

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE BAIXO CUSTO

Caio Cesar M Davi – caio@poli.br
Elton Max Nascimento do Egito– eltonegito@yahoo.com.br
Paulo Henrique Epifânio de Oliveira – pfanio@gmail.com
Rosa Fireman Dutra – firemandutra@yahoo.com.br
Universidade de Pernambuco
Av. Agamenon Magalhães, s/n - Santo Amaro
CEP: 50.100-010 – Recife – Pernambuco

Resumo: *Uma das áreas de maior e mais rápido crescimento é a de desenvolvimento de sensores eletroquímicos, principalmente, devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, as quais têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (FREIRE et al., 2003). Neste trabalho é proposta uma metodologia para o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico de baixo custo. Como estudo de caso foi abordado a concepção de um biossensor reativo à glicose, mantendo sempre o foco na técnica aplicada. A metodologia consistiu de quatro etapas principais: confecção, calibração, testes e comparação dos resultados do biossensor. Foi constatado que o eletrodo proposto foi responsivo ao teste da glicose tanto em experimentos com soluções preparadas em tampão quanto em amostras biológicas (soro humano). Desta maneira foi comprovada a eficiência da metodologia proposta e a possibilidade de confecção de um biossensor de baixo-custo.*

Palavras-chave: *Biossensor, Glicosímetro, Voltametria Cíclica.*

1 INTRODUÇÃO

O Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas (PPGES) da Universidade de Pernambuco (UPE - <http://www.upe.br>) é composto por duas linhas de pesquisa: Cibernética e Telemática. O presente trabalho relata as experiências realizadas como projeto principal da disciplina Sensores e Biossensores, disciplina pertencente à vertente Cibernética. No dito projeto, desenvolvido no laboratório de Pesquisa em Diagnóstico/LAPED localizado e sediado no Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) da UPE, os discentes foram incitados a construir um biossensor eletroquímico sensível à glicose.

O desenvolvimento de sensores eletroquímicos é uma das áreas de maior e mais rápido crescimento, principalmente, devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, os quais têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (FREIRE et al., 2003). Dentre os sensores, os eletroquímicos têm apresentado maior desenvolvimento nos últimos anos devido à possibilidade de desenvolver testes analíticos simples, rápidos e de

baixo custo para a determinação de importantes compostos químicos e biológicos em concentrações muito baixas (ALFAYA & KUBOTA, 2002). Além disso, existe um grande comprometimento na minimização do custo de desenvolvimento do sensor, tendo em vista que quase 11 milhões de brasileiros (SBD, 2010) são afetados pela doença e destes cerca de 2 milhões são cadastrados no programa informatizado de cadastramento e acompanhamento de Diabetes e Hipertensão do Sistema Único de Saúde (SIS-Hiperdia, 2010).

2 METODOLOGIA

A metodologia utilizada pode ser dividida (apenas para fins didáticos) em quatro etapas: definição dos materiais utilizados, confecção do biossensor, calibração do sistema e a realização de testes e análise dos resultados.

2.1 Materiais

A água utilizada na preparação das substâncias foi deionizada. A célula eletroquímica foi composta por três eletrodos, sendo um contra eletrodo, um eletrodo de trabalho (construído pelos discentes e mantendo compromisso com o baixo custo) e um eletrodo de referência. Para pesagem de substâncias, foi utilizada uma balança ultra-sensível. Pipetas automaticamente calibradas e com ponteiros descartáveis foram utilizadas na aquisição de volume. O programa computacional *Ivium Start* (Ivium Technologies, 2011), instanciado à célula eletroquímica, foi utilizado para análise voltamétrica. O programa *Origin 6.0* (Originlab, 2011) foi escolhido para manipulação dos dados obtidos através da voltametria e para a posterior confecção dos gráficos.

2.2 Confecção do Biossensor

O custo foi uma das preocupações constantes durante a concepção do modelo de eletrodo, mantendo sempre comprometimento com a eficiência do mesmo. Os compostos utilizados na confecção da pasta homogênea de carbono foram: tetracianoquino-dimetano (TCNQ), óleo mineral, grafite em pó, glicose oxidase (GOD) e glutaraldeído (GLUT). A Figura 1 exemplifica o esquema físico do eletrodo construído

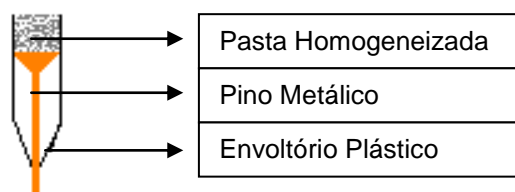


Figura 1 - Esquematização física dos eletrodos utilizados

Para averiguar quais seriam as melhores concentrações de cada material que compõe a pasta homogênea foram realizados ensaios com diferentes distribuições das mesmas, no total foram elaboradas três diferentes pastas e estas submetidas a análise voltamétricas, utilizando como sonda redox a solução de ferricianeto/ ferrocianeto (Ferri-Ferro) de potássio e, posteriormente, uma solução tampão de fosfato de sódio. As concentrações de cada componente nas pastas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações dos componentes das pastas homogeneizadas.

Composto	Eletrodo 1	Eletrodo 2	Eletrodo 3
Glicose Oxidase (GOD)	7 mg (8,86%)	13 mg (9,84%)	15 mg (9,37%)
Óleo Mineral (Vegetal)	24 mg (30,37%)	53 mg (40,15%)	79 mg (49,37%)
Grafite em Pó	35 mg (44,30%)	58 mg (43,93%)	66 mg (41,25%)
Mediador (TCNQ)	13 mg (16,45%)	8 mg (6,06%)	0 mg (0%)

O desenvolvimento de técnicas de imobilização têm sido importante para proporcionar a reutilização das superfícies, para reduzir custos e aumentar a estabilidade enzimática (Silva, ACM, 2009). Esses fatores dependem, principalmente, da escolha apropriada do suporte e dos reagentes utilizados no processo de imobilização (ORDÓÑEZ & FÁBREGAS, 2007; WU, L. et al., 2007). Numa primeira tentativa de imobilização foi adicionado GOD a mistura para formar uma matriz de imobilização (“*entrapment*”), porém por não terem obtidos bons resultados com este procedimento, optou-se por imobilizar a GOD via ligação cruzada com glutaraldeído e o TCNQ foi usado como mediador. O uso de mediadores de elétrons é um recurso bastante empregado na elaboração de EIs modificados, sendo os mais comumente utilizados: cobalto-ftalocianina, tetracianoquinodimetano (TCNQ), tetratiafulvaleno (TTF) e derivados de ferroceno (GHICA & BRETT, 2005). Desta maneira foi preparada uma solução de 100 µ L de glutaraldeído a 2,5% e 100 µ L da enzima GOD. Então, o eletrodo ficou submerso em um microtubo (1 ml) de GLUT por 45 minutos e posteriormente no ependófilo contendo GOD por 1 hora, tempo suficiente para imobilização da enzima na superfície do eletrodo.

2.3 Calibração do Sistema

Para a caracterização dos eletrodos confeccionados foi realizada repetidas vezes a técnica eletroquímica de voltametria cíclica. A princípio foi estudado o comportamento dos eletrodos diante da sonda redox de ferricianeto/ ferrocianeto de potássio, para averiguar sua eficiência em propriedades como condutividade e resposta de pico. Conforme pode ser visto na Figura 2, os eletrodos reagiram bem ao teste comprovando sua eficiência. O fato do Eletrodo nº 1 apresentar dois picos (representado na Figura 2– a) pode ser explicado pela presença de dois mediadores em grandes concentrações (lembrando que a pasta utilizada neste eletrodo detém 16,45% de TCNQ). Os picos evidenciados são os picos de reação do TCNQ e do Ferri-Ferro. Vale salientar que, apesar de conter TCNQ, o eletrodo nº 2 não apresentou dois picos (em ambas as varredura do ciclo), mas sim uma ampliação dos picos. Este comportamento ocorre provavelmente devido a uma concentração menor do TCNQ (6,06%). Também é importante notar que foi na experiência nº 3 (representada pela Figura 2 - c) que os picos do mediador Ferri-Ferro ficaram mais bem definidos, provavelmente devido à ausência de qualquer outro mediador.

A segunda etapa para calibração dos eletrodos foi o estudo do comportamento do sistema numa solução tampão de Fosfato de Sódio. Esta etapa está representada pela Figura 2 – d) e e)

f). Desta vez o eletrodo n° 1 (Figura 2 – d) apresenta as curvas mais bem definidas do experimento, causadas provavelmente pela maior concentração do mediador TCNQ e ausência de outros mediadores. Já o eletrodo n° 3 (Figura 2 –f) não apresenta picos de oxidação e redução devido a ausência de mediadores (lembrando que o eletrodo 3 contém 0% de TCNQ).

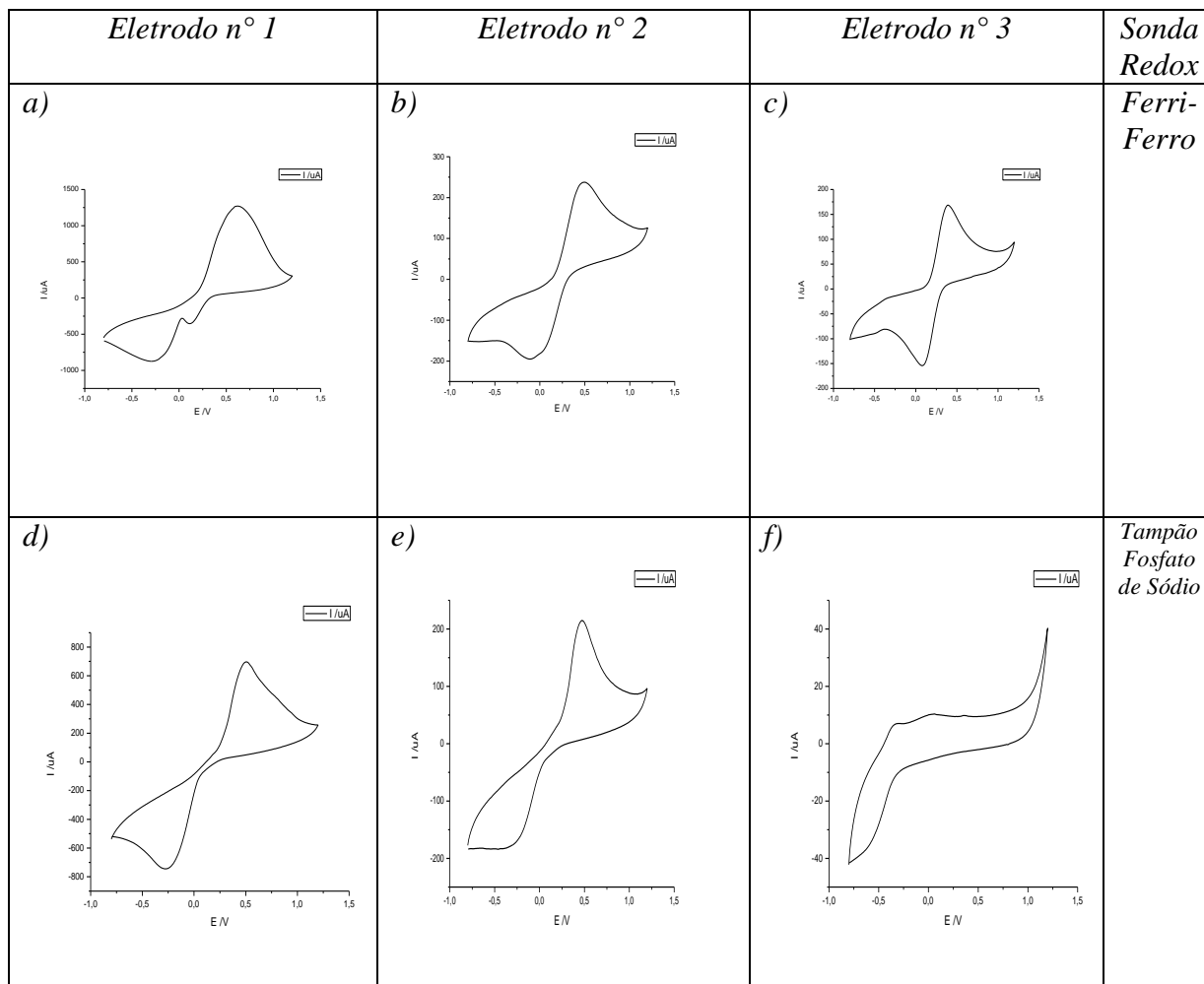


Figura 2 - caracterização de picos das sondas redox utilizadas frente aos três diferentes tipos de eletrodos.

3 TESTES E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após a obtenção dos padrões de picos anódicos e catódicos dos meios utilizados como sonda redox, as voltmetrias cíclicas foram realizadas utilizando-se soluções com diferentes concentrações de glicose (0 mg/dL, 35 mg/dL, 70 mg/dL, 105 mg/dL e 140 mg/dL), numa velocidade de varredura de 100 mV/s, escala de corrente de 500 μ A e numa região de potencial de -0,8 V a +0,8 V, através de uma célula eletroquímica. As curvas de calibração (Figura 3 e Figura 4) foram obtidas em diferentes tipos de concentrações de glicose na célula eletroquímica.

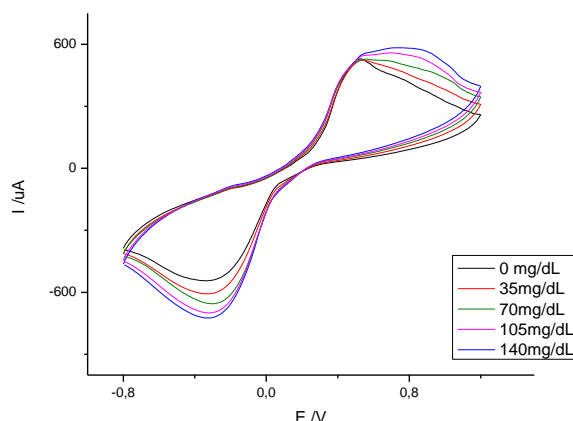


Figura 3 - Curva de Calibração do Eletrodo n° 1. Concentração relacionada à dispersão de Glicose na solução de tampão utilizada como sonda redox.

É de se notar a consistência dos dados extraídos da curva do eletrodo n° 1 (Figura 3). Ela apresenta, além de dos seus picos bem definidos, uma boa margem de diferença entre os experimentos realizados em diferentes concentrações de glicose.

Resultados satisfatórios também foram obtidos a partir das análises voltamétricas do eletrodo n° 3 (Figura 4). Apesar de ser por uma pequena margem de separação, este eletrodo consegue apresentar uma curva bem definida. A diminuição numérica em relação à corrente (eixo x) comparada ao eletrodo n° 1 (Figura 3), é nítida provavelmente devido à presença do mediador TCNQ.

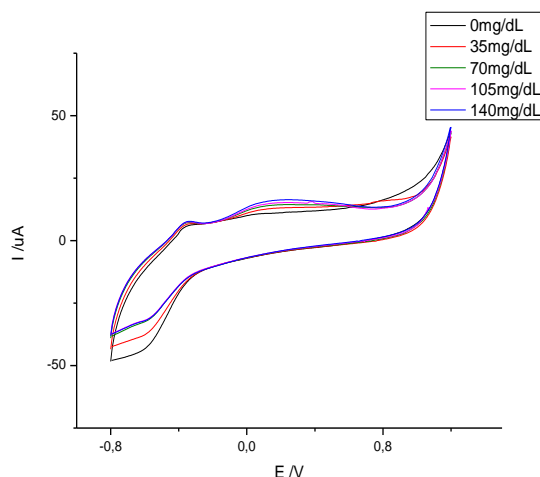


Figura 4 - Curva de Calibração do Eletrodo n° 3. Concentração relacionada à dispersão de Glicose na solução de tampão utilizada como sonda redox.

O eletrodo n° 2 (Figura 5), apresentou leituras voltamétricas irregulares nas concentrações “0 e 35 mg/dL” de glicose. Tais problemas podem ser atribuídos a baixa

regularidade da superfície eletródica e a oxidação de compostos presentes na pasta e eletrólito.

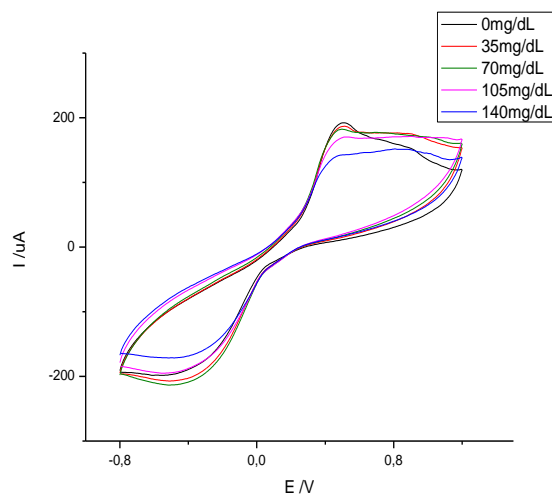


Figura 5 - Curva de Calibração do Eletrodo nº 2. Concentração relacionada à dispersão de Glicose na solução de tampão utilizada como sonda redox.

Para finalizar, a resposta eletródica foi verificada em relação a uma amostra de soro humano de voluntário com uma concentração de 114mg/dL, valor este obtido através de outra metodologia que não utilizasse o princípio da eletroquímica (prova bioquímica). A amostra utilizada foi cedida pelo laboratório de análises clínicas do PROCAPE. Na Figura 6, os resultados dos voltamogramas indicam resposta dos eletrodos na presença e ausência de soro humano, ou seja, resultados obtidos com amostra real.

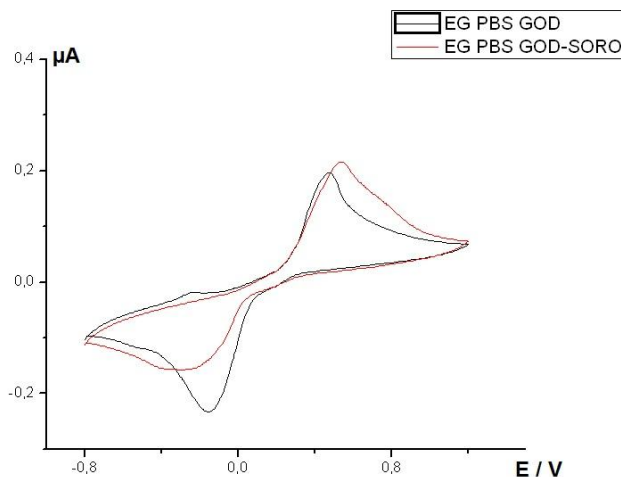


Figura 6 - Curva do eletrodo calibrado exposto a soro sanguíneo

4 CONCLUSÃO

A experiência aqui descrita relata um caso de sucesso em se tratando de novas técnicas para o ensino de engenharia. A prática, tida como projeto de curso da disciplina, obteve resultados satisfatórios tanto no que se diz respeito à construção de conhecimento por parte dos discentes, quanto na comprovação da utilização desta metodologia. O estudo deixa claro aos discentes, não só o que é, para que serve e como funciona, de fato, um biossensor; como

também dá aos alunos a perspectiva de que se é viável construir eletrodos de baixo custo, e ao mesmo tempo fidedignos, para mensuração da glicose em amostras biológicas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, 25(5): 835-841, 2002.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. *Química Nova*, 26 (3): 381-389, 2003.

GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. *Development of a carbon film electrode ferrocene-mediated glucose biosensor. Analytical Letters*, 38: 907-920, 2005.

ORDÓÑEZ, S. S.; FÀBREGAS, E. *New antibodies immobilization system into a graphite-polysulfone membrane for amperometric immunosensors. Biosensors and Bioelectronics*, 22: 965-972, 2007.

SILVA, A. C. M. ; MERCÊS, A M A ; Silva, M.M.S. ; GOMES FILHO, S. L. R. ; DUTRA, R. F. . Desenvolvimento de eletrodo impresso para determinação de glicose. **Anais: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica - SIBEE**, 2009, Fortaleza.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes, disponível em <http://www.diabetes.org.br/>, último acesso em Nov/2010

SIS-HIPERDIA, Sistema de Gestão Clínica de Hipertensão Arterial e Diabetes Mellitus da Atenção Básica, disponível em <http://hiperdia.datasus.gov.br/>, último acesso em Nov/2010

WU, L.; YAN, F.; JU, H. *An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based on its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. Journal of immunological methods*, 322:12-19, 2007.

IVIUM TECHNOLOGIES. **Ivium Start**. Disponível em: < <http://www.ivium.nl/> > Acesso em: 01 de jun 2011.

ORIGINLAB. Data Analysis and Graphing Software. Disponível em: < <http://www.originlab.com/>> Acesso em: 01 de jun 2011.

LOW COST ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR DEVELOPMENT

Abstract: *The development of electrochemical sensors is one of the largest and fastest growing areas, mainly due to the new challenges posed by samples of industrial, clinical and environmental interests, which have led to a growing demand for sensors with better characteristics, such as high sensitivity, selectivity and stability (Freire et al., 2003). This document proposes a methodology for developing an low cost electrochemical biosensor. As a study case will be presented a design for a glucose biosensor, always keeping the focus on technique applied. The methodology consists of three main steps: preparation of the biosensor, system calibration and testing and results analysis. As a result of the experiments it was found that this electrode responds well to glucose testing in both experiments in artificially prepared solutions and in biological samples. Thus was proved the efficiency of the methodology and the possibility of making low-cost biosensors.*

Key-words: *Biosensors, glucometers, Cyclic Voltammetry.*