

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

Ensaio de glucose baseado em papel

objetivos de aprendizado

Os alunos serão capazes de:

- Usar um dispositivo analítico baseado em papel para medir as concentrações de glucose.
- Usar colorimetria de imagem digital para determinar quantitativamente as concentrações de glucose.
- Realizar uma subtração de fundo colorimétrica usando intensidades de pixel.
- Desenvolver e usar uma curva analítica para determinar uma concentração desconhecida.

Histórico - Dispositivos de diagnóstico baratos e de implantação rápida

A glucose é um dos vários biomarcadores importantes que podem ser usados pelos profissionais de saúde para avaliar o estado de saúde de uma pessoa. A concentração de glucose no sangue e na urina pode ajudar a determinar se uma pessoa está processando açúcares adequadamente e pode auxiliar no diagnóstico de certas doenças. Por exemplo, concentrações elevadas de glucose na urina são frequentemente indicativas de diabetes. Usando as reações descritas abaixo, você tentará determinar a concentração de glucose em uma solução desconhecida usando materiais simples (por exemplo, pipetas de transferência de papel e plástico) e equipamentos prontamente disponíveis (por exemplo, um smartphone). Ao realizar este experimento, você contribuirá para uma área crescente de pesquisa científica focada no desenvolvimento de ensaios clínicos muito simples e baratos que podem ser usados para diagnosticar doenças em áreas onde especialistas médicos treinados e instrumentação altamente especializada não estão disponíveis.

O papel, normalmente feito de celulose, é um substrato atraente para a realização de ensaios de diagnóstico no local

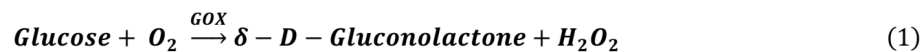
Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

de atendimento porque é barato, amplamente disponível e absorve fluidos por ação capilar. Ao padronizar um pedaço de papel com uma cera hidrofóbica, é possível criar canais e zonas em um pedaço de papel que podem ser usados para realizar ensaios usando pequenas quantidades de reagentes e amostras. Dispositivos feitos de papel padronizado são conhecidos como dispositivos analíticos baseados em papel microfluídico ou microPADs. Ensaios que produzem uma mudança de cor são especialmente passíveis de serem realizados em microPADs porque a mudança de cor pode ser observada a olho nu e, quando resultados quantitativos são desejados, a intensidade da cor produzida pelo ensaio pode ser medida usando um smartphone em um processo conhecido como colorimetria de imagem digital (DIC).

Para realizar o ensaio de glucose, você primeiro preparará três soluções padrão de glucose de concentração conhecida por diluição em série. Você então testará os padrões, preparará uma curva de calibração e testará uma amostra de glucose desconhecida. Como a glucose é o reagente limitante na reação do ensaio, a intensidade da cor produzida no dispositivo deve ser proporcional à concentração de glucose em cada amostra.

Reações químicas

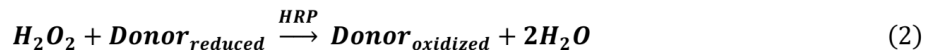
Os microPADs contêm duas enzimas e um corante que permitirá visualizar e quantificar essa quantidade de glucose em uma solução. Quando uma solução contendo glucose é adicionada ao microPAD, a glucose reage com o oxigênio do ar para produzir δ -D-gluconolactona e peróxido de hidrogênio conforme representado na reação a seguir:



Essa reação é catalisada pela enzima glucose oxidase (GOX). Como ambos os produtos são incolores sob luz visível, usaremos uma segunda reação como um indicador de que a primeira reação ocorreu. O produto de peróxido de hidrogênio da primeira reação passará por uma segunda reação com um

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

doador de elétrons, um corante neste caso, para reduzi-lo ainda mais, conforme descrito na reação 2:



O corante que será utilizado nesta atividade é o ácido 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS).

O ABTS, que é incolor em seu estado reduzido, torna-se azul-esverdeado quando é oxidado. Essa segunda reação é catalisada pela enzima peroxidase de raiz forte (HRP), de modo que, à medida que o peróxido de hidrogênio é produzido pela primeira reação, ele é imediatamente consumido na segunda reação. O número de moléculas de ABTS oxidadas ao estado azul-esverdeado dependerá da quantidade de glucose presente na solução testada, portanto, a intensidade da cor pode ser utilizada para quantificar a quantidade de glucose presente nas soluções depositadas no microPAD.

Procedimento - Análise Quantitativa de Glucose usando microPADs

Segurança

- Use óculos de segurança e luvas (fornecidas no kit).
- Trabalhe em uma superfície plana, limpa e não porosa (por exemplo, uma bancada de cozinha).
- Mantenha seus dispositivos eletrônicos e quaisquer outros objetos de valor que possam ser danificados pela água em local seguro distância durante a execução da atividade.
- Não coma ou beba durante a realização da atividade.
- Limpe a superfície de trabalho com água e lave as mãos após concluir a atividade.

Materiais

- MicroPAD com 5 áreas de ensaio e pré-carregado com peroxidase de rabanete, glucose oxidase e ABTS

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

- Água DI (tubo de centrífuga de 15 mL)
- soluções de glucose 0,120 mol/L e 0,080 mol/L)
- 4 tubos de microcentrífuga vazios (transparentes)
- Toalhas de papel
- Suporte para tubos de microcentrífuga
- Marcador permanente.

Preparação da solução

Tubo S1: adicione 10 uL de uma solução de glucose 0,120 mol/L e complete para 1 mL.

Tubo U: adicione 10 uL de uma solução de glucose 0,080 mol/L e complete para 1 mL.

Em seguida, você preparará dois padrões adicionais (S2 e S3) diluindo a solução estoque (S1).

1. Coloque 4 tubos de microcentrífuga no suporte de tubos.
2. Usando o marcador permanente, identifique o tubo como "S1", "U" e os tubos vazios da microcentrífuga como "S2" e "S3".
3. Usando uma micropipeta coloque 0,5 mL de água nos tubos S2 e S3.

Tubo	Volume/mL
S1	1.0
S2	0.5
S3	0.5
U	1.0

4. Transfira 0,5 mL do tubo S1 para o tubo S2, tampe e agite.
5. Transfira 0,5 mL do tubo S2 para o tubo S3. Tampe e agite o tubo S3 para misturar bem a solução.

Nota: Depois de preparar as soluções padrão, você deve ter 0,5 mL de S1, 0,5 mL de S2 e 1 mL de S3.

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

6. Destape o tubo de microcentrífuga e coloque cada pipeta de transferência em seu tubo correspondente.

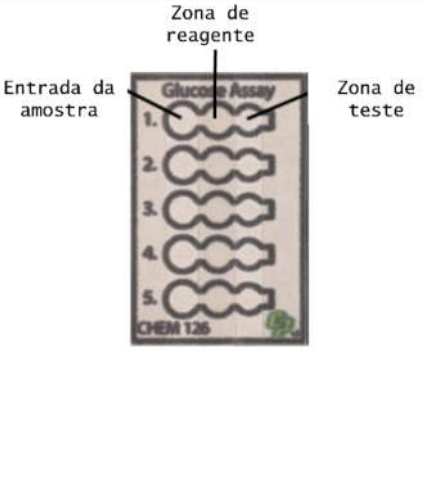
Análise de Glucose

Solução reagente:

Glucose oxidase 400 U/mL, peroxidase de rabanete 550 U/mL, ABTS 7,5 mg/mL, BSA 10 mg/mL e tampão fosfato salino (PBS).

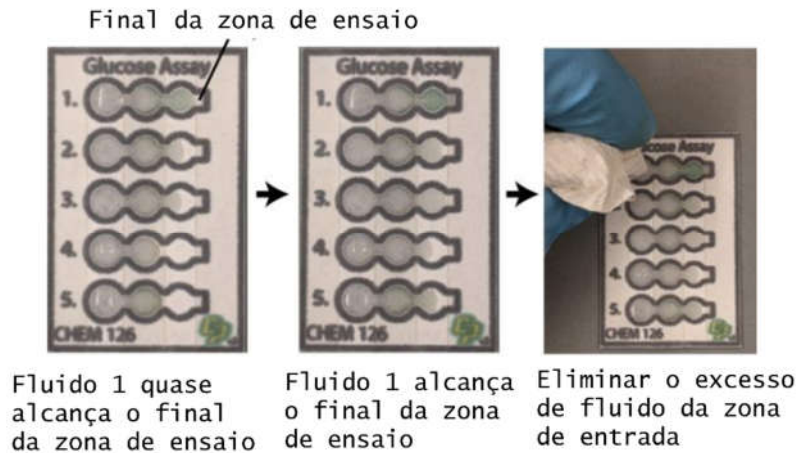
0. **Opcional:** prenda com fita adesiva os cantos do microPAD na superfície de trabalho.

1. 1 μ L da solução reagente foi dispensada em cada zona reagente nos microPADs e seca em condições ambientais por 10 min
2. Adicione cuidadosamente uma gota de solução a cada entrada de amostra no microPAD na seguinte ordem:

Entrada da amostra	Amostra	
1	S1	
2	S2	
3	S3	
4	DI água (0 mM)	
5	U	

3. Assim que a solução atingir o final da área de análise, limpe qualquer amostra restante da entrada da amostra usando uma toalha de papel.

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.



4. Depois de secar a última entrada de amostra, deixe os testes secarem por mais 20 minutos. Uma cor azul/verde deve se desenvolver em cada zona de teste como resultado da oxidação do ABTS.

5. Coloque o dispositivo em uma área bem iluminada e, usando um smartphone, tire uma foto do dispositivo. Tente evitar sombras sobre o dispositivo (é fundamental que todas as zonas de teste estejam sob a mesma luz) e mantenha o telefone nivelado. Às vezes, pode ser útil aumentar um pouco o zoom (2x-4x) para que você possa manter a câmera um pouco mais longe do dispositivo.

Colorimetria de imagem digital

1. Baixe o aplicativo “Pixel Picker” para iPhone ou “Color Grab” para Android em seu celular.



“Pixel Picker” – Andrea Bizzotto
For iPhone:



“Color Grab” – Loomatix

Para iPhone:


2. Abra o aplicativo. Clique no ícone da imagem (canto inferior esquerdo) e selecione sua imagem do microPAD. Nota:

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

Todos os seus dados devem vir de uma única imagem para garantir foco consistente e condições de iluminação para todas as zonas de teste.

3. Mova o alvo para o centro da primeira zona de teste.
4. Registre a intensidade do pixel do canal vermelho (este é o número acima do R na parte superior da tela) em seu notebook. Valores mais baixos correspondem a cores mais escuras.
5. Mova o alvo ligeiramente para a direita do centro (certifique-se de que o ponto do alvo ainda está na zona de teste) e registre a intensidade do pixel do canal vermelho. Em seguida, mova o alvo ligeiramente para a esquerda do centro (certifique-se de que o ponto do alvo ainda esteja na zona de teste) e registre a intensidade do pixel do canal vermelho. Este processo lhe dará um total de três medições para cada zona de teste. Como você pode observar, a distribuição de cores nas zonas de teste não é muito uniforme, portanto, fazendo medições repetidas da mesma zona, é possível melhorar a precisão dos resultados.
6. Mova o alvo para o centro da segunda zona de teste e repita os passos 4 e 5 para obter três medições.
7. Repita a etapa 6 para as zonas de teste restantes.

Para Android:

2. Abra o aplicativo. Clique no ícone  de configurações no menu superior. Clique em "Camera Left Cell" e selecione "RGB" no menu. Em seguida, clique em "Camera Right Cell" e selecione também "RGB". Você pode deixar todas as outras configurações padrão.

3. Clique no ícone de imagem  no menu superior e selecione sua imagem do microPAD.

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

Nota: Todos os seus dados devem vir de uma única imagem para garantir foco consistente e condições de iluminação para todas as zonas de teste.

4. Clique no ícone de cadeado (canto superior direito da tela).
5. Arraste o seletor de cores para colocar o pequeno círculo no centro da primeira zona de teste.
6. Toque no ícone do conta-gotas (canto inferior direito da tela) para gravar a cor deste ponto.
7. Arraste o seletor de cores ligeiramente para a direita do centro (certifique-se de que o pequeno círculo ainda esteja na zona de teste) e toque no ícone do conta-gotas. Em seguida, arraste o seletor de cores levemente para a esquerda do centro (certifique-se de que o pequeno círculo ainda esteja na zona de teste) e toque no ícone do conta-gotas. Este processo lhe dará um total de três medições para cada zona de teste. Como você pode observar, a distribuição de cor nas zonas de teste não é muito uniforme, portanto, fazendo medições repetidas da mesma zona, é possível melhorar a precisão dos resultados.
8. Mova o seletor de cores para o centro da segunda zona de teste e repita as etapas 6 e 7 para obter três medições.
9. Repita a etapa 8 para as zonas de teste restantes.
10. Clique no ícone de marca de seleção azul (canto inferior direito da tela) e, em seguida, clique no ícone do copo (canto inferior direito da tela) para ver os resultados, que serão exibidos em ordem cronológica inversa. O aplicativo exibirá os valores de intensidade de pixel RGB (vermelho, verde e azul) para cada medição. Valores mais baixos correspondem a cores mais escuras.
11. Registre as intensidades de pixel do canal vermelho (o primeiro número do conjunto de três números entre parênteses rotulados como RGB) para cada medição.

Experimental Biotecnologia II: Determinação de Glucose por biossensor baseado em papel.

12. Para excluir as informações armazenadas, clique no ícone da lixeira no menu superior.

Análise de dados

1. Calcule as concentrações de glucose nas três soluções padrão (S1, S2 e S3) em unidades de mM.
2. Insira seus dados em uma planilha do Excel e calcule o valor médio da intensidade da cor para cada conjunto de três medições replicadas. Isso dará o sinal médio para cada solução.
3. Calcule o sinal corrigido de fundo para cada solução subtraindo o sinal médio de cada solução do sinal médio para água desionizada (0 mM).
4. Prepare um gráfico de dispersão no Excel de sinal (intensidade de cor corrigida de fundo) vs. concentração de glucose (mM) para seus padrões. Inclua o ponto para água. Encaixe os dados com uma linha de tendência linear e exibir a equação e o valor R^2 no gráfico. Certifique-se de rotular seus eixos. Observação: Se seu dispositivo falhou em um de seus padrões (por exemplo, o líquido não penetrou na zona de teste), você pode excluí-lo ao fazer sua curva padrão. Indique se você precisou excluir algum ponto de dados em seu relatório. Você não pode excluir a água DI, pois ela é necessária para a subtração de fundo.
5. Use a equação de sua curva de calibração para determinar a concentração de sua amostra desconhecida em mM.
6. Depois de saber a concentração do desconhecido, determine a massa de glucose que estava presente no tubo verde desconhecido da microcentrífuga.