



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 5 • número 2 • p 1-7

Desenvolvimento de um nanosensor para deteção do risco de doenças cardiovasculares no âmbito do projeto CARDIOSENSOR

Este artigo visa sumariar os tópicos principais de um projeto de investigação (CARDIOSENSOR) que tem como objetivo o desenvolvimento de um nanosensor para o diagnóstico do risco de doenças cardiovasculares, através da determinação da proteína C-reactiva (CRP). Esta proteína é atualmente considerada como o melhor marcador inflamatório validado que está associado a doenças cardiovasculares. O projeto envolve tarefas tais como: 1) o desenvolvimento de sensores baseados em transístores de efeito de campo¹: montagem, otimização e validação; 2) aplicação destes sensores para a deteção da CRP em soluções padrão e comparação com um ensaio padrão validado, o ensaio imunoenzimático ELISA; e 3) a aplicação destes sensores em amostras clínicas, tais como soro humano e saliva, de forma a avaliar a sua capacidade para diagnosticar o risco de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave

doenças cardiovasculares
imunosensor
microfabricação
nanotubos de carbono
proteína C-reactiva
transístores de efeito de campo

Celine IL Justino^{1*}

Kátia R Duarte¹

Ana Cristina Freitas^{1,2}

Ruth Pereira³

Paulo Chaves⁴

Paulo Bettencourt⁴

Susana Cardoso⁵

Armando C Duarte¹

Teresa AP Rocha-Santos^{1,2}

¹ Departamento de Química & CESAM, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal.

² ISEIT/Viseu, Instituto Piaget, Viseu, Portugal.

³ Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal; CIIMAR- Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Porto, Portugal.

⁴ Universidade do Porto e Hospital de S. João EPE, Porto, Portugal.

⁵ INESC-MN, Lisboa, Portugal.

* celinejustino@ua.pt

ISSN 1647-323X

¹ Sensores baseados em transístores de efeito de campo - são dispositivos eletroquímicos para determinação de analitos.

INTRODUÇÃO

Com base nas últimas estatísticas, as doenças cardiovasculares estão entre as principais causas de perda de qualidade de vida, saúde degradada, invalidez e morte, tanto na Europa (Allender et al., 2008), como a nível mundial (Roger et al., 2012). Nesta área, a proteína C-reativa (CRP) foi reconhecida como uma das proteínas mais importantes em processos inflamatórios, sendo também o melhor marcador inflamatório validado associado a doenças cardiovasculares. A CRP é normalmente encontrada em níveis baixos no soro humano, e um aumento da sua produção até cerca de 1000 vezes ou mais, pode ser induzido durante a fase aguda da infeção e do processo inflamatório². No soro humano, os níveis de CRP inferiores a 1.0 mg/L estão associados a baixo risco de desenvolver uma doença cardiovascular, os níveis moderados estão entre 1.0 e 3.0 mg/L, e os níveis elevados podem atingir os 3.0 mg/L (Ridker, 2003) estando associados a um elevado risco de desenvolver uma doença cardiovascular. Os níveis elevados de CRP no soro estão fortemente associados a um risco elevado de doença cardíaca coronária, enfarte do miocárdio, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica e morte cardíaca súbita (Ridker, 2003; Hansson, 2005). A CRP é considerada como uma proteína imunogénica, devido ao seu elevado peso molecular (115 kDa), o que faz com que tenha uma alta especificidade de ligação com o seu anticorpo específico levando a um elevado reconhecimento molecular entre ambos (Vo-Dinh e Cullum, 2000). Além disso, os imunoenaios, ensaios bioquímicos que utilizam esta imunorreação entre antigene e anticorpo, são atualmente utilizados em análises clínicas para a deteção de CRP (Rogowski et al., 2005). No entanto, estes métodos de deteção que têm por base um princípio de funcionamento ótico são demorados e muito caros. Além disso, precisam de moléculas secundárias (em inglês labelled molecules) e de procedimentos de pré-tratamento de amostras, assim como não são métodos de leitura direta, uma vez que necessitam do desenvolvimento de reações secundárias para a deteção do analito de interesse. Como alternativa, existem os biossensores que utilizam a imunorreação denominando-se assim imunosensores, para deteção da CRP.

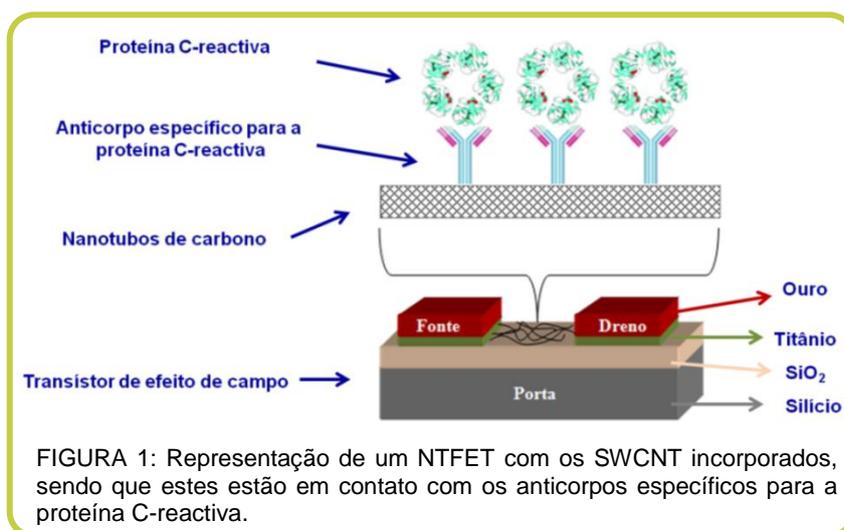
A nanotecnologia tem sido usada com sucesso nos últimos anos em várias áreas científicas desde a eletrónica até à indústria biomédica, e proporciona o desenvolvimento de materiais inovadores com características muito interessantes para o melhoramento de sistemas de diagnóstico aplicados à saúde. Desta forma, os nanotubos de carbono são um dos materiais mais usados em sensores químicos e biológicos devido às suas características químicas, físicas, mecânicas e elétricas que permitem obter dispositivos miniaturizados com elevada sensibilidade e ótimas características ao nível do desempenho analítico. A partir destas considerações, novas abordagens no desenvolvimento de dispositivos descartáveis, precisos e sensíveis, com reduzido tempo de preparação de amostra e sem pré-tratamento da amostra são ainda necessárias nesta área. O projeto CARDIOSENSOR, financiado por fundos europeus (FEDER – Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional) no âmbito do Programa Operacional Factores de Competitividade (COMPETE) e por fundos portugueses através da FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal) consiste no desenvolvimento de um nanosensor para diagnosticar o risco de doenças cardiovasculares, através da determinação dos níveis de CRP em amostras clínicas, como soro humano e saliva.

² Processo inflamatório - processo que ocorre no corpo humano devido à presença de infeção.

Neste artigo pretende-se obter uma visão geral dos vários passos que estão envolvidos neste projeto, assim como apresentar os principais resultados já obtidos, e uma perspectiva futura sobre a possível aplicação de nanosensor no diagnóstico adequado das doenças cardiovasculares em pacientes.

ÂMBITO DO PROJETO CARDIOSENSOR

No âmbito do projeto CARDIOSENSOR, os nanosensores descartáveis são baseados em transístores de efeito de campo (FET) com nanotubos de carbono de parede única (SWCNT), constituindo assim dispositivos NTFET, para a deteção de CRP através de imunoreação. Os FET têm dois contatos à superfície: a fonte e o dreno, e um terceiro contato: a porta, separado dos outros dois por uma fina camada isoladora de dióxido de silício (SiO_2), tal como se mostra na Figura 1. Genericamente, o princípio de funcionamento de um NTFET consiste na passagem de corrente entre a fonte e o dreno através dos SWCNT, que funcionam como portadores de carga. A passagem de corrente depende da tensão aplicada e da resistência dos SWCNT sendo esta corrente modulada pelo contato porta.



O projeto envolve várias tarefas, algumas delas já desenvolvidas, ou seja, 1) microfabricação dos dispositivos FET e estudo dos melhores parâmetros geométricos desses dispositivos, a fim de melhorar o seu desempenho como sensor; 2) preparação de dispersão de SWCNT, a fim de obter soluções individuais e dispersas de SWCNT (aplicação de um desenho experimental para encontrar estatisticamente as melhores condições experimentais para a dispersão de SWCNT) e caracterização espectroscópica para identificar as estruturas eletrônicas e vibracionais da dispersão de SWCNT; 3) montagem dos dispositivos FET (denominados de NTFET, ou seja, transístores de efeito de campo com nanotubos de carbono) e respetiva caracterização elétrica; 4) aplicação de dispositivos NTFET para soluções padrão de CRP, e estudo do seu desempenho analítico.

O projeto também contempla outras tarefas tais como a aplicação de sensores para a deteção de CRP em amostras clínicas, tais como soro humano e saliva e a comparação dos resultados com os imunoenaios convencionais (por exemplo, ELISA) (Justino et al., 2014). Os resultados obtidos a partir de saliva e soro foram comparados entre si, a fim de saber se a saliva pode constituir um fluido biológico potencial para realizar a análise não-invasiva da CRP, pois a recolha de saliva é mais fácil do que a recolha de sangue, e é efetuada sem dor. A colheita de sangue (amostragem invasiva) e saliva (amostragem não-invasiva) foi feita em indivíduos sem problemas de saúde e em pessoas que sofrem de várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, a fim de estudar a correlação entre os níveis de CRP e a incidência de doenças. Foram

também feitos questionários a todos os pacientes voluntários, a fim de identificar o seu historial clínico e hábitos diários que poderão interferir com os níveis de CRP.

DESCRIZAÇÃO DOS TÓPICOS ENVOLVIDOS NO PROJETO CARDIOSENSOR

Dispersão de nanotubos de carbono de parede simples

A dispersão aquosa de nanotubos de carbono de parede única (SWCNT), que se mostra na Figura 2, foi efetuada em soluções aquosas de colato de sódio (0.2% w/v, SC). Processos físicos, tais como sonicação e centrifugação foram utilizados para desagregar os SWCNT dispersos, e para remover as impurezas de carbono (por exemplo, carbono amorfo e grafite), respetivamente. A dispersão final de SWCNT (com concentração de 0.28 mg/mL) foi caracterizada por espectroscopia de Raman e por espectrometria de ultravioleta-visível para obter as características eletrónicas e estruturais dos SWCNT. Posteriormente aplicou-se essa dispersão de SWCNT na montagem de NTFET que funcionam como biossensores neste projeto.

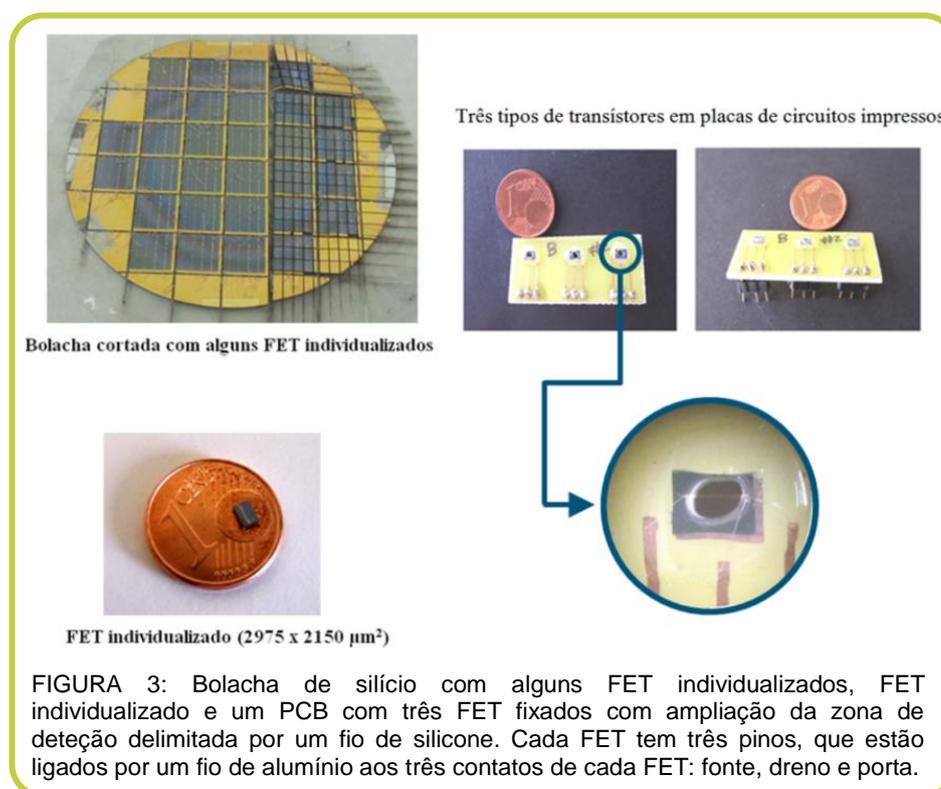


FIGURA 2: Dispersões de SWCNT.

Microfabricação de dispositivos FET

A microfabricação de transístores de efeito de campo (FET) foi baseada em técnicas convencionais de microfabricação tendo sido usada uma bolacha de silício como substrato (suporte para a microfabricação). As várias técnicas utilizadas estão apresentadas num artigo publicado (Justino et al., 2013). O último passo é o corte da bolacha para obter FET individualizados ($\sim 3 \times 2 \text{ mm}^2$), que foram posteriormente fixados numa placa de circuito impresso

(PCB), onde cada elétrodo (contato) do FET foi ligado com um fio de alumínio a um pino soldado do PCB, tal como se apresenta na Figura 3, e proteção de todas as ligações de alumínio com silicone, definindo também um orifício que será usado como zona de deteção para os ensaios bioquímicos, também apresentado na Figura 3. Várias combinações de parâmetros geométricos diferentes (a distância entre os elétrodos, o



número de elétrodos e a espessura da camada de ouro) dos vários dispositivos FET foram estudadas de forma a verificar o respetivo sinal elétrico, ou seja, os dispositivos FET com resistências mais baixas serão seleccionados para os ensaios com FET como sensores da CRP.

Montagem dos NTFET

Uma gota da dispersão de SWCNT (Figura 2) foi colocada sobre a superfície dos FET microfabricados. Depois de 5 minutos, a gota de SWCNT foi evaporada com um fluxo de azoto de modo a formar uma rede de ligação entre os elétrodos dos FET (contatos) com os SWCNT depositados, obtendo assim os transístores de efeito de campo com nanotubos de carbono de paredes simples (NTFET). O sinal elétrico foi medido com um analisador HP4155C (Japão) utilizando o software Desktop EasyExpert para a aquisição de dados em tempo real e à temperatura ambiente. Os contactos fonte, dreno e porta dos dispositivos FET foram ligados através de cabos crocodilo dentro de uma câmara fechada (Agilent 16442A, Japão), tal como se apresenta na Figura 4. Nessa câmara, cada dispositivo foi posicionado e ligado aos terminais para as várias medições (Figura 4).

Como a imunoreação foi utilizada para a transdução de sinal dos dispositivos NTFET, uma gota de solução de anticorpo (anti-CRP) foi pipetada na superfície dos NTFET, os quais foram posteriormente armazenados durante 12 horas, a 4°C. As soluções padrão diluídas de CRP, com concentrações entre 10^{-3} a 10^2 µg/mL, foram preparadas através de diluições em série a partir de uma solução mãe de 10^2 µg/ml. Cerca de 1 µl de cada solução de CRP foi

sucessivamente colocada na superfície dos NTFET. Após 15 minutos de incubação, a superfície do NTFET foi lavada com água destilada e, em seguida, o sinal elétrico foi medido. O sinal analítico foi considerado como a variação da corrente para cada concentração de CRP após a sua interação com os anticorpos específicos.

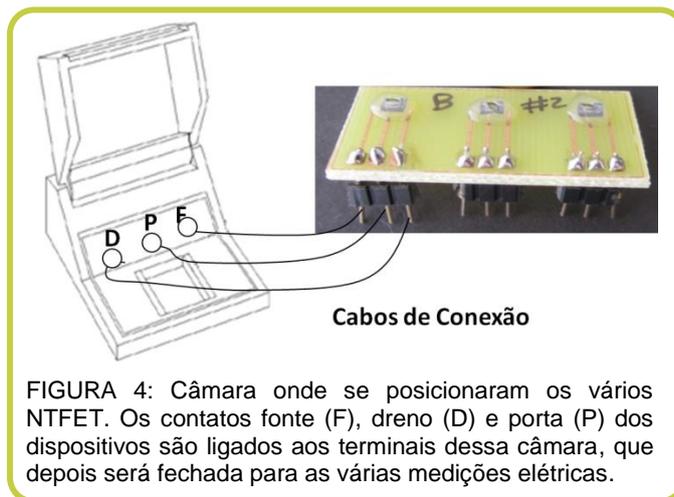


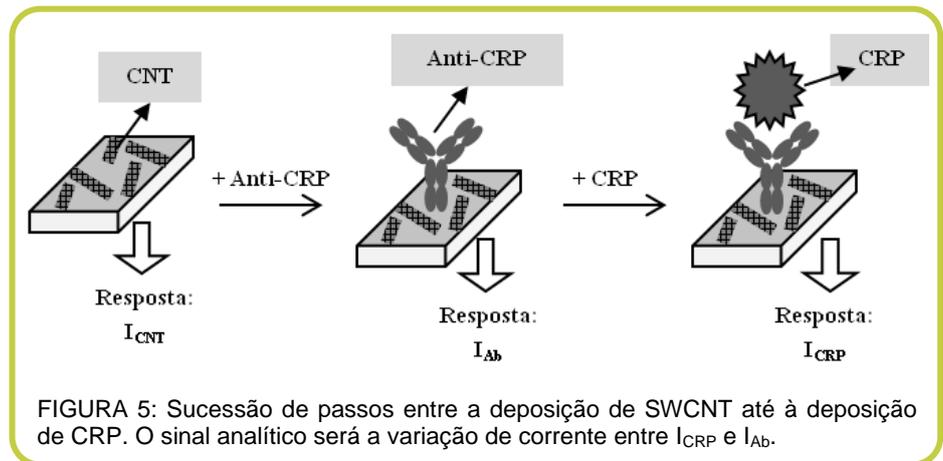
FIGURA 4: Câmara onde se posicionaram os vários NTFET. Os contactos fonte (F), dreno (D) e porta (P) dos dispositivos são ligados aos terminais dessa câmara, que depois será fechada para as várias medições elétricas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os SWCNT dispersos foram caracterizados por espectroscopia de Raman e por espectrometria de ultravioleta-visível, para se poder verificar se a dispersão de SWCNT se encontrava adequada para a sua utilização nos NTFET, ou seja, através das bandas de cada espetro (gráfico obtido pelas espectroscopias), verificou-se que a dispersão de SWCNT contém CNT metálicos e semicondutores, e que os CNT têm diâmetros entre 0.9 e 1.8 nm (Justino et al., 2013). Os SWCNT foram, depois, depositados sobre a superfície dos FET para proceder à montagem dos dispositivos NTFET para a aplicação de dispositivos de NTFET como imunossensores a fim de determinar a CRP em soluções padrão. Os dispositivos NTFET foram eletricamente caracterizados. Os diagramas esquemáticos das etapas sucessivas a partir da deposição de SWCNT na superfície dos FET até à aplicação dos NTFET para a CRP são mostrados na Figura 5. Quando se depositaram os anticorpos específicos para CRP (anti-CRP), ou seja, após se ter modificado a superfície de deteção com os anti-CRP, observou-se que os valores de corrente (I_D) diminuíram após essa imobilização, o que sugere a absorção de tais biomoléculas carregadas eletricamente na superfície dos SWCNT. Por sua vez, quando se depositaram as várias soluções-padrão de CRP em diferentes concentrações (10^{-3} e 10^2 µg/mL), a resposta analítica dos dispositivos NTFET, a qual foi considerada como

a alteração nos valores de I_D , após a interação da CRP com os seus anticorpos específicos, diminui com a concentração de CRP, que pode ser devido à interação antígeno-anticorpo que provoca deformações geométricas nos SWCNT.

Verificou-se igualmente que existe uma forte correlação entre a resposta analítica e a concentração de CRP através de um coeficiente de correlação de 0.9809, ou seja, próximo de 1, que seria uma correlação perfeita. Mais pormenores analíticos podem ser encontrados em artigos recentes com



este trabalho. Verifica-se assim que estes nanosensores não necessitam de pré-tratamento da amostra sendo o tempo de análise reduzido, uma vez que o analisador utilizado trabalha em tempo real havendo passagem de corrente elétrica instantânea pelos sensores. Os dados recolhidos pelo software identificado na secção anterior, podem ser tratados em poucos minutos, facilitando a monitoração da CRP.

CONCLUSÃO

O maior impacto científico do projeto CARDIOSENSOR é proporcionar dispositivos adequados e descartáveis que podem melhorar o diagnóstico do risco de doenças cardiovasculares em indivíduos, por meio de uma metodologia não-invasiva. A fabricação de dispositivos FET, a montagem dos dispositivos NTFET através da deposição de SWCNT, bem como a aplicação de dispositivos de NTFET às soluções padrão de CRP foram realizadas.

A colheita de amostras clínicas e questionários sobre o historial clínico e hábitos diários de saúde em indivíduos voluntários foi feita para aplicação de dispositivos NTFET desenvolvidos para tais amostras clínicas, ou seja, o sangue por amostragem invasiva, e saliva por amostragem não-invasiva.

A saliva é uma matriz com uma elevada abundância de moléculas com elevado potencial clínico podendo ser recolhido com uma metodologia não-invasiva. Assim, a saliva pode ser usada em aplicações clínicas para a monitorização do estado clínico e da progressão da doença pois incorpora biomarcadores específicos associados a doenças. Os resultados obtidos através de dispositivos NTFET e os dos ensaios padrão com ELISA foram comparados para fornecer a validação de dispositivos NTFET desenvolvidos. Além disso, os resultados de deteção de CRP no sangue e na saliva foram comparados, tendo-se registado uma correlação entre os níveis de CRP nestes dois fluidos biológicos; esta correlação pode ser usada para desenvolver um protótipo de dispositivos NTFET para a monitorização de CRP por uma metodologia não-invasiva.

agradecimentos • Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) no âmbito do Programa Operacional Factores de Competitividade (COMPETE) e por fundos nacionais pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) no âmbito do projeto de investigação CARDIOSENSOR (referências FCOMP-01-0124-FEDER-010902 e PTDC/SAU-BEB/099042/2008). Os autores também agradecem à FCT a atribuição de bolsas de Doutoramento (SFRH/BD/60429/2009) e pós-Doutoramento (SFRH/BPD/65410/2009 e SFRH/BPD/73781/2010) através dos fundos atribuídos pelo Quadro de Referência Estratégico Nacional-Programa Operacional Potencial Humano (QREN-POPH) co-financiados pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernandez R, Gray A (2008). European cardiovascular disease statistics – 2008. *Health Economy* 2008: 1-112.
- Justino CIL, Rocha-Santos TAP, Amaral JP, Cardoso S, Duarte AC (2013). Effects of geometry parameters of NTFET devices on the I-V measurements. *Solid State Electronics* 81: 32-34.
- Justino CIL, Duarte K, Lucas S, Chaves P, Bettencourt P, Freitas AC, Pereira R, Cardoso S, Duarte AC, Rocha-Santos TAP (2014). Assessment of cardiovascular disease risk using immunosensors for determination of C-reactive protein levels in serum and saliva: a pilot study. *Bioanalysis* 11: 1459-1470.
- Ridker PM (2003). Clinical application of C-reactive protein for cardiovascular disease detection and prevention. *Circulation* 107: 363-369.
- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB (2012). Heart disease and stroke statistics - 2012 update. A report from the American Heart Association. *Circulation* 125: 2-220.
- Rogowski O, Vered Y, Shapira I, Hirsh M, Zakut V, Berliner S (2005). Introducing the wide range C-reactive protein (wr-CRP) into clinical use for the detection of microinflammation. *Clinica Chimica Acta* 358: 151-158.
- Vo-Dinh T, Cullum B (2000). Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 366: 540-551.