização das tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect

3.1.1 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

No decorrer do presente trabalho utilizou-se a microscopia electrónica de varrimento para se compreender a morfologia superficial das tiras comerciais Milenia® Hybridetect (Figuras 3.1 a 3.4). Realizou-se uma análise de SEM a cada uma das partes essenciais da tira de teste (antes ou depois de usar), nomeadamente às nanopartículas funcionalizadas e à membrana antes de usar a tira e às linhas de teste e controlo depois do ensaio.

Para caracterizar o substrato referido na realização deste trabalho foi utilizado o equipamento Carl Zeiss AURIGA Crossbeam SEM-FIB. Utilizou-se o modo de electrões secundários para obtenção das imagens que permitem a caracterização morfológica da superfície do substrato, com uma tensão de aceleração e abertura de diafragma como descrito nas figuras abaixo e uma distância de trabalho entre a amostra e a coluna de SEM de cerca de 5 mm.

Algumas das análises de SEM foram complementadas com análises de Espectroscopia de Raios-X Dispersiva (EDS) de forma a averiguar a composição química da superfície do material (Figuras 3.1 a 3.4). A EDS fornece uma análise química elementar das amostras em estudo. É uma ferramenta do SEM que utiliza um feixe de electrões para excitar a amostra, levando à produção de radiação secundária específica e característica do elemento.

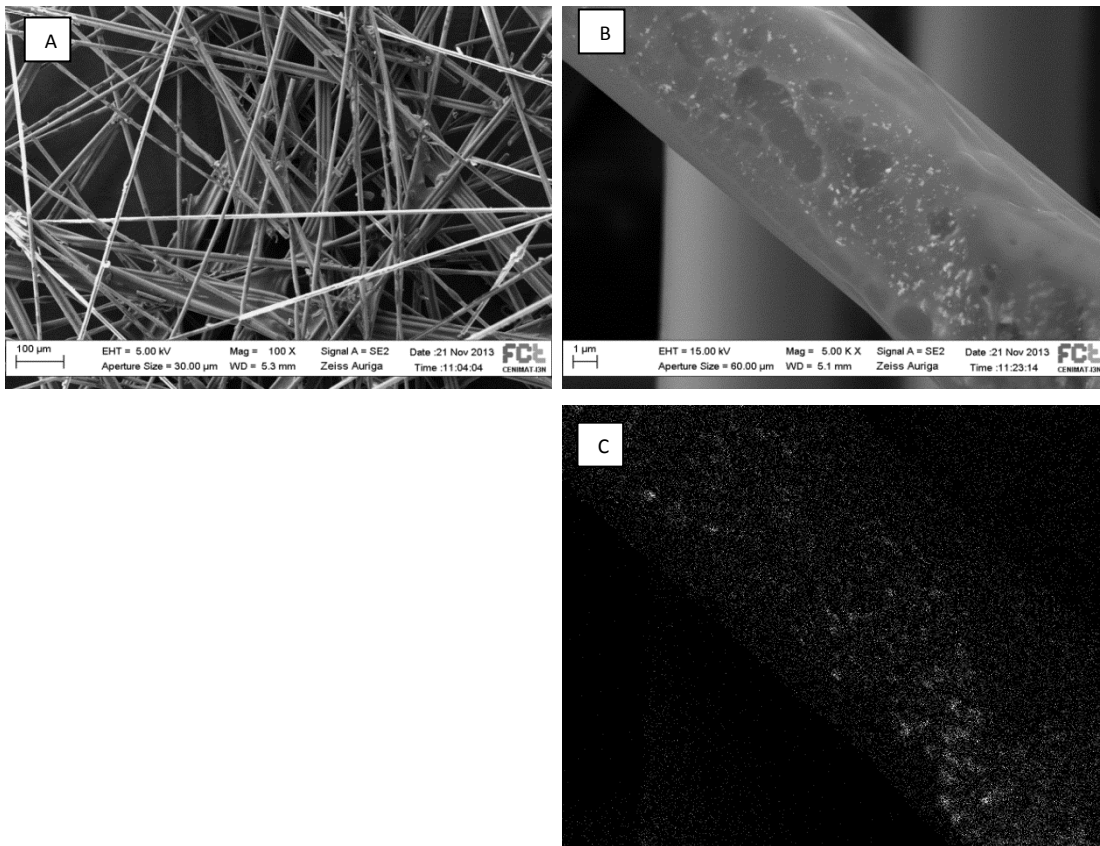


Figura 3.1: Imagens de SEM das AuNP na zona de conjugação das tiras comerciais: A) ampliação de 100x; B) ampliação de 5 Kx e C) Imagem EDS da ampliação B) em que se observa o elemento químico ouro.

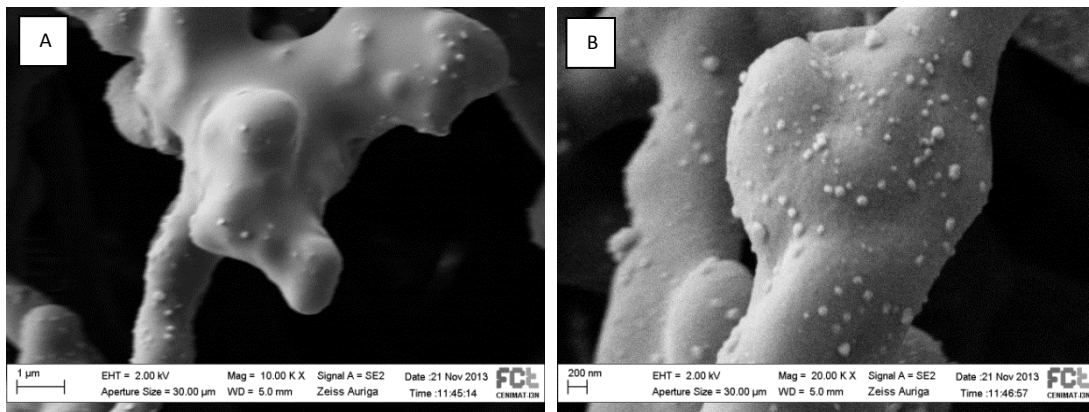


Figura 3.2: Imagens de SEM da membrana de nitrocelulose das tiras comerciais: A) ampliação de 10 Kx e B) ampliação de 20 Kx.

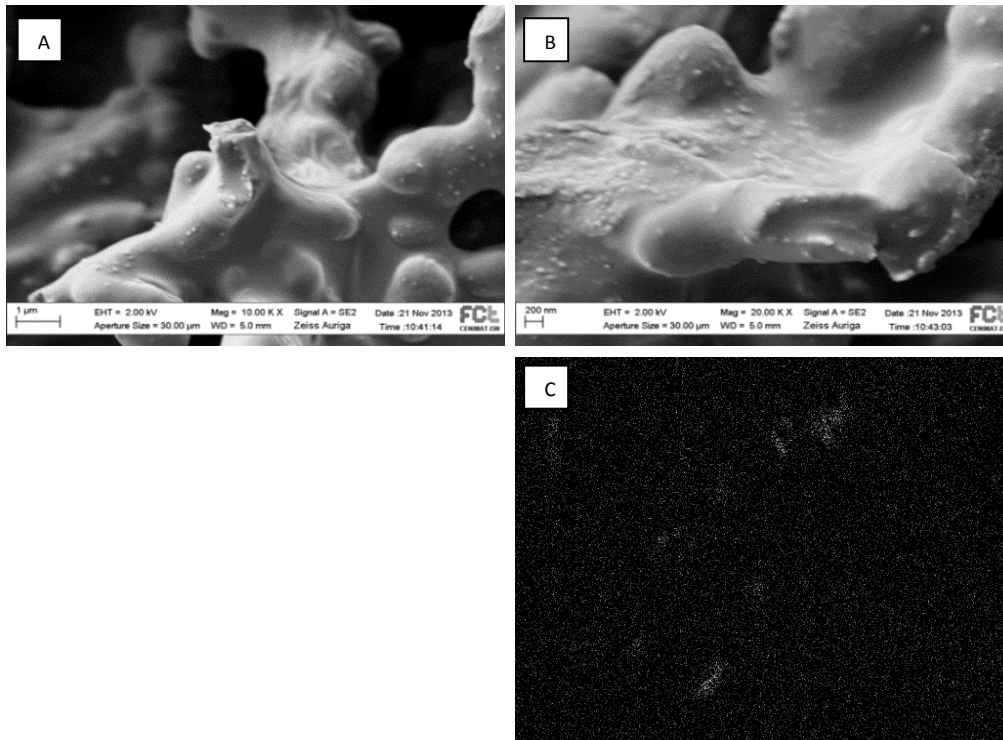


Figura 3.3: Imagens de SEM da linha de teste (após o uso) das tiras comerciais: A) ampliação de 10 Kx; B) ampliação de 20 Kx; C) Imagem EDS da ampliação B) em que se observa o elemento químico ouro.

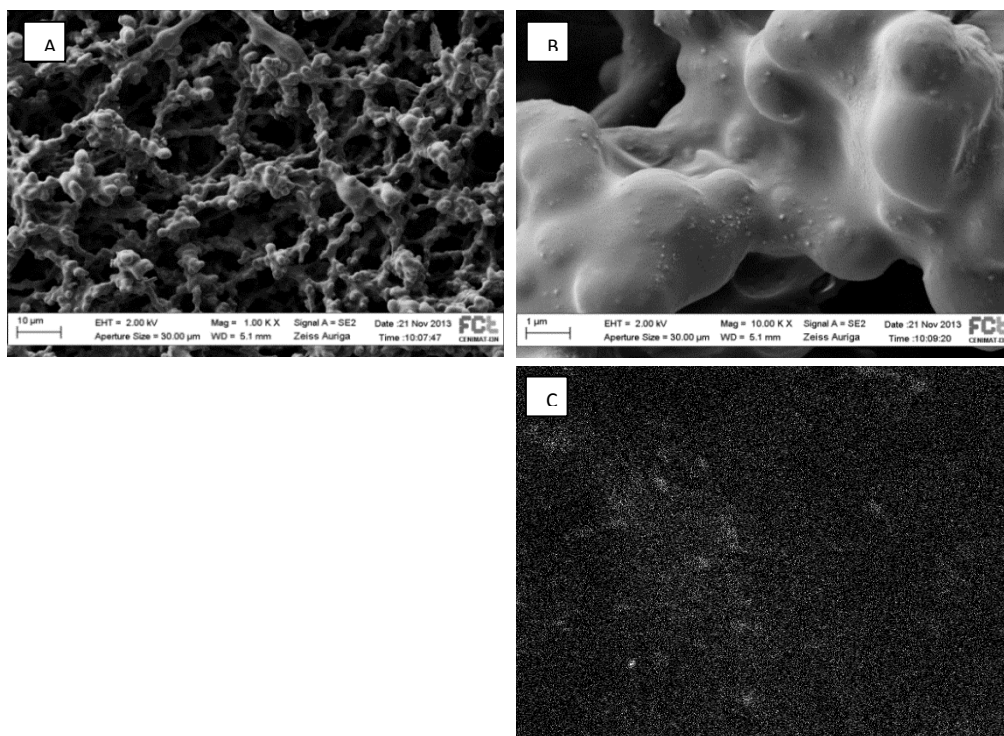


Figura 3.4: Imagens de SEM da linha de controlo (após o uso) das tiras comerciais: A) ampliação de 1 Kx; B) ampliação de 10 Kx; C) Imagem EDS da ampliação B) em que se observa o elemento químico ouro.

Através da análise das imagens anteriores, são notórios dois diferentes grupos de morfologias ao longo das tiras comerciais de nitrocelulose, nomeadamente entre a zona de conjugação e a membrana e linhas de teste e controlo. A zona de conjugação aparenta ser constituída por uma malha fibrosa, possivelmente de origem celulósica. Ao ampliar esta imagem, é possível observar que cada fibra se encontra revestida por inúmeros pontos brilhantes, correspondentes às nanopartículas de ouro, como se verifica na Figura 3.1C. Esta mesma observação pode ser feita para as linhas de teste e controlo, onde seria de esperar encontrar as nanopartículas de ouro. Em contraste, a membrana de nitrocelulose não apresenta nanopartículas de ouro na sua análise. Na Figura 3.5 encontram-se os espectros de EDS das várias partes do teste comercial analisadas

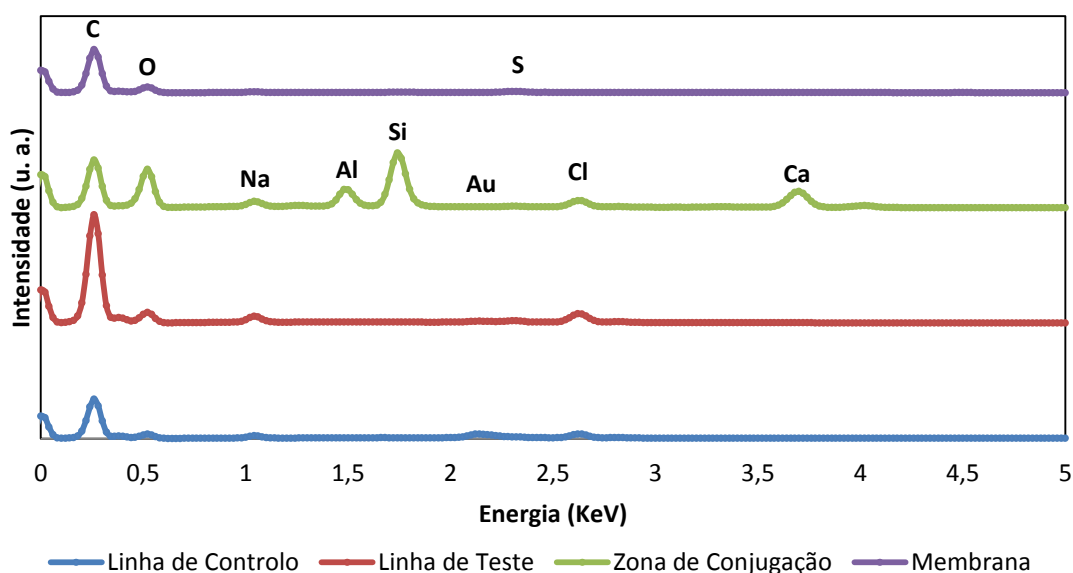


Figura 3.5: Espectros EDS das partes (substratos) da tira comercial Milenia® Hybridetect em estudo.

Numa primeira análise verificou-se que todos os substratos apresentam na sua constituição átomos de carbono ($E = 0,28$ keV) e átomos de oxigénio ($E = 0,53$ keV), provenientes das fibras de celulose. Foram também detectados cálcio ($E = 3,71$ keV), alumínio ($E = 1,50$ keV) e silício ($E = 1,74$ keV), em quantidades muito baixas, que são usados como aditivo no fabrico de papel [106]. A análise EDS detectou também o elemento ouro com picos de energia de $2,2$ keV nas amostras analisadas, excepto a membrana. Além destes elementos, a análise EDS detectou cloro ($E = 2,62$ keV), sódio ($E = 1,04$ keV) e enxofre ($E = 2,31$ keV). No entanto, não fornece informação sobre os compostos formados após conjugação.

3.1.2 Aplicação das tiras comerciais de teste rápido Milenia® Hybridetect

Foi realizado um teste com duas amostras, uma positiva (correspondente a um fragmento da sequência de inserção IS6110 específica do MTBC, amplificado por PCR) e uma negativa (resultante também de uma reacção de PCR usada como controlo negativo), de modo a comprovar o funcionamento das tiras comerciais, segundo estudos anteriormente feitos [107]. Desta forma, mais facilmente se poderá aplicar a estratégia no teste em papel desenvolvido neste projecto.

O resultado pode ser observado assim que terminado o teste (Figura 3.6). Facilmente se concluiu que as tiras comerciais funcionaram correctamente pois em ambas apareceu a linha de controlo. Além disso, apenas na tira onde foi colocada uma amostra positiva apareceu uma segunda linha, mais atrás, característica de um resultado positivo em que ocorre ligação entre o ligando de biotina (estreptavidina) depositado na tira e a biotina, ligada ao complexo com anticorpo anti-FITC e nanopartículas de ouro (referido no capítulo 2). Na Figura 3.7 é apresentado um gráfico que representa o resultado da análise RGB feita a cada uma das tiras anteriormente testadas.

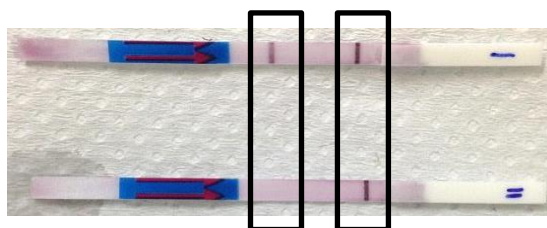


Figura 3.6: Resultado do teste às tiras comerciais Milenia® Hybridetect: amostra positiva (em cima) e negativa (em baixo). O rectângulo da esquerda corresponde à linha de teste e o da direita à linha de controlo.

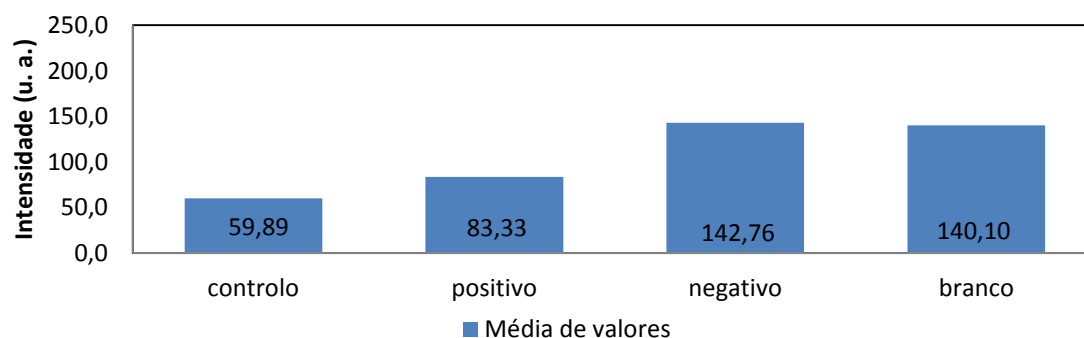


Figura 3.7: Análise de distribuição dos valores de RGB: **Controlo** corresponde à linha de controlo; **Positivo** corresponde à linha de teste na amostra positiva; **Negativo** corresponde à linha de teste na amostra negativa e **Branco** corresponde à nitrocelulose imediatamente a seguir ao autocolante azul que aparece na tira com a indicação do fluxo.

A análise RGB basicamente confirma a leitura visual dos resultados obtidos. Verifica-se que existe uma banda de cor mais intensa na linha de controlo, comprovado pelos valores mais baixos da análise RGB, especificamente o canal verde (complementar ao vermelho), apresentados na Figura 3.7. Os valores da linha de teste são muito semelhantes aos valores do branco no caso do teste negativo comprovando que a ligação não ocorreu. Pelo contrário, a linha de teste positiva apresenta coloração avermelhada, semelhante ao controlo. A diferença de valores entre o controlo e o positivo prende-se pelo facto que existem muitas nanopartículas de ouro livres para ligar ao controlo, como tal, apresenta a cor mais intensa. No caso do positivo, a ligação com o alvo é mais complexa, o que poderá contribuir para que uma menor quantidade de nanopartículas de ouro fique retida na linha de teste.

3.2 Preparação do substrato (papel Whatman nº1)

No que diz respeito à caracterização e preparação do substrato (papel de cromatografia Whatman nº 1), fez-se o estudo da difusão da cera das barreiras hidrofóbicas e o estudo do sistema de interruptores. Na Figura 3.8 pode-se comparar as várias diferenças entre o papel que sofreu difusão da cera e o que não sofreu difusão de forma a perceber a condução das soluções.

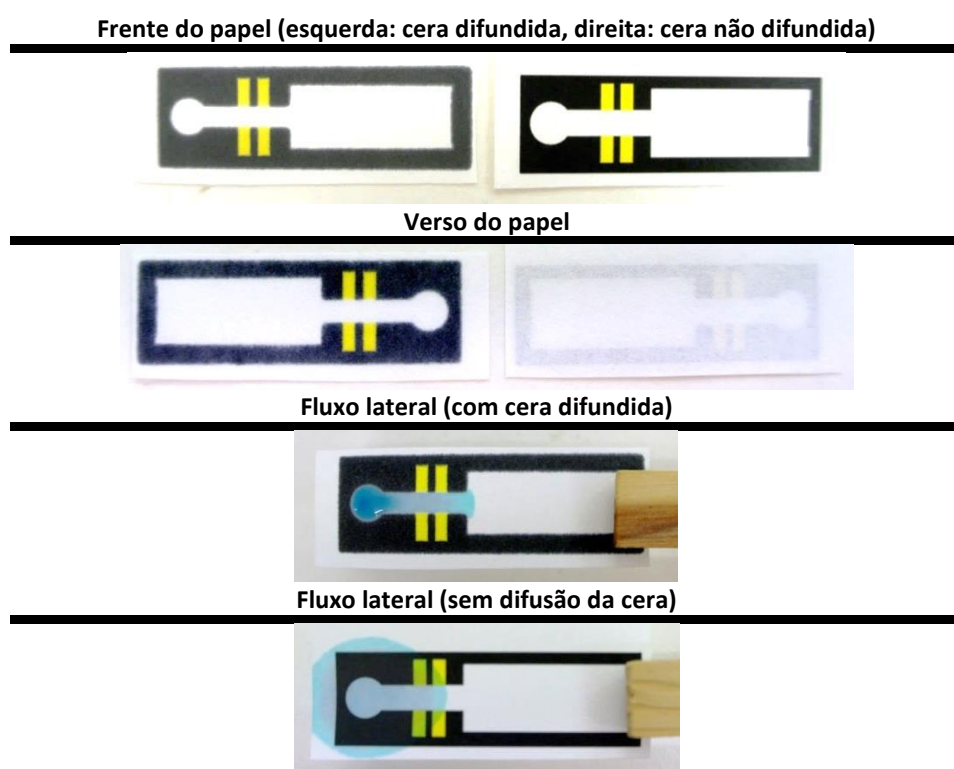


Figura 3.8: Ilustração das etapas de impressão, difusão da cera e efeitos da condução de fluidos pelo substrato.

No estudo da difusão da cera, verifica-se a condução de solução (corante azul) ao longo do dispositivo, no caso da difusão de cera, o que é o expectável no caso dos ensaios de fluxo lateral. No caso de não se difundir a cera, a solução alastra em todas as direcções, nomeadamente para dentro e para fora da barreira (aumentando na largura) e em altura (verificado pelo verso do papel com o canal desenhado).

Os interruptores foram feitos através de cortes precisos com um bisturi. Os cortes feitos são perpendiculares ao canal, na zona assinalada pela cor amarela, que correspondem às linhas de teste e controlo. As linhas são levantadas com a ajuda do bisturi e permanecem elevadas com a ajuda de um clip. Desta forma, é possível interromper o fluxo e o contacto com o canal do dispositivo. É nesta conformação que são depositados os reagentes nas linhas específicas e incubados até estarem completamente secos. Após secagem, as linhas são reposicionadas e o fluxo é restabelecido pelo contacto de ambas as partes do dispositivo de papel. Este sistema encontra-se representado na Figura 3.9.

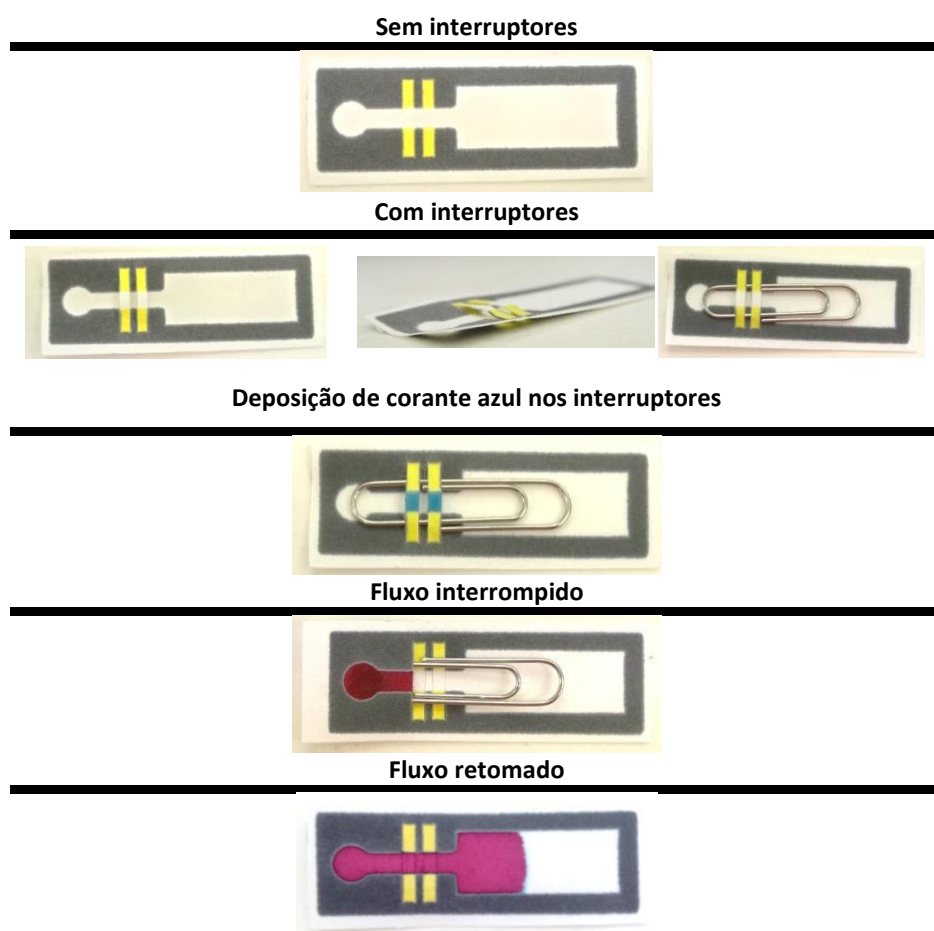


Figura 3.9: Ilustração do sistema de interruptores utilizados na deposição de reagentes nas linhas de teste e de controlo.

3.3 Síntese, caracterização e estabilidade das nanopartículas de ouro por espectrofotometria UV/Visível

Devido ao elevado preço das nanopartículas de ouro comerciais funcionalizadas com estreptavidina, e devido à necessidade de ser preciso um volume maior nesta fase inicial de testes, procedeu-se à síntese laboratorial de AuNP em laboratório, seguido da funcionalização com estreptavidina.

Após a síntese das nanopartículas de ouro (anexo I), as mesmas foram analisadas por espectrofotometria, obtendo-se o espectro de UV/Visível apresentado na Figura 3.10. A solução de AuNP apresenta uma intensa coloração vermelha, acompanhada por uma banda de absorção a cerca de 520 nm denominada de banda de ressonância plasmónica de superfície (SPR), que é dependente da concentração.

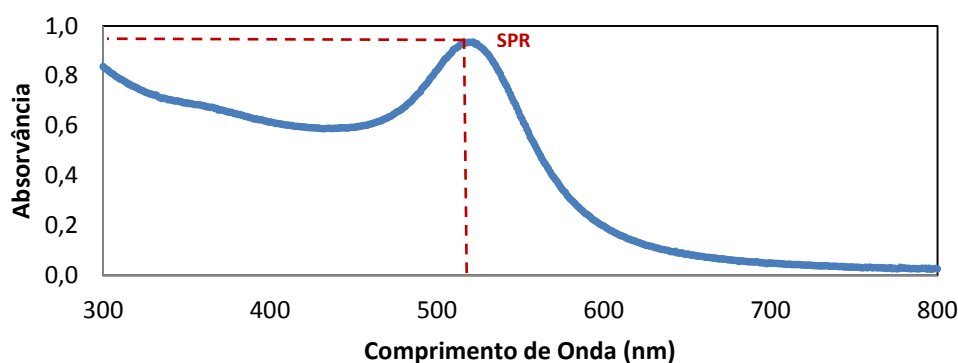


Figura 3.10: Espectro de AuNP obtido após a síntese.

A partir da análise do espectro obtido por espectroscopia de UV/Visível, que relaciona a absorvância com o comprimento de onda, registaram-se as absorvâncias a 450 e 522 nm com valores de 0,593 e 0,934 respectivamente, de forma a quantificar as nanopartículas de ouro (anexo II). Ou seja, determinar o diâmetro aproximado bem como a concentração das mesmas, segundo Haiss *et al* [63]. Assim, utilizou-se o comprimento de onda de 450 nm característico de transições electrónicas associadas ao estado de redução do Au^{3+} a Au^0 e independente da contribuição dos agregados e o comprimento de onda a 522 nm, máximo da banda de SPR.

Sabendo que:

$$\frac{Abs_{522}}{Abs_{450}} = \frac{0,934}{0,593} = 1,575$$

É possível determinar o diâmetro das AuNP recorrendo à tabela 1 que dá origem à equação da recta da figura 2 (ambas do Anexo II), tal como descrito no método publicado [63]. Sabendo que $m = 0,3335$ e $y = 0,7301$ tem-se,

$$y = mx + b \Leftrightarrow 1,575 = 0,3335x + 0,7301 \Leftrightarrow x = 2,534 \rightarrow e^{(2,534)} = \mathbf{12,60 \text{ nm}}$$

Após a determinação do diâmetro das nanopartículas de ouro, pode-se, através da tabela 3 (do Anexo II), verificar o coeficiente de extinção molar a 450 nm para aproximadamente 13 nm, que é $1,39 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Assim, atendendo ao valor da absorvância a 450 nm e ao factor de diluição utilizado (3×), determina-se a concentração das nanopartículas de ouro. Recorrendo à Lei de Lambert-Beer tem-se:

$$Abs_{450} = \epsilon_{450} \times b \times c \times f.d. \Leftrightarrow c = \frac{Abs_{450}}{\epsilon_{450}} \times 5 \Leftrightarrow c = \frac{0,593}{1,39 \times 10^{-8}} \times 3 = 1,28 \times 10^{-8} \text{ M} = \mathbf{12,8 \text{ nM}}$$

A funcionalização é feita, como descrito na parte experimental, adicionando à solução de AuNP uma quantidade molar 5000 vezes superior de MUA de modo a revestir as nanopartículas em solução.

3.3.1 Estudo da funcionalização das nanopartículas de ouro

Apesar de diversos estudos [108 - 110] apontarem uma funcionalização mais eficaz das nanopartículas de ouro quando revestidas com MUA, ainda se estudou a hipótese dessa funcionalização sem este agente de revestimento ou com outro em substituição, nomeadamente BSA (Figura 3.11). A utilização da BSA recai sobre o facto de esta se ligar às nanopartículas de ouro, nos locais onde não ocorreu a ligação com a estreptavidina. Desta forma, toda a molécula se torna mais estável e evitará possíveis ligações inespecíficas.

Após feitos os diversos bionanoconjugados (nanopartículas de ouro revestidas com MUA (AuNP-MUA), nanopartículas de ouro conjugadas com estreptavidina (AuNP-SA), nanopartículas de ouro revestidas com MUA e funcionalizadas com estreptavidina (AuNP-MUA-SA), nanopartículas de ouro revestidas com MUA e funcionalizadas com estreptavidina e BSA (AuNP-MUA-SA-BSA) e nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina e BSA (AuNP-SA-BSA)), foi traçado e analisado o espectro UV/Visível (Figura 3.11).

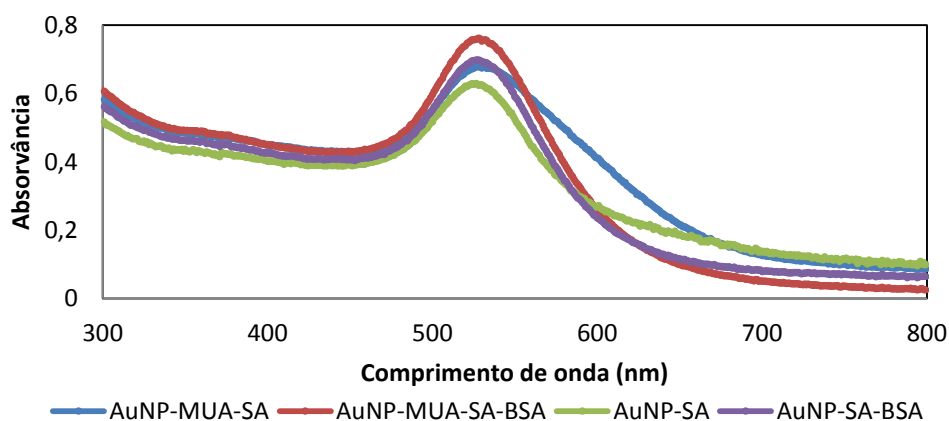


Figura 3.11: Espectro UV/Visível das diferentes funcionalizações estudadas para as AuNP.

Como é possível observar na Figura 3.11, percebe-se que um revestimento com MUA e BSA é mais eficaz do que qualquer uma das restantes alternativas. O comportamento do espectro AuNP-SA (representado pela cor verde na Figura 3.11), apresenta um ligeiro alargamento da banda, em comparação com os outros espectros, bem como um valor de absorvância mais elevado entre os 700 e 800 nm. Este resultado indicia uma solução de AuNP-SA pouco estável e com tendência para um estado agregado. Pelo contrário, para a solução AuNP-MUA-SA-BSA (representado pela cor vermelha na Figura 3.11) observa-se um máximo da banda SPR mais definido e um comportamento de absorvâncias mínimo entre 500 e 800 nm, o que indica para que seja a solução mais estável das realizadas. Quando só existe MUA em solução, nomeadamente para AuNP-MUA-SA (representado pela cor azul), verifica-se que há um desvio de valores significativo entre os 500 e 700 nm que não deveria existir num espectro de uma solução estável de nanopartículas de ouro, como evidenciado na Figura 3.10.

3.3.2 *Dynamic Light Scattering (DLS)*

Para comprovar o diâmetro das nanopartículas de ouro, sintetizadas por via coloidal no laboratório, realizou-se uma análise por DLS. Desta forma, pode-se concluir que o diâmetro calculado por UV/Visível (atrás descrito) é muito próximo do determinado por esta técnica, logo, confirma-se a presença de uma suspensão de nanopartículas de ouro com cerca de 13 nm de diâmetro. Os conjugados analisados encontram-se apresentados na Figura 3.10.

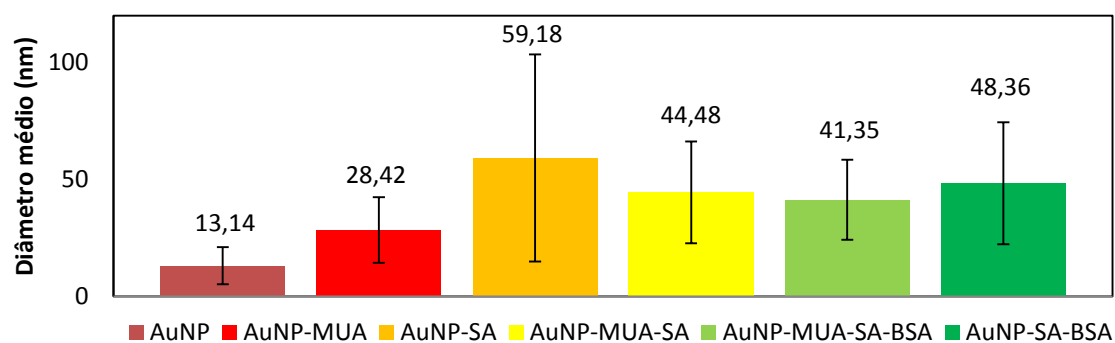


Figura 3.12: Análise da média de diâmetro das nanopartículas de ouro e diferentes conjugados, segundo análise DLS.

Após a leitura do gráfico obtido (Figura 3.12), pode-se concluir que, quer por avaliação UV/Visível, quer por DLS, ambos determinam um valor de diâmetro de cerca de 13 nm para as nanopartículas de ouro sintetizadas em laboratório. Pode-se ainda averiguar acerca do aumento do diâmetro das mesmas, aquando das diversas funcionalizações. Verifica-se que entre as AuNP e AuNP-MUA houve aumento de diâmetro do qual se pode concluir que houve conjugação, como seria de esperar. No entanto, a estreptavidina é uma molécula difícil de caracterizar por DLS devido à sua forma irregular, o que pode levar a medições díspares de diâmetro para a mesma estrutura. Quando a BSA se encontra presente na solução, esta tende a estabilizar a molécula (AuNP funcionalizadas com SA) pelo facto de se ligar aos locais de superfície que não foram ocupados pela estreptavidina. Este facto pode ser comprovado pela observação dos valores obtidos para AuNP-MUA-SA e AuNP-MUA-SA-BSA de onde se percebe que a presença de BSA reduz drasticamente o erro associado, o que permite afirmar que a solução se encontra mais estabilizada. Desta maneira, este novo conjugado adapta uma forma mais semelhante a uma esfera, de maiores dimensões, permitindo melhores resultados de DLS. Além de ocupar os espaços livres, a BSA forma um impedimento estereoquímico, evitando interacção com outras moléculas e estabilizando os bionanoconjugados.

3.3.3 Estudo da variação da razão AuNP-MUA-SA

A estabilidade da solução de AuNP-MUA-SA é dependente da razão entre SA e AuNP-MUA. Assim, para obter informação sobre a melhor razão à qual é possível manter uma solução de AuNP-MUA-SA sem agregação, efectuou-se um estudo no qual se aumentou, progressivamente, a concentração de estreptavidina na solução (Figura 3.13). Para cada razão,

e tendo em conta um volume de 500 μL de AuNP-MUA, utilizaram-se as concentrações apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Concentrações de estreptavidina para as diferentes razões de SA / AuNP-MUA.

Razão	0	5	10	15	20	30	40	50
SA (μL)	0	0,42	0,83	1,25	1,67	2,5	3,33	4,16
SA (M)	0	$1,25 \times 10^{-8}$	$2,49 \times 10^{-8}$	$3,74 \times 10^{-8}$	$4,99 \times 10^{-8}$	$7,46 \times 10^{-8}$	$9,92 \times 10^{-8}$	$1,24 \times 10^{-7}$

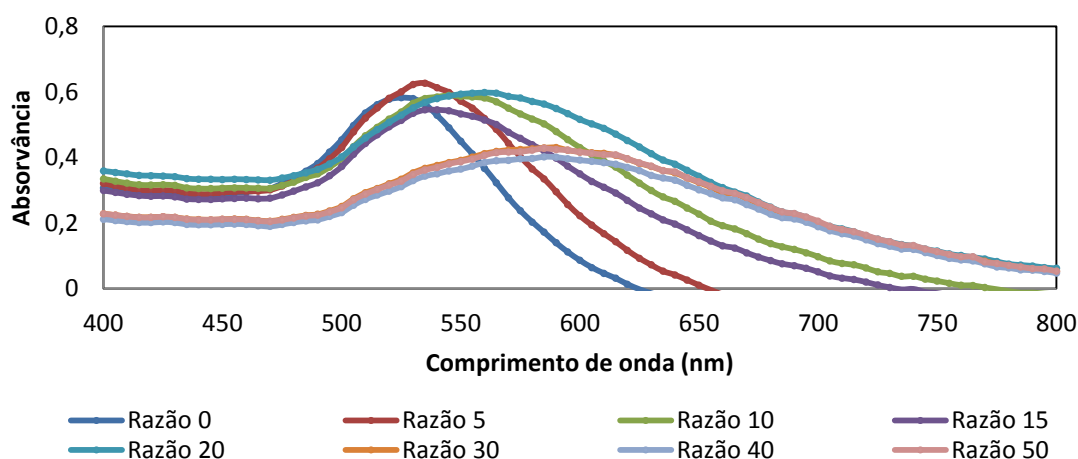


Figura 3.13: Espectro UV/Visível das razões SA / AuNP-MUA entre 0 e 50.

Nos espectros de UV/Visível apresentados na Figura 3.13 pode-se observar que se vão alterando à medida que a razão aumenta em solução e que apenas a razão 5 é que não apresenta um espectro típico de uma solução agregada. Quer isto dizer que, a partir da razão 10 em diante, todas as soluções apresentam um alargamento da banda SPR e valores de absorvância muito elevados entre 700 e 800 nm, típico de agregação. Na tabela 3.2 observam-se os valores determinados de razão de agregação (Abs_{600}/Abs_{SPR}) para cada uma das razões.

Tabela 3.2: Determinação dos valores de razão de agregação para as razões SA / AuNP-MUA estudadas.

Razão	0	5	10	15	20	30	40	50
$R_{agregação}$	0,148	0,354	0,731	0,642	0,863	0,969	0,974	0,975

Tendo em conta, pela observação da Figura 3.13, que a razão 5 é a única estável, e pelo valor de 0,354 de razão de agregação determinado, sabe-se que para qualquer outro estudo que se faça para esta razão, que o quociente entre absorvâncias nunca poderá ser superior a 0,35 de forma a garantir a estabilidade coloidal de uma solução com nanopartículas e estreptavidina.

Para verificar também a estabilidade da solução AuNP-MUA-SA de uma maneira simples, procedeu-se à análise visual das soluções ao longo do tempo. Foi possível também verificar a estabilidade das soluções (nas razões de 0 a 50) através de uma análise colorimétrica, como tal, observou-se a coloração de cada solução logo após o período de incubação de 2 horas, cerca de 5 horas depois e no dia seguinte (30 horas), como demonstrado na Figura 3.14.

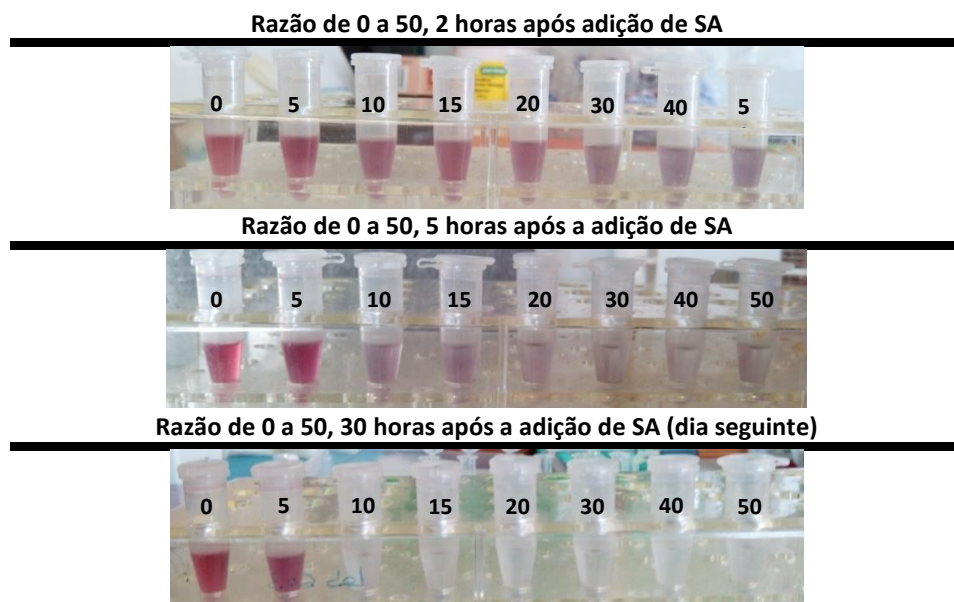


Figura 3.14: Variação do estado de agregação em 24 horas entre as razões 0 e 50.

Mais uma vez, pode-se comprovar que apenas a razão 5 é que conseguiu manter-se estável ao longo do tempo. Num estado agregado, ocorre a aglomeração das partículas o que promove a deposição das mesmas no fundos do microtubos, daí se observar uma solução que passa entre o vermelho (estável, não agregado), o roxo (agregado), e por fim, o transparente (precipitado), como se pode observar nas razões de 10 a 50. Com esta conclusão, apenas se poderia usar a solução de razão 5 para o ensaio seguinte, no entanto avaliou-se novamente a estabilidade da mesma através da observação do espectro UV/Visível, no dia seguinte à incubação.

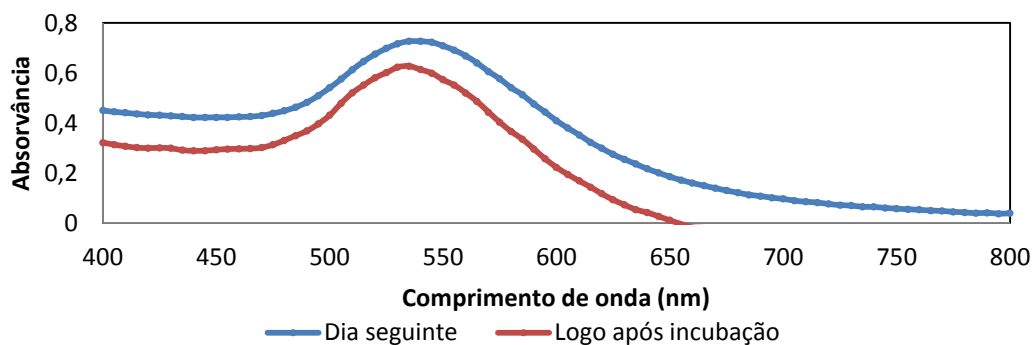


Figura 3.15: Espectro UV/Visível da razão 5 AuNP-MUA-SA logo após a incubação e no dia seguinte.

Da observação do gráfico da Figura 3.15, é possível concluir que no dia seguinte esta solução de razão 5 começa a perder a estabilidade. Observa-se um ligeiro desvio para a direita para comprimentos de onda maiores da banda SPR e um aumento de absorvância na zona entre 600 e 800 nm, evidenciando um início de agregação das nanopartículas em solução. Este estado inicial de agregação poderá dever-se ao facto de a concentração de estreptavidina não ser a mais indicada para esta razão de AuNP-MUA-SA.

3.3.4 Estudo da variação da concentração de NaCl para AuNP-MUA-SA

A estabilidade da solução de AuNP-MUA-SA é também dependente da força iónica da mesma (ou seja, pela concentração de NaCl da solução). Como tal, realizou-se um novo estudo para as soluções de razão 0 a 5, em que se manteve a concentração de $1,25 \times 10^{-8}$ M de estreptavidina mas fez-se variar a concentração da força iónica entre 0 e 1,5 M. Logo após a adição traçou-se o espectro UV/Visível das várias soluções (Figura 3.15).

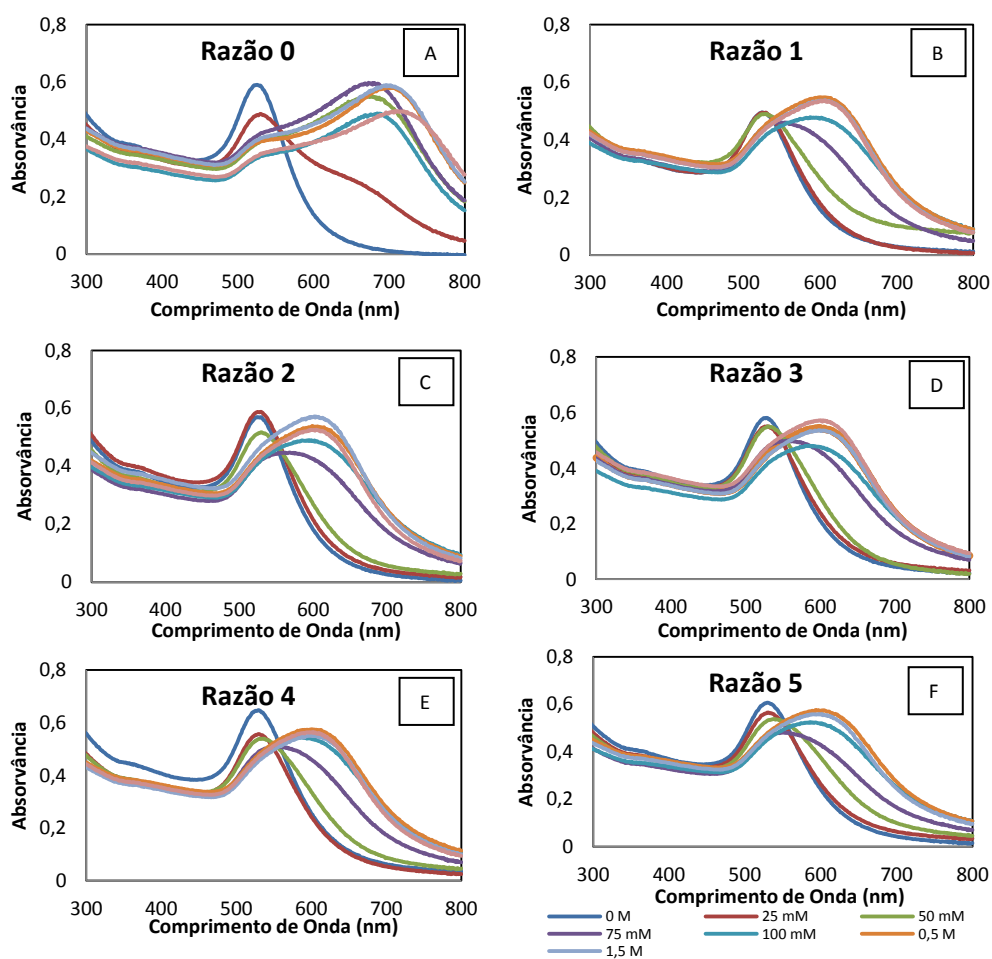


Figura 3.16: Estudo de agregação com NaCl para a razões em 0 e 5 (de A a F).

Apesar de não se observar um aumento progressivo do estado de agregação à medida que aumenta a concentração de NaCl, é possível perceber que para concentrações de sal mais elevadas (quando há aumento da força iónica em solução), a solução AuNP-MUA-SA a várias razões, tem tendência a aumentar o valor de absorvância entre 600 e 800 nm, indicativo de um estado agregado da solução. Verifica-se também que ocorre um desvio da banda de plasmónica de superfície, situada em torno dos 520 nm, para comprimento de onda maiores, à medida que aumenta a força iónica.

Isto acontece devido à alteração da solvatação das nanopartículas com a adição de iões Na^+ e Cl^- , que irão competir, com as AuNP-MUA-SA, pelas moléculas de água, responsáveis pela solvatação destas. Assim, as AuNP-MUA-SA ao deixarem de estar solvatadas, ficam expostas também aos iões Na^+ que cancelarão as cargas negativas existentes na superfície das partículas e que são responsáveis pela repulsão electrostática, entre partículas. Não havendo esta repulsão, as nanopartículas tendem a formar agregados de diferentes tamanhos tornando assim a suspensão polidispersa e instável. Estes agregados têm um comportamento espectral, idêntico a partículas de maiores dimensões, em que a banda da plasmónica irá absorver radiação a um comprimento de onda mais elevado, na zona do vermelho. O comportamento observado no espectro UV/Visível é acompanhado pela mudança de cor da solução que passa de vermelho para azul/roxo nos casos em que a concentração de NaCl adicionada é suficiente para induzir a agregação das nanopartículas de ouro revestidas com MUA e funcionalizadas com estreptavidina.

Para compreender qual a concentração de NaCl mínima necessária para induzir a agregação das AuNP-MUA calculou-se um parâmetro que indica quando a solução de AuNP-MUA está agregada, este parâmetro denomina-se razão de agregação. O seu cálculo consiste no quociente da absorvância ao comprimento de onda em que, na forma totalmente agregada, a absorvância é máxima pela absorvância ao comprimento de onda em que, na forma não agregada, a absorvância é máxima. Neste caso em particular calculou-se a razão de agregação pelo quociente $\text{Abs}_{600}/\text{Abs}_{\text{SPR}}$ (Figura 3.17).

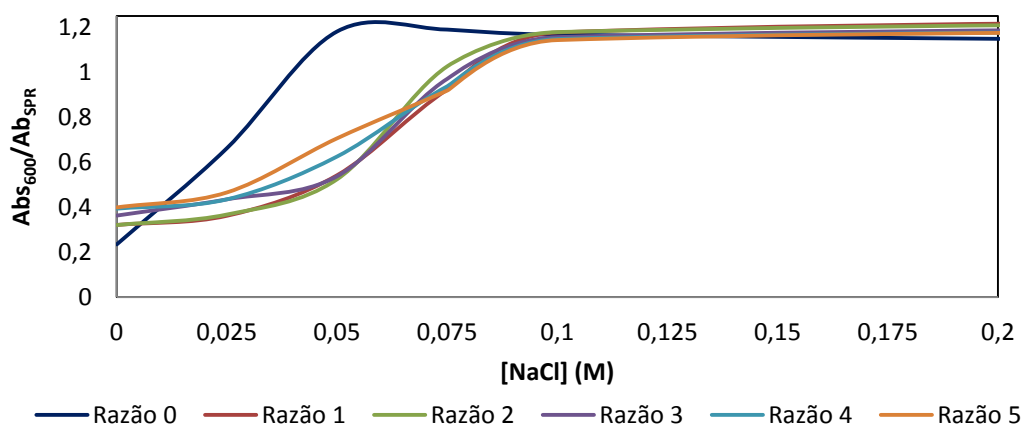


Figura 3.17: Gráfico da razão de agregação com NaCl entre razões 0 e 5 de SA.

Pelo comportamento da solução AuNP-MUA-SA a razão 0 (sem adição de sal), pode-se desde logo concluir não ocorreu nenhum tipo de ligação, ao contrário das soluções de razões 1 a 5.

Experimentalmente verifica-se que para as razões entre 1 e 5, o quociente entre absorvância a 600 nm e a SPR encontra-se entre 0,3 e 0,4 e mantem este valor aproximado até à concentração de 25×10^{-3} M de sal (a partir do qual começa a predominar uma forma agregada). Pela observação do espectro de UV/Visível do gráfico da Figura 3.15 (logo após a incubação), a razão de agregação nunca deveria ser superior a 0,354, como determinado na tabela 3.2, de modo a que uma solução AuNP-MUA-SA (com razão 5) se mantenha estável. Como tal, estes resultados sugerem a existência de um estado pouco estabilizado da solução, pelo que deveriam ser repetidos. Baixando a razão de estreptavidina na solução de nanopartículas de ouro revestidas com MUA, deverá chegar-se a uma solução que se mantém estável ao longo do tempo, como se observa na Figura 3.17.

Estes perfis de agregação, para as razões estudadas, atinge o seu máximo (quando o quociente entre absorvância é igual a 1) para valores próximos de 0,1 M de NaCl, indicando que é necessário uma concentração bastante baixa de sal para induzir a agregação da solução, pelo que se conclui que esta seja uma solução AuNP-MUA-SA pouco estável.

3.4 Aplicação desenvolvida

3.4.1 Dispositivo para detecção do alvo genómico IS6110

A implementação do dispositivo para detecção do alvo genómico IS6110 do MTBC demonstra uma abordagem diferente da utilizada em outros dispositivos de diagnóstico rápido. O funcionamento depende do reconhecimento de fragmentos de DNA específicos do MTBC, previamente marcados com biotina, hibridados com sondas complementares marcadas com digoxigenina. Estes complexos híbridos ligam-se depois a nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina (via ligação à biotina). Os resultados foram obtidos em diversas etapas.

Em primeiro lugar tentou-se colocar a linha de teste a funcionar com deposição de 5 μL de solução de anticorpo anti-digoxigenina (10^{-1} mg/mL), de modo a ligar e imobilizar na linha de teste os complexos duplamente marcados com digoxigenina e biotina-estreptavidina-ouro (ver Figura 1.9). À parte preparou-se uma solução com 10 μL de DNA alvo (10 μM), marcado com biotina, 4 μL de sonda complementar (marcada com digoxigenina) e 20 μL de AuNP-SA comercial, que foi depois testada na tira. Na Figura 3.18 ilustram-se os resultados obtidos nos dispositivos de teste assim preparados.

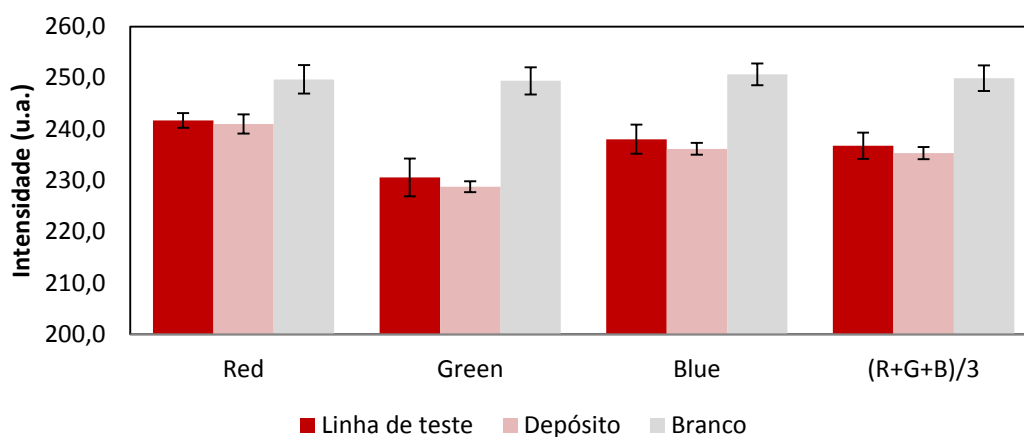


Figura 3.18: Análise de valores RGB para a linha de teste, local de depósito e local sem reacção (branco) no dispositivo em papel.

Como é possível averiguar pela análise RGB da Figura 3.18, verifica-se que não existe distinção entre a linha de teste e a zona de depósito da mistura no início do dispositivo em papel, ou seja, não existe praticamente diferença de intensidade de cor entre os dois locais. Além disso, a

tonalidade desta solução é de um vermelho pouco intenso, dificultando também a sua distinção. Observou-se também que, quer o aumento (em cerca de 20×) de AuNP-SA ou o aumento da quantidade de anticorpo anti-digoxigenina (para 10 µL) imobilizado na linha de teste, quer a utilização de amostras de DNA alvo mais concentradas (até 100 µM), não produziam alterações significativas que permitissem observar uma cor mais intensa na linha de teste, quando comparado com o depósito, no caso de testes que deveriam originar um resultado positivo.

É preciso ter em conta, que na análise RGB, “menos é mais”. Quer isto dizer que, uma intensidade igual a zero corresponde à cor preta e uma intensidade de 250 corresponde ao branco. Logo, ao longo dos diversos resultados obtidos, espera-se encontrar valores baixos para a análise do *green* (complementar à cor vermelha) nas zonas desejadas, nomeadamente nas linhas de teste e de controlo.

Visto que os testes anteriores não originaram resultados satisfatórios, tentou-se realizar uma série de ensaios, com vista a tentar desvendar quais os potenciais problemas que poderiam estar a ocorrer. Uma variável a elucidar era se a ligação entre a biotina e estreptavidina estaria a ocorrer correctamente na matriz do papel. Realizaram-se assim testes adicionais com nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina, com diferentes revestimentos, nomeadamente com citrato (CIT) ou ácido-mercaptopundecanóico (MUA) e adição de BSA na altura ou após 1 hora de estabilização da solução (sintetizadas no laboratório). Utilizou-se a razão 5, anteriormente descrita no ponto 3.2.3., por ser relativamente estável com uma concentração considerada ideal de estreptavidina.

Para estes ensaios depositou-se 5 µL de solução de biotina a 8×10^{-4} M na linha de controlo e 50 µL de nanopartículas funcionalizadas com estreptavidina na zona de depósito (Figuras 3.19 - 3.22). O fluxo da solução foi realizado com a adição de tampão fosfato de sódio 20 mM.

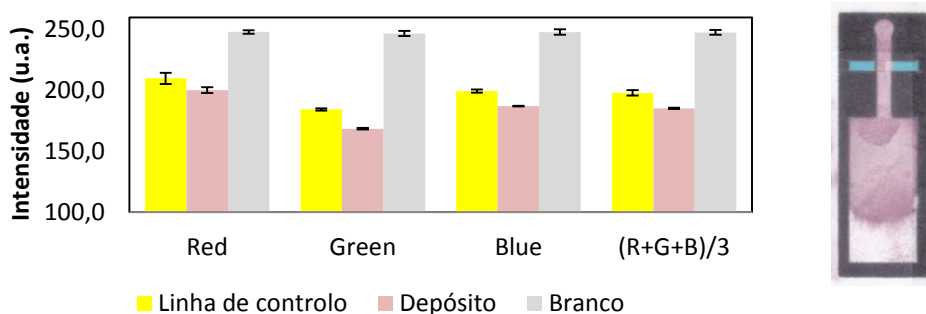


Figura 3.19: Análise de valores RGB para AuNP-MUA-SA-BSA (teste respectivo à direita).

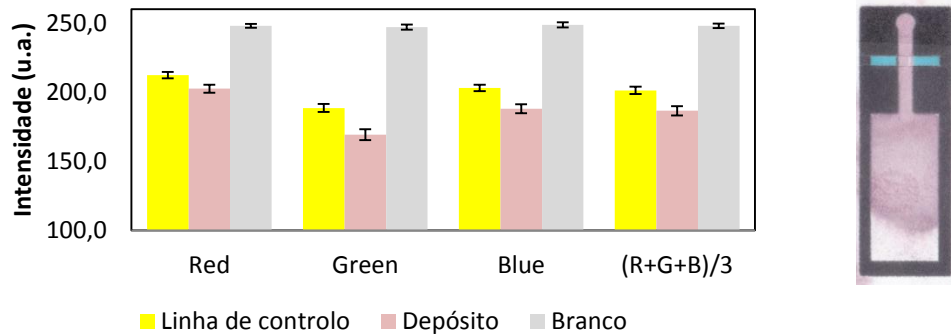


Figura 3.20: Análise de valores RGB para AuNP-MUA-SA (1 hora depois BSA) (teste respectivo à direita).

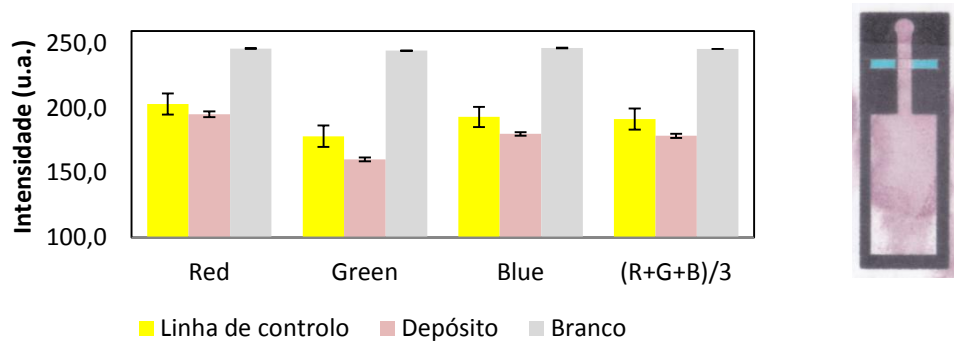


Figura 3.21: Análise de valores RGB para AuNP-CIT-SA-BSA (teste respectivo à direita).

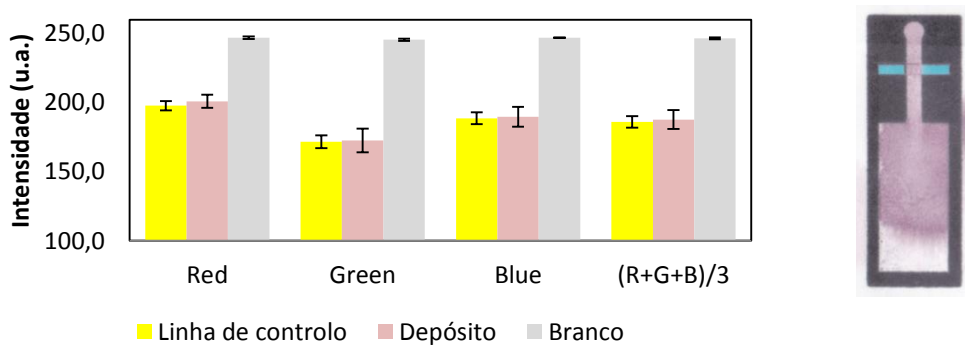


Figura 3.22: Análise de valores RGB para AuNP-CIT-SA (1 hora depois BSA) (teste respectivo à direita).

Apesar de se retirarem valores mais intensos de cor, quando comparado com o ensaio anterior, o resultado continua sem ser satisfatório pois continua sem se observar a diferença de intensidade entre a linha de controlo e a zona de depósito, bem como entre os diferentes tipos de revestimento para as nanopartículas de ouro (Figuras 3.19 a 3.22). Este ensaio não permitiu elucidar sobre o tipo de revestimento mais adequado às nanopartículas (ao contrário

da análise de DLS, de onde se depreendia que o revestimento com MUA e BSA era aquele que mais estabilizava a solução). Como tal, optou-se por utilizar as AuNP-MUA-SA-BSA, uma vez que estudos anteriormente realizados realçaram que o MUA é favorável para a estabilidade das nanopartículas e que a BSA previne a formação de ligações inespecíficas. Este ensaio não permitiu também elucidar sobre se a ligação entre a biotina e a estreptavidina estaria a ocorrer correctamente na matriz de papel, ou até se, por outro lado, a biotina estaria correctamente imobilizada nesta matriz após a sua deposição durante o fabrico dos dispositivos.

Foram assim realizados alguns ensaios onde se testaram diferentes estratégias para imobilizar biotina nas linhas de controlo, nomeadamente a utilização de solventes diferentes. Testou-se a dissolução da biotina em água e em NH_4OH (hidróxido de amónia). Testou-se também a imobilização de biotina indirectamente, via imobilização de oligonucleótidos marcados com esta molécula. Os ensaios foram realizados em papel e, em paralelo, em nitrocelulose (que é normalmente uma matriz de referência para a imobilização de biomoléculas). Para os ensaios em papel depositou-se 4 μL de solução de biotina nas linhas de controlo e 50 μL de AuNP-MUA-SA-BSA nas zonas de depósito (Figuras 3.23 - 3.25). O fluxo da solução foi realizado com a adição de tampão fosfato de sódio a 20 mM.

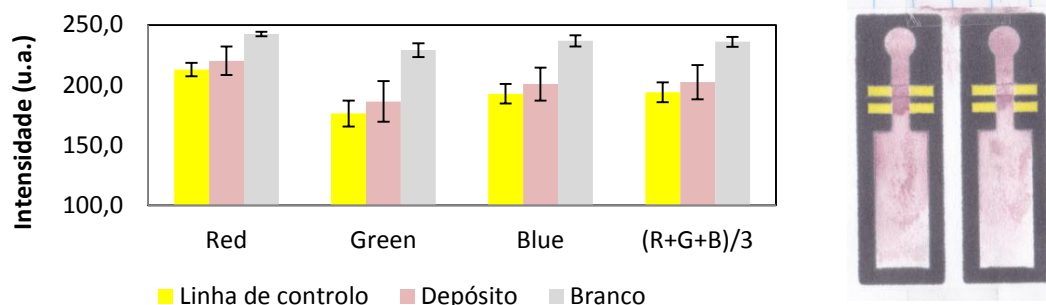


Figura 3.23: Análise de valores RGB para a biotina a 0,204 M dissolvida em NH_4OH , em dispositivos de papel (testes respectivos à direita).

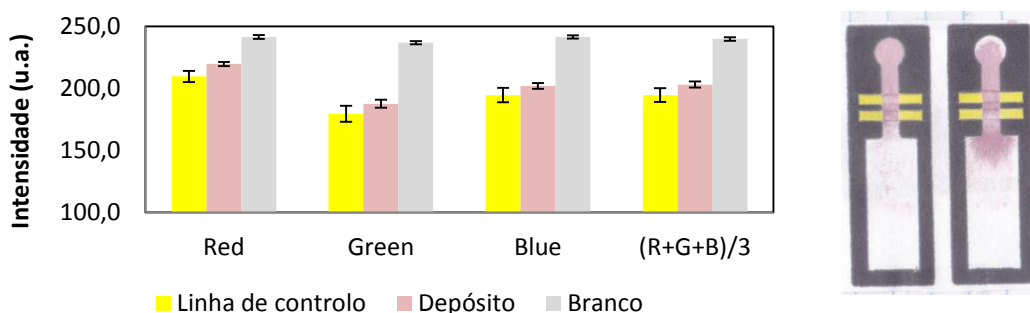


Figura 3.24: Análise de valores RGB para a biotina imobilizada indirectamente via oligonucleótidos marcados com esta molécula (a 100 μM), em dispositivos de papel (testes respectivos à direita).

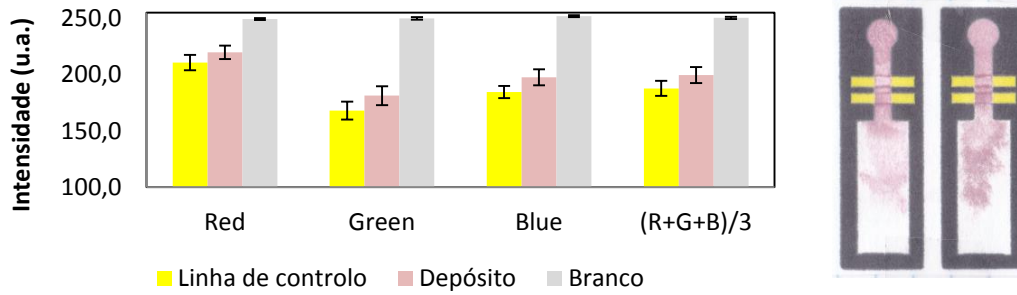


Figura 3.25: Análise de valores RGB para a biotina a 8×10^{-4} M dissolvida em H_2O , em dispositivos de papel (testes respectivos à direita).

Para os ensaios em nitrocelulose utilizou-se a estratégia de teste em *spot* (ver secção 2.9). Nestes testes em particular utilizam-se 2 diferentes alvos, um com biotina (positivo) e sem biotina mas com água em substituição (negativo). As Figuras 3.26 e 3.27 ilustram os resultados destes testes.

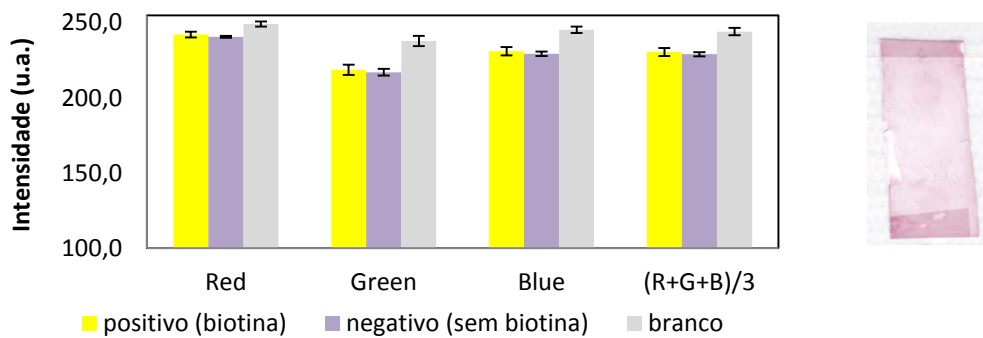


Figura 3.26: Análise de valores RGB para a biotina a 8×10^{-4} M dissolvida em H_2O , imobilizada em nitrocelulose (testes respectivos à direita com negativo em cima e positivo em baixo).

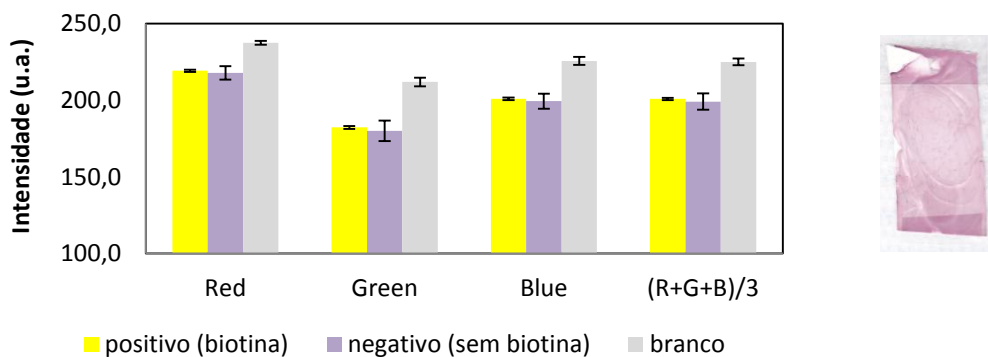


Figura 3.27: Análise de valores RGB para a biotina a 0,204 M dissolvida em NH_4OH , imobilizada em nitrocelulose (testes respectivos à direita com negativo em cima e positivo em baixo).

Dos resultados obtidos anteriormente, pode-se retirar diferentes conclusões. Relativamente ao tipo de substrato, a nitrocelulose, neste teste em específico não mostrou ser eficaz porque mesmo no ensaio negativo (feito com água) encontra-se um *spot* de cor mais intensa, indicando que houve algum tipo de ligações inespecíficas. O bloqueio da superfície de nitrocelulose com BSA parece não ter sido suficiente pois esta continua com uma cor avermelhada, dificultando a análise dos resultados. Em relação aos dispositivos em papel, observou-se um resultado mais favorável para a dissolução da biotina em água (Figura 3.26) do que quando imobilizada indirectamente via o uso de oligonucleótidos marcados com biotina. A dissolução em NH_4OH foi rejeitada no papel porque se observou que as paredes de cera dos canais microfluídicos se desfaziam ao entrarem em contacto com estas soluções. De qualquer modo, estes ensaios não permitiram elucidar também sobre se a ligação entre a biotina e a estreptavidina conjugada com nanopartículas de ouro estaria a ocorrer correctamente nestas matrizes e/ou se a biotina se encontraria correctamente imobilizada.

Capítulo 4

4 Conclusões

Ao longo dos últimos anos, têm sido desenvolvidos diversos testes de diagnóstico rápido para fazer frente aos avanços de inúmeras enfermidades. Cada vez mais, torna-se necessário detectar e tratar precocemente doenças, como a tuberculose, que se podem tornar numa epidemia global. E cada vez mais, com os avanços da ciência e tecnologia, novas experiências, ensaios e diagnósticos estão em curso de forma a serem aplicados às suas necessidades. Em contrapartida, os elevados custos fazem com que estes diagnósticos não cheguem a todos, sobretudo àqueles que mais precisam. Face a este problema, cria-se a necessidade de desenvolver novos testes de diagnóstico, acessíveis financeiramente a todos e fiáveis do ponto de vista científico.

Com este objectivo em mente, tentou-se desenvolver um protótipo de biossensor colorimétrico, capaz de detectar sequências genómicas específicas de *Mycobacterium tuberculosis* através de reacções de bioreconhecimento. Apesar de não ter sido possível chegar ao objectivo inicial deste projecto, conseguiram-se obter diversos resultados que podem servir de base para a continuação deste trabalho.

A análise de microscopia electrónica de varrimento permitiu conhecer melhor a composição das tiras comerciais Milenia® Hybridetect, nomeadamente quanto à morfologia de superfície. As tiras comerciais de nitrocelulose são sobretudo compostas por átomos de carbono, oxigénio e sais, os mesmos elementos maioritários da composição do papel, excepto o último. Como tal, e sendo o papel um material comum nos laboratórios pelas suas diversas aplicações serviu de suporte no fabrico deste biossensor colorimétrico. Utilizou-se papel de cromatografia Whatman nº 1 pois apresenta-se como um substrato constituído essencialmente por celulose não modificada, hidrofílico e que assegura o transporte de soluções aquosas por capilaridade. A utilização da nitrocelulose baseou-se sobretudo a título de comparação, visto ser utilizada nos dispositivos de diagnóstico comerciais.

No que diz respeito à caracterização e preparação do papel, pode-se aferir sobre o método de impressão das barreiras hidrofóbicas que delimitam os canais hidrofílicos. Estas barreiras foram feitas com cera, é um método rápido, barato e eficiente que permite que os dispositivos

possam ser fabricados em poucos minutos. O fabrico destes dispositivos envolve etapas desde o desenho, a impressão, difusão da cera, construção de interruptores, deposição dos reagentes, até à impressão final do encapsulamento.

O fabrico do biossensor colorimétrico, um dispositivo de diagnóstico molecular para a detecção da sequência específica IS6110 do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, pode ser descrito como incluindo três fases distintas: a obtenção de uma linha de teste funcional, a obtenção de uma linha de controlo funcional e finalmente, uma correta ligação no substrato entre a estreptavidina funcionalizada com AuNP e as moléculas de DNA alvo, ao qual hibridaram previamente sondas complementares marcadas com biotina, presentes em solução. No entanto, no fabrico deste dispositivo, encontraram-se diversos obstáculos derivados não só do método de fixação dos agentes utilizados (anticorpos, proteínas, entre outros) no papel mas também da utilização de nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina.

A vantagem de as nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina serem produzidas pelo grupo em vez de se utilizarem nanopartículas comerciais torna-se útil quando se comparam preços finais dos dispositivos em papel. Esta aplicação encontra-se limitada a países em desenvolvimento devido ao custo que encarga caso sejam utilizadas nanopartículas de ouro funcionalizadas com estreptavidina comerciais (cerca de 200 €/mL). Para que tal seja possível, é necessário também otimizar a solução de AuNP-SA de forma a obter uma solução coloidal estável e funcional. Apesar de se ter sintetizado com sucesso as nanopartículas de ouro (de cerca de 13 nm de diâmetro), a dificuldade acresce quando se tenta revesti-las e funcionalizá-las com estreptavidina. Em teoria, escreve-se que um revestimento eficaz para as nanopartículas de ouro é feito com MUA, no entanto, pouco se sabe se este é o revestimento eficaz para uma funcionalização com estreptavidina. Não são muitos os estudos que existem com nanopartículas de ouro e estreptavidina, e cada um realiza uma funcionalização de maneira diferente. Dos resultados obtidos neste projecto pode-se concluir que a melhor estratégia para a funcionalização de nanopartículas de ouro recaía sobre um revestimento não só com MUA mas também com BSA (que de certo modo ajuda a impedir a ligação de moléculas não específicas à superfície das nanopartículas). De futuro, uma opção, seria começar por comparar e testar todas as funcionalizações, de modo a chegar a uma solução coloidal estável, tendo em conta a razão entre a nanopartícula de ouro revestida e a estreptavidina. Esta funcionalização deverá ser sempre complementada com estudos de variações de força iónica (por exemplo NaCl), para determinar qual o valor máximo de sal que

pode ser adicionado, sem que a solução agregue, passando de vermelho (coloidal) a roxo (agregado). Outro estudo a ser feito será estudar o comportamento das razões entre 1 e 4 da solução de AuNP-MUA-SA-BSA por terem apresentado estabilidade coloidal, apesar da baixa concentração de sal em solução.

A análise por DLS é uma boa solução para comparar os diferentes tamanhos das biomoléculas em estudo. No entanto, para proteínas muito complexas, como é o caso da estreptavidina, é aconselhável complementar esta análise com outras técnicas de caracterização de tamanho, como por exemplo TEM, e garantir a estabilidade do bionanoconjugado com uma forma esférica.

A implementação do dispositivo para detecção do alvo genómico IS6110 do MTBC começa pela funcionalização da linha de teste. Uma linha de teste funcional implica uma sinalização colorimétrica, através da concentração de AuNP na linha, no caso de uma amostra infectada e a inexistência de sinal colorimétrico na presença de amostra não infectada. Após se obter uma linha funcional, torna-se indispensável otimizar as condições de modo a gastar o mínimo de reagentes necessários para produzir um sinal positivo. Os resultados obtidos não foram suficientes para se reproduzir uma linha de teste funcional. Encontraram-se dificuldades em obter um sinal óptico visível sem se saber ao certo se foi devido a uma fraca adsorção dos anticorpos (anti-digoxigenina) ao papel ou pela solução de AuNP-MUA-SA-BSA ser pouco estável, ou até por a estreptavidina funcionalizada nas AuNP ter perdido, por alguma razão, capacidade de ligação à biotina marcadora das moléculas-alvo. Os mesmos problemas foram encontrados quando se optou por tentar funcionalizar a linha de controlo com biotina. A adsorção da biotina, dissolvida em água, ao papel demonstrou ser um pouco melhor que para os anticorpos, no entanto não foi de todo um resultado claro. A utilização da nitrocelulose foi necessária a título de comparação (visto os dispositivos comercialmente disponíveis usarem normalmente este substrato), no entanto os resultados também não foram satisfatórios.

Continuam a existir dificuldades técnicas que não se conseguiram ultrapassar neste projecto. No entanto, contribuiu-se significativamente para passos importantes no desenvolvimento deste sistema - a questão da adsorção do anticorpo e como melhorar a forma de evitar a adsorção inespecífica das biomoléculas ao papel – que continuam a ser etapas por melhorar. Ultrapassadas estas barreiras, pode-se ter uma técnica de diagnóstico molecular rápido, acessível a todos, que não prejudica o ambiente e se torna uma ferramenta útil na detecção precoce de uma doença tão grave quando a tuberculose.

Bibliografia

- [1] Roberts, J., "The Chemistry of Paper", *The Royal Society of Chemistry*, 1996
- [2] Martinez, A.; Phillips, S. and Whitesides, G., "Diagnostics for the Developing World: Microfluidic paper based analytical Devices", *Analytical Chemistry* 2010, 82, 3 - 10
- [3] Yetisen, A.; Akram, M. and Lowe, C.; "Paper based microfluidic point-of-care diagnostic devices", *Lab Chip*, 2013, 13, 2210 - 2251
- [4] <http://antoine.frostburg.edu/chem/senese/101/consumer/faq/what-is-cellulose.shtml>
- [5] Costa, M.; Veigas, B.; Jacob, J.; Santos, D.; Gomes, J.; Baptista, P.; Martins, R.; Inácio, J. and Fortunato, E., "Low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: Lab-on-paper", *Nanotechnology*, 2014, 25, 1 – 12
- [6] http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F07_3.html
- [7] <http://www.madehow.com/Volume-2/Paper.html>
- [8] Liana, D.; Raguse, B.; Gooding, J. and Chow, E.; "Recent Advances in Paper-Based Sensors", *Sensors*, 2012, 12, 11505 - 11526
- [9] <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/1357055/papermaking/>
- [10] Posthuma-Trumpie, G.; Korf, J. and Amerongen A.; "Lateral flow (imuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393, 569 - 582
- [11] Morrison, D.; Dokmeci, M. and U. Demirci, "Clinical Applications of Micro- and Nanoscale Biosensors", *Biomedical Nanostructures*, 2008, 1, 433 - 458
- [12] Yu, H.; Montesa, C.; Rojas, N. and Enriquez, E., "Nucleic acid based lateral flow strip biosensor via competitive binding for possible dengue detection", *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 3(5), 1 - 6

[13] Vo-Dinh, T. and Cullum, B.; "Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics", *Journal of Analytical Chemistry*, 2008, 366/6 - 7, 540 - 551

[14] Kiilerich-Pedersen, K.; Poulsen, C.; Daprà, J.; Christiansen, O. and Rozlosnik, N.; "Polymer Based Biosensors for Pathogen Diagnostics", *Environmental Biosensors*, 2011, 193 - 212

[15] <http://www.intechopen.com/books/pesticides-advances-in-chemical-and-botanical-pesticides/evolution-and-expectations-of-enzymatic-biosensors-for-pesticides>

[16] Veigas, B.; Jacob, J. M.; Costa, M. N.; Santos, D. S.; Viveiros, M.; Inácio, J.; Martins, R.; Barquinha, P.; Fortunato, E.; Baptista, P. V., "Gold on paper - paper platform for Au-nanoprobe TB detection", *Lab on a Chip* 2012, 12, 4802-4808

[17] <http://www.mdsau.de.com/2009/08/exame-de-urina.html>

[18] Parolo, C. and Merkoçi, A.; "Paper-based nanobiosensors for diagnostics", *Chemical Society reviews*, 2013, 42(2), 450 - 457

[19] Martinez, A.; Phillips, S.; Carrilho, E.; Thomas, S.; Sindi, H. and Whitesides, G.; "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis", *Analytical Chemistry*, 2008, 80/10, 3699 - 3707

[20] Dungchai, W.; Chailapakul, O. and Henry, C.; "A low cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing", *Analyst*, 2011, 136, 77 - 82

[21] <http://www.cytodiagnosics.com/lateral-flow-immunoassays.php>

[22] Bruus, H., "Theoretical Microfluidics", *New York: Oxford University Press Inc.*, 2008

[23] Blazková, M.; Koets, M.; Whichers, J.; Amerongen, A.; Fukal, L. and Rauch, P., "Nucleic acid lateral flow immunoassay for the detection of pathogenic bacteria from food", *Czech J. Food Sci.*, 2009, 27, 350 - 353

[24] <http://www.rapid-test-kit.com/>

[25] Whitesides, G., "The origins and the future of microfluidics", *Nature*, 2006, 442(7101), 368 - 373

- [26] Squires, T. and Quake, S., "Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale", *Reviews of modern physics*, 2005, 77
- [27] Dungchai, W.; Chailapakul, O. and Henry, C., "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices", *Analytica Chimica Acta*, 2010, 674(2), 227 - 233
- [28] Osborn, J.; Lutz, B.; Fu, E.; Kauffman, P.; Stevens, D. and Yager, P., "Microfluidics without pumps: reinventing the T-sensor and H-filter in paper networks", *Lab on a chip*, 2010, 10(20), 2659 - 2665
- [29] Yager, P.; Edwards, T.; Fu, E.; Helton, K.; Nelson, K.; Tam, M. and Weigl, B., "Microfluidic diagnostic technologies for global public health", *Nature*, 2006, 442 (7101), 412 - 418
- [30] Washburn, E., "The dynamica of Capillary flow" *Physical Review*, 1921, 17(3), 273 - 283
- [31] Oliveira, L. and Lopes, A., "Mecânica dos Flúidos", *LIVRIMPOR – Livros Técnicos*, 2007, 2ª edição
- [32] Radenovic, A., "Microfluidics Lab on a Chip", *Advanced Bioengineering methods laboratory*, 1 - 27
- [33] Li, X.; Ballerini, D. and Shen, W., "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends", *Biomicrofluidics*, 2012, 6(1), 11301 - 11313
- [34] Rivet, C.; Lee, H.; Hirsch, A.; Hamilton, S. and Lu, H., "Microfluidics for medical diagnostics and biosensors", *Chemical Engineering Science*, 2011, 66(7), 1490 - 1507
- [35] Lu, Y.; Shi, W.; Qin, J. and Lin, B., "Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing", *Analytical Chemistry*, 2010, 82, 329 - 335
- [36] Staples, T. and Shaffer, D., "Wicking flow in irregular capillaries", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2002, 204(1 – 3), 239 - 250
- [37] Carrilho, E.; Martinez, A. and Whitesides, G., "Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics", *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 7091 - 7095
- [38] Lu, Y.; Shi, W., Jiang, L., Qin, J. and Lin, B., "Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay", *Electrophoresis*, 2009, 30, 1 - 4
- [39] News & Analysis, "Inkjet printing of paperfluidic devices", *Bioanalysis*, 2010, 2(9), 1531 - 1533

- [40] Lee, C.; Chang, C.; Wang, Y. and Fu, L.; "Microfluidic mixing: a review" *International journal of molecular sciences*, 2011, 12(5), 3263 - 3287
- [41] Gazit, E.; "Plenty of Room for Biology at the Bottom", *Imperial College Press*, 2007
- [42] Martins, M., Trindade, T.; "Nanomaterials and the discovery of new worlds at the chemist's bench", *Química Nova*, 2002, 1435 - 1446
- [43] Williams, L. and Adams, W.; "Nanotechnology Desmistified", *McGraw-Hill*, 2007
- [44] Buzea, C.; Pacheco, II; Robbie, K., "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity", *Biointerphases*, 2007, 2, 1 - 103
- [45] Roduner, E.; "Size matters: why nanomaterials are different", *Chemical Society Reviews*, 2006, 35, 583 - 592
- [46] El-Sayed, M.; "Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes", *Accounts of Chemical Research*, 2001, 34, 257 - 264
- [47] Liz-Marzan, L.; "Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles", *Langmuir*, 2006, 22, 32 - 41
- [48] <http://nanocomposix.eu/pages/plasmonics-and-nanophotonics>
- [49] <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>
- [50] Daniel, C. and Astruc, D., "Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum - size - related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology", *Chemical Reviews*, 2004, 104, 293 - 346
- [51] Lee, K.; El-Sayed, M.; "Dependence of the enhanced optical scattering efficiency relative to that of absorption for gold metal nanorods on aspect ratio, size, end-cap shape, and medium refractive index", *The Journal of Physical and Chemistry B*, 2005, 109, 20331 - 20338
- [52] Lee, K.; El-Sayed, M.; "Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition", *The Journal of Physical and Chemistry B*, 2006, 110, 19220 - 19225

- [53] Templeton, A. ; Pietron, J.; Murray, R.; Mulvaney, P.; "Solvent Refractive Index and Core Charge Influences on the Surface Plasmon Absorbance of Alkanethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters", *The Journal of Physical and Chemistry B*, 2000, 104, 564 - 570
- [54] Veigas, B.; "Au-Nanossondas Aplicação na detecção de Mycobacterium tuberculosis e Plasmodium berghei", Dissertação de tese de Mestrado, FCT-UNL, 2009
- [55] Liz-Márzan, L., "Tailoring Surface Plasmon through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles" *Langmuir*, 2006, 22, 32 - 41
- [56] Klabunde, K.; "Nanoscale Materials in Chemistry", *Wiley Interscience*, 2001
- [57] Larguinho M. and Baptista, P.; "Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics," *Journal of Proteomics*, 2012, 75/10, 2811 - 2823
- [58] Thaxton, C.; Georganopoulou, D. and Mirkin, C.; "Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets," *International Journal of Clinical Chemistry*, 2006, 363, 120 - 126
- [59] Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, P. and Franco, R., "Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(3), 943 - 950
- [60] Hauck, T.; Giri, S.; Gao, Y. and Chan, W., "Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010, 62, 438 - 448
- [61] Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H. and Plech, A., "Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited", *The Journal of Physical and Chemistry B*, 2006, 110, 15700 - 15707
- [62] Zhao, P.; Li, N. and Astruc, D., "State of the art in gold nanoparticle synthesis", *Coordination Chemistry Reviews*, 2013, 638 - 665
- [63] Haiss, W.; Thanh, N. T. K.; Aveyard, J. and Fernig, D. G., "Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra", *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 4215 - 4221
- [64] Willner, I.; Baron, R. and Willner, B., "Biomolecule-nanoparticle hybrids as functional units for nanobiotechnology", *Chemical Communications*, 2007, 323 - 332

- [65] You, C.; Verma, A. and Rotello, M., "Engineering the nanoparticle biomacromolecule interface", *Soft Matter*, 2006, 2, 190 - 204
- [66] Zheng, M. and Huang, X. Y., "Nanoparticles comprising a mixed monolayer for specific bindings with biomolecules", *Journal of the American Chemistry Society*, 2004, 126, 12047 - 12054
- [67] Thanh, T. and Rosenzweig, Z., "Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein A using gold nanoparticles", *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 1624 - 1628
- [68] Zhang, C.; Zhang, Z.; Yu, B.; Shi, J. and Zhang, X., "Application of the biological conjugate between antibody and colloid Au nanoparticles as analyte to inductively coupled plasma mass spectrometry", *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 96 - 99
- [69] Ghosh, P.; Han, G.; De, M.; Kim, C. K. and Rotello, V. M., "Gold nanoparticles in delivery applications", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008, 60, 1307 - 1315
- [70] Ghosh, P.; Yang, X.; Arvizo, R.; Zhu, Z. J.; Agasti, S. S.; Mo, Z. and Rotello, V. M., "Intracellular delivery of a membrane-impermeable enzyme in active form using functionalized gold nanoparticles", *Journal of the American Chemistry Society* 2010, 132, 2642 - 2645
- [71] Lynch, I. and Dawson, K. A., "Protein-Nanoparticle Interactions", *NanoToday*, 2008, 3, 40 - 47
- [72] Srivastava, S.; Verma, A.; Frankamp, B. L. and Rotello, V. M., "Controlled Assembly of Protein-Nanoparticle Composites through Protein Surface Recognition", *Advanced Materials*, 2005, 17, 617 - 621
- [73] Burt, J. L.; Gutierrez-Wing, C.; Miki-Yoshida, M. and Jose-Yacaman, M., "Noble metal nanoparticles directly conjugated to globular proteins", *Langmuir*, 2004, 20, 11778 - 11783
- [74] Brewer, S. H.; Glomm, W. R.; Johnson, M. C.; Knag, M. K. and Franzen, S., "Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces", *Langmuir*, 2005, 21, 9303 - 9307
- [75] Aubin-Tam, M. E. and Hamad-Schifferli, K., "Gold nanoparticle-cytochrome C complexes: the effect of nanoparticle ligand charge on protein structure", *Langmuir*, 2005, 21, 12080 - 12084
- [76] Gomes, I.; Santos, N. C.; Oliveira, L. M. A.; Quintas, A.; Eaton, P.; Pereira, E. and Franco, R., "Probing Surface Properties of Cytochrome c at Au Bionanoconjugates", *The Journal of Physical Chemistry C*, 2008, 112, 16340 - 16347

- [77] Jiang, X.; Jiang, J.; Jin, Y.; Wang, E. and Dong, S., "Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: probing by circular dichroism, UV/visible, and infrared spectroscopy", *Biomacromolecules*, 2005, 6, 46 - 53
- [78] Levy, R., "Peptide-capped gold nanoparticles: Towards artificial proteins", *ChemBiochem*, 2006, 7, 1141 - 1145
- [79] Kaufman, E. D.; Belyea, J.; Johnson, M. C.; Nicholson, Z. M.; Ricks, J. L.; Shah, P. K.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldoto, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P. and Franzen, S., "Probing protein adsorption onto mercaptoundecanoic acid stabilized gold nanoparticles and surfaces by quartz crystal microbalance and zeta-potential measurements" *Langmuir*, 2007, 23, 6053 - 6062
- [80] Lunt, E. A.; Pitter, M. C. and O'Shea, P., "Quantitative studies of the interactions of metalloproteins with gold nanoparticles: identification of dominant properties of the protein that underlies the spectral changes", *Langmuir*, 2009, 25, 10100 - 10106
- [81] Saptarshi, S.; Duschl, A. and Lopata, A., "Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle", *Journal of Nanobiotechnology*, 2013, 11(26), 1 - 12
- [82] Hanauer, M.; Pierrat, S.; Zins, I.; Lotz, A. and Sonnichsen, C., "Separation of nanoparticles by gel electrophoresis according to size-and shape" *Nano Letters*, 2007, 7, 2881 - 2885
- [83] Njuri, Z., "Rapid and sensitive detection of human African trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick", *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 69, 205 – 209
- [84] Patel, P.; Yillah, J.; Weidmann, M.; Méndez, J.; Nakouné, E. and Niedriga, M., "Advanced Yellow Fever Virus Genome Detection in Point-of-Care Facilities and Reference Laboratories Cristina Domingo", *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(12), 4054 - 4060
- [85] <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/340538/>
- [86] <http://www.milenia-biotec.de/products/test-development/mileniar-hybridetect-2t/?L=1>
- [87] http://www.bionicum.com.pl/pliki/pdf/Hybridetect_Brosch_07.pdf
- [88] Tsai, T.; Shen, S.; Cheng, C. and Chen, C., "Paper-based tuberculosis diagnostic devices with colorimetric gold nanoparticles", *Science and technology of advanced materials*, 2013, 14, 1 - 6

[89] Bento, J.; Silva, A.; Rodrigues, F. and Duarte, R., “Métodos diagnósticos em tuberculose”, *Acta Médica Portuguesa*, 2011, 24, 145 - 154

[90] Antunes, A. “Programa nacional de luta contra a tuberculose (PNT)”, Março de 2010

[91] http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=235

[92] González, M.; Bagatolli, L.; Echabe, I.; Arrondo, J.; Argaraña, C.; Cantor, C. and Fidelio, G., “Interaction of biotin with streptavidin”, *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(17), 11288 - 11294

[93] Global tuberculosis report, *World Health Organization*, 2013

[94] Hendrickson, W.; Pähler, A.; Smith, J.; Satow, Y.; Merritt, E. and Phizackerley, R.; “Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86, 2190 - 2194

[95] Laitinen, O.; Nordlund, H.; Hyto, V. and Kulomaa, M., “Brave new (strept)avidins in biotechnology”, *Biotechnology*, 2007, 25(6), 269 - 277

[96] <http://www.prozyme.com/documents/sa10.pdf>

[97] http://www.jenabioscience.com/cms/en/1/browse/1200_streptavidinbiotin_binding_assays.html

[98] Diamandis, E. and Christopoulos, T.; “The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology”, *Clinical Chemistry*, 1991, 37/5, 625 - 636

[99] Stayton, P.; Freitag, S.; Klumb, L.; Chilkoti, A.; Chu, V.; Penzotti, J.; To, R.; Hyre, D.; Trong, I.; Lybrand, T. and Stenkamp, R., “Streptavidin-biotin binding energetics”, *Biomolecular Engineering*, 1999, 16, 39 - 44

[100] <http://www.webmd.com/vitamins-and-supplements/lifestyle-guide-11/supplement-guide-biotin>

[101] <http://www.piercenet.com/method/biotinylation>

[102] <http://www.lifetechnologies.com/pt/en/home/brands/product-brand/dynal/streptavidin-coupled-dynabeads/capture-of-biotinylated-targets.html>

[103] Laitinen, O.; Nordlund, H.; Hyto, V. and Kulomaa, M., "Brave new (strept)avidins in biotechnology", *Biotechnology*, 2007, 25(6), 269 - 277

[104] González, M.; Bagatolli, L.; Echabe, I.; Arrondo, J.; Argaraña, C.; Cantor, C. and Fidelio, G., "Interaction of biotin with streptavidin", *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(17), 11288 - 11294

[105] <http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter3.htm>

[106] Costa, M.; "Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores", Dissertação de tese de Mestrado, FCT-UNL, 2013

[107] Costa, P.; "Improved nucleic acid testing strategies to detect and discriminate veterinary relevant Mycobacterium tuberculosis complex members", Dissertação de tese de Doutoramento, IHMT-UNL, 2014

[108] Guirgis, B.; "Development of Prototype Gold Nanoparticle-Based Immunoassays for the detection of Plasmodium falciparum Hsp70", Dissertação de tese de Mestrado, Ain Shams University, 2010

[109] Couto, C.; "Active bionanoconjugates of laccase and gold nanoparticles: Kinetic and structural studies", Dissertação de tese de Mestrado, FCT-UNL, 2012

[110] Kaufman, E.; Belyea, J.; Johnson, M.; Nicholson, Z.; Ricks, J.; Shah, P.; Bayless, M.; Pettersson, T.; Feldotö, Z.; Blomberg, E.; Claesson, P. and Frazen, S.; "Probing Protein Adsorption onto Mercaptoundecanoic Acid Stabilized Gold Nanoparticles and Surfaces by Quartz Crystal Microbalance and ζ -Potential Measurements", *Langmuir*, 2007, 23, 6053 - 6062

ANEXOS

Anexo I

Solução de H_{AuCl₄} 1mM, num volume final de 250 mL (solução em água Milli-Q)

MM (H_{AuCl₄}) = 339,78 g/mol (30% wt em HCl)

ρ (H_{AuCl₄}) = 1,637 g/cm³

$\rho \times 30\% = 1,637 \times 0,3 = 0,4911$ g (em 1 mL de HCl)

$n = m / M \Leftrightarrow n = 0,4911 / 339,78 \Leftrightarrow n = 1,445$ mol

$C_i \times V_i = C_f \times V_f \Leftrightarrow 1,445 \times V_i = 1 \times 10^{-3} \times 250 \times 10^{-3} \Leftrightarrow V_i = 172,92$ μ L **A retirar da solução Stock**

Solução de Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 38,8mM, num volume final de 25 mL (solução em água Milli-Q)

MM (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O) = 294,10 g/mol

$m = C \times V \times MM \Leftrightarrow m = 38,8 \times 10^{-3} \times 25 \times 10^{-3} \times 294,10 \Leftrightarrow m = 285,7$ mg **A pesar do stock**

Solução de MUA

C = 10 mM

V_f = 40 mL (em etanol puro)

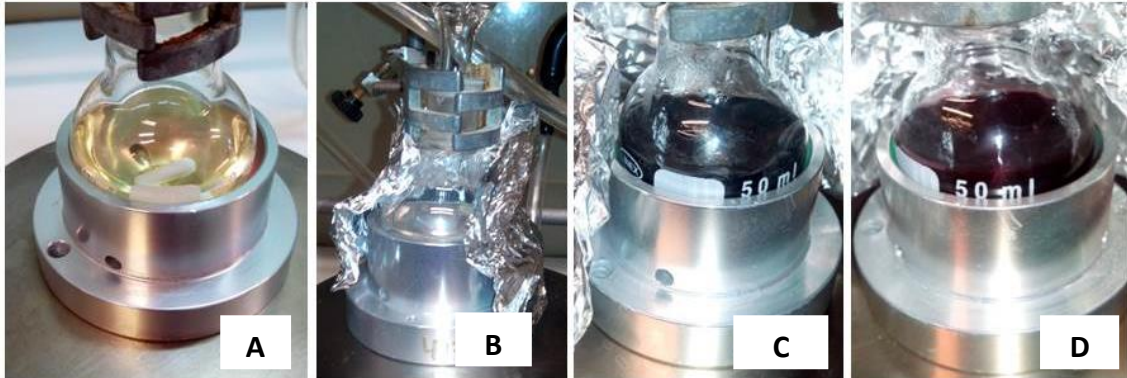
$M = C \times V \times MM = 10 \times 10^{-3} \times 40 \times 10^{-3} \times 218,36 = 8,73 \times 10^{-2}$ g = 87,34 mg

Síntese de Nanopartículas de Ouro

Adiciona-se 250 mL de água Milli-Q e 172,92 μ L de solução de H_{AuCl₄} a um balão de fundo redondo. Espera-se cerca de 40 minutos até iniciar o processo de ebulição, e adiciona-se 25 mL de Na₃C₆H₅O₇. A solução permanece sob aquecimento e agitação durante 15 minutos, sendo depois colocada à temperatura ambiente para iniciar o seu arrefecimento. Com a síntese concluída e a solução devidamente arrefecida, retira-se uma alíquota e efectua-se uma diluição numa cuvette. Traça-se o espectro de absorvância no intervalo de 400 a 600 nm de comprimento de onda, tendo como linha de base água Milli-Q.

É possível acompanhar o processo de síntese de nanopartículas de ouro, através da mudança de cor ao longo do tempo. Inicialmente tem-se uma solução com um tom amarelado transparente (Anexo I. 1A); após a solução entrar em ebulição e ter sido adicionado o citrato de sódio, a mesma apresenta uma cor

transparente (Anexo I. 1B) por alguns momentos, e rapidamente muda para uma coloração preta (Anexo I. 1C); lentamente, e aquando da formação das nanopartículas, o preto vai dissipando e dá lugar a um tom avermelhado escuro (Anexo I. 1D), característico de nanopartículas de ouro de 13 nm, aproximadamente.



Anexo I.1 A a D: Mudança de cor no processo de síntese de nanopartículas de ouro

Funcionalização de AuNP com MUA

$$V_{\text{conjugado}} = 1 \text{ mL}$$

$$C_i V_i = C_f V_f (=) 1,28 \times 10^{-8} \times V_{i \text{ AuNP}} = 2,5 \times 10^{-9} \times 1 \times 10^{-3} (=) V_i = 2,01 \times 10^{-4} \text{ L} = 200 \mu\text{L}$$

Prefarzer 800 μL (1000 – 200 = 800 μL) com água Milli-Q

$$V_{\text{MUA}} = 1,28 \times 10^{-8} \times 1 \times 10^{-3} \times 5000 / 10 \times 10^{-3} = 6,39 \times 10^{-6} \text{ L} = 6,39 \mu\text{L}$$

Determinação da razão entre AuNP e Estreptavidina

$$\text{Razão} = n_{\text{SA}} / n_{\text{AuNP}}$$

$$N_{\text{AuNP}} = 2,5 \times 10^{-9} \times 500 \times 10^{-6} = 1,25 \times 10^{-12} \text{ mol}$$

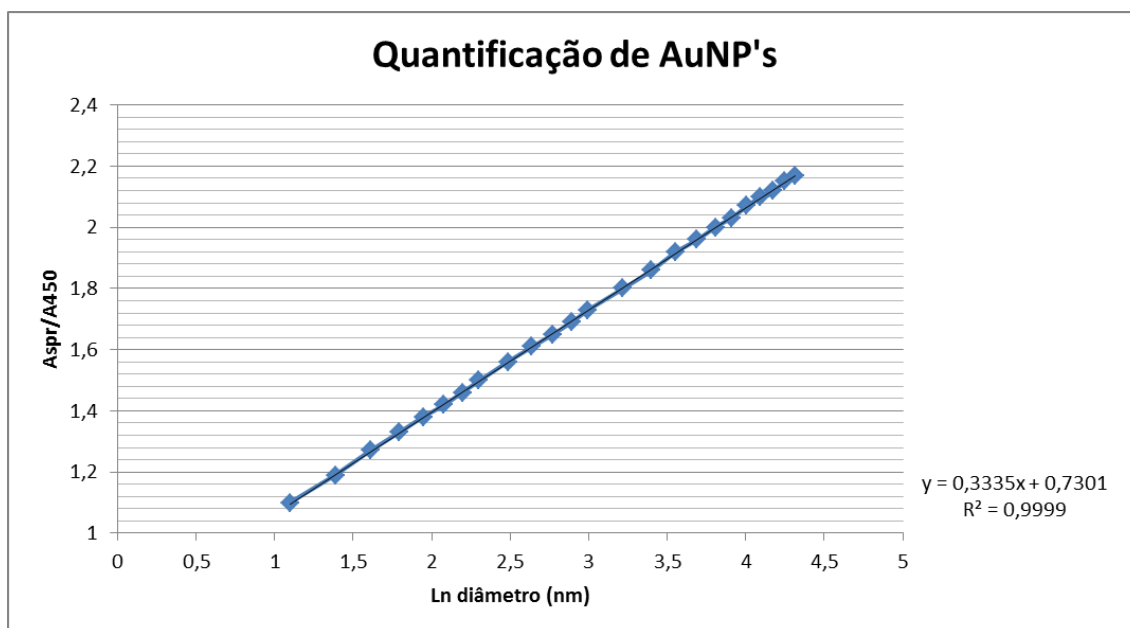
$$N_{\text{SA}} = 0,015 \times 10^{-3} / 300 \times 120 \times 10^{-6} = 6,0 \times 10^{-12} \text{ mol}$$

$$V_{\text{SA}} = C_{\text{AuNP}} \times V_{\text{AuNP}} \times \text{Razão} / C_{\text{SA}} = 1,25 \times 10^{-12} \times \text{Razão} / 6,0 \times 10^{-12} (=) R = 4,81$$

Anexo II

Anexo II.1: Posição do pico de SPR dependente do diâmetro da partícula [63].

Aspr/A450	d (nm)	ln d (nm)	Aspr/A450	d (nm)	ln d (nm)
1,1	3	1,0986123	1,73	20	2,9957323
1,19	4	1,3862944	1,8	25	3,2188758
1,27	5	1,6094379	1,86	30	3,4011974
1,33	6	1,7917595	1,92	35	3,5553481
1,38	7	1,9459101	1,96	40	3,6888795
1,42	8	2,0794415	2	45	3,8066625
1,46	9	2,1972246	2,03	50	3,912023
1,5	10	2,3025851	2,07	55	4,0073332
1,56	12	2,4849066	2,1	60	4,0943446
1,61	14	2,6390573	2,12	65	4,1743873
1,65	16	2,7725887	2,15	70	4,2484952
1,69	18	2,8903718	2,17	75	4,3174881



Anexo II.2: Equação para a quantificação de AuNP, obtida por extrapolação da tabela anterior [63].

Anexo II.3: Coeficiente de extinção molar (ϵ) teórico para AuNP em água, com diâmetro de 2 a 100 nm [63].

$d/$ nm	$\epsilon_{450} /$ $M^{-1}cm^{-1}$	$d/$ nm	$\epsilon_{450} /$ $M^{-1}cm^{-1}$	$d/$ nm	$\epsilon_{450} /$ $M^{-1}cm^{-1}$
2	4.25E+05	35	3.21E+09	68	2.50E+10
3	1.49E+06	36	3.52E+09	69	2.61E+10
4	3.62E+06	37	3.84E+09	70	2.71E+10
5	7.20E+06	38	4.18E+09	71	2.82E+10
6	1.26E+07	39	4.54E+09	72	2.93E+10
7	2.03E+07	40	4.92E+09	73	3.05E+10
8	3.07E+07	41	5.32E+09	74	3.16E+10
9	4.43E+07	42	5.74E+09	75	3.28E+10
10	6.15E+07	43	6.18E+09	76	3.40E+10
11	8.27E+07	44	6.65E+09	77	3.52E+10
12	1.09E+08	45	7.13E+09	78	3.64E+10
13	1.39E+08	46	7.65E+09	79	3.77E+10
14	1.76E+08	47	8.18E+09	80	3.89E+10
15	2.18E+08	48	8.74E+09	81	4.02E+10
16	2.67E+08	49	9.32E+09	82	4.14E+10
17	3.24E+08	50	9.92E+09	83	4.27E+10
18	3.87E+08	51	1.06E+10	84	4.40E+10
19	4.60E+08	52	1.12E+10	85	4.53E+10
20	5.41E+08	53	1.19E+10	86	4.65E+10
21	6.31E+08	54	1.26E+10	87	4.78E+10
22	7.31E+08	55	1.33E+10	88	4.91E+10
23	8.42E+08	56	1.41E+10	89	5.04E+10
24	9.64E+08	57	1.48E+10	90	5.17E+10
25	1.10E+09	58	1.57E+10	91	5.30E+10
26	1.24E+09	59	1.65E+10	92	5.43E+10
27	1.40E+09	60	1.73E+10	93	5.56E+10
28	1.58E+09	61	1.82E+10	94	5.69E+10
29	1.76E+09	62	1.91E+10	95	5.82E+10
30	1.96E+09	63	2.00E+10	96	5.94E+10
31	2.18E+09	64	2.10E+10	97	6.07E+10
32	2.41E+09	65	2.19E+10	98	6.19E+10
33	2.66E+09	66	2.29E+10	99	6.31E+10
34	2.93E+09	67	2.40E+10	100	6.44E+10

Anexo III

Protótipo do biossensor colorimétrico

Frente



Canais



Verso

