



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vânia Cristina Gonçalves Pinto

Imunossensor microfluídico para quantificação de cortisol salivar

Vânia Cristina Gonçalves Pinto **Imunossensor microfluídico para
quantificação de cortisol salivar**

UMinho | 2016

dezembro de 2016



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Vânia Cristina Gonçalves Pinto

**Imunossensor microfluídico para
quantificação de cortisol salivar**

Tese de Doutoramento em Engenharia Biomédica

Trabalho efetuado sob a orientação da
Professora Doutora Graça Maria Henriques Minas
da
Professora Doutora Margarida Correia-Neves
e do
Professor Doutor Senentxu Lanceros-Méndez

dezembro de 2016

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração da presente tese. Confirmando que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri à prática de plágio ou a qualquer forma de falsificação de resultados.

Mais declaro que tomei conhecimento integral do Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 28 de Dezembro de

Nome completo: Vânia Cristina Gonçalves Pinto

Assinatura: Vânia Cristina Gonçalves Pinto

Agradecimentos

À minha orientadora Doutora Graça Minas e aos meus co-orientadores Doutora Margarida Correia-Neves e Doutor Senentxu Lanceros-Méndez quero deixar os meus sinceros agradecimentos pela oportunidade, orientação científica, dedicação, confiança, ajuda e sugestões que foram essenciais para que todo o trabalho fosse desenvolvido. Para além disso gostaria de agradecer todas as propostas e apoio durante a escrita e revisão da tese.

Ao Doutor Filipe Vaz do Departamento de Física, agradeço a disponibilidade para a utilização do equipamento de plasma de oxigénio. À Doutora Ana Machado do Departamento de Polímeros, agradeço a disponibilidade para realizar as medições FTIR e do ângulo de contacto da superfície do poli(dimetilsiloxano) bem como a partilha de ideias e aspetos práticos na caracterização da mesma.

Agradeço aos colegas de laboratório, pela simpatia, amizade, disponibilidade, pelo apoio concedido nas várias fases do trabalho e sobretudo o bom ambiente de trabalho. Entre eles, quero agradecer em especial à Doutora Susana Catarino pelas sugestões e pela simulação dos canais que foram essenciais para este trabalho, à Sara Pimenta pelo apoio durante as medições óticas realizadas durante o trabalho experimental e à Doutora Vanessa Cardoso pelas sugestões e trocas de ideias.

Um especial agradecimento ao Paulo Sousa, pelo companheirismo e apoio incondicional que muito contribuiu para o desenvolvimento de todo o trabalho, principalmente, para superar os momentos de mais aperto que foram surgindo ao longo destes anos académicos.

A toda a minha família, em especial aos meus pais, irmãos, cunhados e sobrinha, tenho muito agradecer pelo carinho, amizade, força e amor incondicional que me deram ao longo de todo o meu percurso académico. Aos meus padrinhos e amigos quero agradecer por todo o carinho, confiança e amizade.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) agradeço o apoio financeiro concedido no âmbito da minha bolsa de doutoramento (SFRH/BD/81526/2011).

Por fim tenho quero agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

Resumo

O *stress* físico e psicológico resultante do estilo de vida da sociedade atual é responsável pelo aparecimento de diversas doenças tais como depressão, ansiedade, enfarte do miocárdio, entre outras. A exposição prolongada ao *stress* ativa uma série de processos fisiológicos com conseqüente alteração dos níveis de alguns biomarcadores, especialmente da hormona de cortisol que tem sido descrita como um dos principais biomarcadores para a monitorização de *stress*. Os níveis desta hormona são caracterizados por um ciclo circadiano com um nível máximo pela manhã e uma diminuição ao longo do dia. Este ciclo circadiano do cortisol apresenta um papel crucial na regulação de vários processos fisiológicos e, por isso, é de extrema importância monitorizar a concentração de cortisol no corpo humano, principalmente ao longo do dia, para verificar se as variações dos níveis de cortisol advêm, por exemplo, do *stress* crónico. Além disso, muitos estadios patológicos resultam de perturbações dos níveis de cortisol inerentes ao mau funcionamento das glândulas, como o síndrome de *Cushing* e doença de *Addison*. Desta forma, torna-se importante desenvolver ferramentas de monitorização do cortisol capazes de realizar análises rápidas ao longo do seu ciclo circadiano.

O presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo imunossensor microfluídico fabricado em poli(dimetilsiloxano) (PDMS) que integra sistemas de deteção ótica fabricados em CMOS (*complementary metal oxide semiconductor*) para a quantificação rápida e extremamente sensível de cortisol salivar. O método de recolha simples e não invasivo de amostras de saliva fornece uma alternativa interessante ao sangue, permitindo amostragens em curtos intervalos de tempo, o que é um requisito na avaliação dos níveis de cortisol ao longo do dia, sendo de igual modo relevante para muitas outras aplicações de diagnóstico clínico. A abordagem desenvolvida baseia-se num imunoensaio competitivo, no qual são imobilizados covalentemente anticorpos (Ac) de revestimento (anti-IgG policlonais) sobre a superfície do PDMS previamente funcionalizada com grupos amina. Os Ac de revestimento ligam-se à região Fc (fração constante) dos Ac específicos para o cortisol (Ac de captura) permitindo a sua correta orientação. O cortisol marcado com a enzima HRP (*horseradish peroxidase*) é utilizado para a quantificação, inversamente proporcional, do cortisol da amostra. Os locais de ligação aos Ac de captura vão sendo ocupados pela

competição do cortisol da amostra com o cortisol marcado com HRP. Este último, ligado ao Ac de captura, é medido através da reação entre a enzima HRP e o substrato colorimétrico TMB (*3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) por absorção ótica a 450 nm, utilizando como fotodetector um fotodíodo CMOS integrado *on-chip*. Com as condições otimizadas apresentadas neste trabalho, isto é, a geometria dos canais microfluídicos, os métodos de imobilização e as condições do imunoensaio, o imunossensor desenvolvido apresenta um consumo de reagentes entre 5-20 μL , uma gama linear de detecção entre 0,01-20 ng/mL com um limite de detecção de 18 pg/mL e um tempo de análise de 35 min. Assim, o imunossensor desenvolvido fornece uma alternativa vantajosa quando comparado com os métodos bem estabelecidos de análises clínicas (designados de *gold-standard*) apresentando grande potencial para aplicações *point-of-care* (POC) que requerem monitorização contínua dos níveis de cortisol salivar.

Abstract

The physical and psychological stress resulting from the current society's lifestyle is responsible for the appearance of several diseases, such as depression, anxiety, myocardial infarction, among others. Prolonged exposure to stress activates several physiological effects with consequent change in some biomarkers levels, especially cortisol hormone, that has been described as one of the main biomarkers for stress monitoring. Cortisol hormone levels are characterized by a circadian cycle with a morning maximum and a decrease throughout the day. This circadian cycle of cortisol plays a crucial role in various physiological processes regulation and, therefore, it is extremely important to monitor the cortisol concentration in the human body, mainly throughout the day, in order to verify if the changes that can occur in cortisol levels are a result, for example, of a chronic stress. In addition, many pathological stages result from disorders of cortisol levels inherent to the glands malfunctioning such as Cushing's syndrome and Addison's disease. Thus, it is important to develop cortisol monitoring tools capable of performing rapid analyses throughout the circadian cycle.

This work presents a novel poly(dimethylsiloxane) (PDMS) microfluidic immunosensor that integrates a complementary metal oxide semiconductor (CMOS) optical detection system for a rapid and highly-sensitive quantification of salivary cortisol. The simple and non-invasive method of saliva sampling provides an interesting alternative to the blood, allowing a fast sampling at short intervals, advantageous for many clinical diagnostic applications. The developed approach is based on competitive immunoassay, where coating antibodies (anti-IgG polyclonal) are immobilized on the PDMS surface, previously functionalized with amine groups. Coating antibodies binds the Fc (constant fraction) region of the capture antibodies allowing their correct orientation. Horseradish peroxidase (HRP)-labelled cortisol is used to perform the inversely proportional quantification of the sample cortisol. The capture Ab binding sites are occupied by competition between the cortisol of the sample and the HRP-labelled cortisol. The latter, bound to the capture antibodies, is measured, after the reaction between HRP enzyme and the TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) that produces a colorimetric substrate, through optical absorption at 450 nm, using a CMOS silicon photodiode as the photodetector. Under the developed

optimized conditions presented here, e.g., microfluidic channels geometry, immobilization method and immunoassay conditions, the immunosensor shows a reagent consumption between 5-20 μL , a linear range of detection between 0.01-20 ng/mL, a limit of detection of 18 pg/mL and an analysis time of 35 min. So, the developed immunosensor provides an advantageous alternative when compared to the well-established methods of clinical analyses (gold standard) featuring a great potential for point-of-care (POC) applications requiring continuous monitoring of the salivary cortisol levels.

Índice

Índice.....	xi
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xxiii
Lista de Símbolos	xxv
Lista de Acrónimos e Termos	xxvii
1 Introdução	1
1.1 Enquadramento e relevância do trabalho	1
1.1.1 Breve descrição da importância da quantificação de cortisol	1
1.1.2 Breve descrição da importância da quantificação de cortisol salivar.....	3
1.1.3 Breve descrição dos principais métodos de quantificação de cortisol salivar.....	3
1.1.4 Importância de um imunossensor microfluídico para quantificação de cortisol salivar.....	4
1.2 Motivação e objetivos	5
1.3 Organização da tese.....	7
Referências	9
2 Quantificação de cortisol salivar	11
2.1 Importância do cortisol no corpo humano.....	11
2.2 Secreção do cortisol	13
2.3 Variação dos níveis de cortisol com o ciclo circadiano	14
2.4 Patologias relacionadas com o cortisol	16
2.4.1 Efeito do stress nos níveis de cortisol	16
2.4.2 Efeito do mau funcionamento das glândulas nos níveis de cortisol	20
2.5 Fluidos biológicos para quantificação de cortisol	20

2.6	Composição e função da saliva	23
2.6.1	Condições de recolha e tratamento de amostras salivares	24
2.7	Métodos de quantificação de cortisol	28
2.8	Conclusão	37
	Referências	39
3	Imunossensores microfluídicos.....	45
3.1	Imunossensor.....	45
3.1.1	Estrutura e função dos Ac	48
3.1.2	Imunoensaios.....	49
3.2	Tecnologia microfluídica	55
3.3	Materiais utilizados como substratos nos dispositivos microfluídicos	58
3.3.1	Silício	58
3.3.1	Vidro.....	59
3.3.2	Polímeros.....	60
3.3.3	Papel.....	62
3.4	Técnicas de deteção ótica utilizadas nos imunossensores microfluídicos	64
3.4.1	Fluorescência.....	65
3.4.2	Luminescência.....	66
3.4.3	Absorvência.....	67
3.4.4	SPR.....	68
3.5	Conclusão	70
	Referências	72
4	Imobilização de anticorpos na superfície do PDMS: processamento e caracterização	77
4.1	Métodos de Imobilização	78
4.1.1	Imobilização por adsorção física.....	79
4.1.2	Imobilização por bioafinidade.....	80
4.1.3	Imobilização por ligação covalente.....	82
4.1.4	Considerações práticas	86
4.2	Imobilização dos Ac na superfície do PDMS	87
4.2.1	Ac imobilizados por adsorção física	88
4.2.2	Ac imobilizados por bioafinidade utilizando Proteína A	89
4.2.3	Ac imobilizados por ligação covalente com funcionalização química	89

4.3	Técnicas utilizadas para caracterização da superfície do PDMS	91
4.3.1	Microscopia de força atômica	91
4.3.2	Espetroscopia de luz Utra-Violeta/Visível (UV/Vis).....	92
4.3.3	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	94
4.3.4	Ensaio de fluorescamina.....	95
4.3.5	Medição do ângulo de contacto.....	96
4.4	Resultados experimentais.....	97
4.4.1	Caracterização da superfície do PDMS funcionalizada com grupos amina.....	97
4.4.2	Análise comparativa dos métodos de imobilização estudados.....	103
4.5	Conclusão	109
	Referências	111
5	Projeto, fabrico e resultados do imunossensor microfluídico.....	115
5.1	Introdução.....	116
5.2	Princípio de funcionamento do imunossensor microfluídico.....	116
5.3	Desenvolvimento do imunoensaio do cortisol salivar em poços de PDMS.....	118
5.3.1	Eficiência da solução de bloqueio para adsorção não-específica em poços de PDMS.....	118
5.3.2	Otimização do imunoensaio para o cortisol salivar em poços de PDMS.....	119
5.3.3	Sensibilidade da análise do cortisol salivar em poços de PDMS.....	121
5.3.4	Seletividade da análise do cortisol salivar em poços de PDMS.....	124
5.4	Desenvolvimento do dispositivo microfluídico em PDMS.....	125
5.4.1	Geometria dos microcanais	125
5.4.2	Fabrico do dispositivo microfluídico	130
5.5	Quantificação espectrofotométrica de cortisol salivar no dispositivo microfluídico ...	140
5.5.1	Bombeamento dos fluidos.....	141
5.5.2	Espetrofotometria por absorção ótica.....	144
5.6	Conclusão	148
	Referências	150
6	Conclusões e trabalho futuro.....	153
6.1	Conclusões	153
6.2	Trabalho futuro.....	155

Lista de Figuras

Figura 1.1 Representação esquemática do imunossensor microfluídico para o cortisol salivar.....	7
Figura 2.1 Mecanismo de regulação da secreção do cortisol (adaptado de [12]).....	14
Figura 2.2 Variação típica dos níveis de cortisol ao longo de um ciclo de 24 h (adaptado de [11]).....	15
Figura 2.3 Representação esquemática simplificada da reação ao <i>stress</i> e os seus efeitos durante a resposta. O eixo HPA é controlada por vários mecanismos que tendem a normalizar a secreção de cortisol. A ativação do eixo HPA leva à supressão do eixo de hormona luteinizante (LH do inglês <i>luteinizing hormone</i>)/testosterona (T)/estradiol (E2), hormona de crescimento (GH do inglês <i>growth hormone</i>)/fator de crescimento semelhante à do eixo insulina tipo 1 (IGF-1 do inglês <i>insulin-like growth factor</i>) e do eixo da hormona estimuladora da tiróide (TSH do inglês <i>thyroid-stimulating hormone</i>)/ triiodotironina (T3). As linhas azuis indicam estimulação; as linhas vermelhas indicam inibição (adaptado de [23]).....	18
Figura 2.4 Dispositivos para recolha de saliva: (a) <i>Salivette</i> ® (adaptado de [51]), (b) <i>Quantisal</i> ® (adaptado de [10]) e (c) <i>Intercept</i> ® [53].....	26
Figura 2.5 Princípio de funcionamento de um filtro-H microfluídico. As partículas de menor tamanho apresentam um maior coeficiente de difusão do que as partículas de maior tamanho e, por conseguinte, movimentam-se mais rapidamente para o outro líquido podendo ser filtradas (adaptado de [58], com autorização de <i>The Royal Society of Chemistry</i>).....	27
Figura 2.6 Representação esquemática do estado da arte dos métodos de quantificação de cortisol (adaptado de [12]).....	28
Figura 2.7 (a) Representação esquemática do biossensor SPR e (b) sensograma da resposta em função da ligação do Ac primário, melhoria do sinal com ligação do Ac secundário e regeneração da superfície (adaptado de [65], com autorização de <i>Royal Society of Chemistry</i>).....	33

Figura 2.8 Representação esquemática de: (a) imunossensor eletroquímico e (b) imunoensaio para a quantificação de cortisol (adaptado de [49], com autorização de <i>Elsevier</i>).	34
Figura 2.9 Representação esquemática dos (a) microelétrodos interdigitados, (b) imagem ampliada de microscopia ótica e (c) fabrico do bioelétrodo (adaptado de [66], com autorização de <i>Royal Society of Chemistry</i>).....	34
Figura 2.10 Representação esquemática do fabrico do imunossensor quimiorresistivo. (1) Alinhamento dos SWCNTs; (2) funcionalização não covalente com <i>Pyrene</i> ; (3) ligação covalente de cortisol-NHS; (4) ligação do Ac anti-cortisol ao cortisol e bloqueio com Tween20; (5) deslocação do Ac anti-cortisol da superfície para ligação ao cortisol livre na amostra (adaptado de [40], com autorização de <i>Elsevier</i>).	35
Figura 2.11 Representação esquemática do imunossensor de fluxo lateral e vertical: (a) vista lateral do imunossensor, (b) representação esquemática do imunossensor e (c) representação esquemática da reação eletroquímica (adaptado de [42], com autorização de <i>Elsevier</i>).	36
Figura 3.1 Representação esquemática do funcionamento de um imunossensor (adaptado de [4]).	46
Figura 3.2 Representação esquemática da estrutura de um Ac (adaptado de [12]).	49
Figura 3.3 Representação esquemática dos imunoensaios não-competitivos (adaptado de [4]).	51
Figura 3.4 Representação esquemática dos imunoensaios competitivos (adaptado de [4]). ..	52
Figura 3.5 Representação esquemática dos imunoensaios competitivos homogéneos (adaptado de [5]).	53
Figura 3.6 Oxidação do substrato TMB catalisada pela enzima HRP (adaptado de [21], com autorização de <i>Elsevier</i>).	55
Figura 3.7 Esquema de um LOC, que inclui: (a) sistema de filtragem ótica; (b) sistema de microfluidos; (c) sistema de deteção e leitura (adaptado de [29]).	56
Figura 4.1 Representação esquemática dos mecanismos de imobilização em superfícies sólidas (adaptado de [3]).	78

Figura 4.2 Representação esquemática: (a) interação adivina-biotina e (b) imobilização de Ac por bioafinidade utilizando o complexo adivina-biotina (adaptado de [13]). ...	81
Figura 4.3 Representação esquemática da imobilização de Ac utilizando proteína A (adaptado de [16]).	81
Figura 4.4 Imobilização de Ac na superfície sólida através da utilização de ADN. Os Ac são conjugados covalentemente com ADN para posterior ligação ao ADN complementar funcionalizado na superfície do <i>chip</i> (adaptado de [17]).	82
Figura 4.5 Representação esquemática da imobilização covalente por funcionalização da superfície sólida com: (a) grupos amina, (b) grupos tiol, (c) grupos carboxílicos e (d) grupos epóxidos (adaptado de [7]).	83
Figura 4.6 Tipo de ligações mediadas por grupos epóxidos (adaptado de [18]).	86
Figura 4.7 Poços em PDMS com 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura.	88
Figura 4.8 Representação esquemática do método de imobilização por adsorção física de Ac sobre PDMS nativo.	88
Figura 4.9 Imobilização de Ac utilizando Proteína A.	89
Figura 4.10 Representação esquemática do método de imobilização covalente por funcionalização química da superfície PDMS com grupos amina (adaptado de [28]).	90
Figura 4.11 Fotografia do forno de vácuo.	91
Figura 4.12 Representação esquemática dos principais constituintes de um espectrofotômetro (adaptado de [31]).	93
Figura 4.13 <i>Setup</i> utilizado para as análises espectrofotométricas.	94
Figura 4.14 Representação esquemática do ensaio de fluorescamina (adaptado de [34]).	95
Figura 4.15 Ensaio de fluorescamina em poços de: (a) PDMS não tratado com APTES e (b) PDMS tratado com APTES.	98
Figura 4.16 Medição da fluorescência para obtenção da concentração de grupos amina na superfície do PDMS com diferentes concentrações de APTES e diferentes tempos de incubação (adaptado de [28]).	98

Figura 4.17 Amostras de PDMS tratadas com 50% de APTES incubadas durante: (a) 20 min, (b) 60 min e (c) 90 min.	99
Figura 4.18 Transmitância do PDMS tratado com diferentes tempos de incubação e diferentes concentrações de APTES: (a) 10% APTES, (b) 50% APTES e (c) 75% APTES (adaptado de [28]).....	100
Figura 4.19 Espectro FTIR do PDMS nativo (preto) e PDMS tratado com APTES (vermelho) (adaptado de [28]).	101
Figura 4.20 Ângulos de contacto de diferentes amostras de PDMS nativo, PDMS tratado com plasma de O ₂ e PDMS tratado com APTES.	102
Figura 4.21 Imagem do perfil da gota numa amostra de PDMS (a) nativo, (b) tratada com APTES, (c) tratada com plasma de O ₂ e (d) após 300 min do tratamento com plasma de O ₂	103
Figura 4.22 Imagem AFM em 2-D (direita) e 3-D (esquerda) das superfícies de PDMS: (a) PDMS nativo, (b) Ac immobilizados na superfície do PDMS por adsorção física, (c) Ac immobilizados na superfície do PDMS utilizando proteína A e (d) Ac immobilizados na superfície do PDMS tratado com APTES via GA.....	105
Figura 4.23 Análise espectrofotométrica da concentração de Ac de revestimento marcados com HRP immobilizados na superfície do PDMS utilizando os três métodos de imobilização descritos na secção 4.2.....	106
Figura 4.24 Análise espectrofotométrica por absorção ótica da concentração de cortisol marcado com HRP ligado aos Ac de captura immobilizados utilizando os três métodos descritos na secção 4.2.	108
Figura 4.25 Análise espectrofotométrica por absorção ótica da concentração de cortisol marcado com HRP ligados aos Ac de captura immobilizados utilizando os métodos descritos nas secções 4.2.2 e 4.2.3 e medidos ao longo de três semanas.....	108
Figura 5.1 Fotografia do (a) molde em acrílico e dos (b) poços em PDMS utilizados para a otimização do imunoensaio competitivo para o cortisol salivar.	117
Figura 5.2 Otimização da concentração dos Ac de revestimento e de captura utilizando uma diluição de cortisol marcado com HRP de 25000 (v/v) (adaptado de [5]).	120
Figura 5.3 Otimização da diluição de cortisol marcado com HRP (adaptado de [5]).	120

Figura 5.4 Absorção ótica do cortisol marcado com HRP para diferentes tempos de reação do Ac de captura com o cortisol marcado com HRP e cortisol padrão (adaptado de [5]).	121
Figura 5.5 Curva de calibração representativa dos imunoenaios competitivos (adaptado de [6]).	122
Figura 5.6 Espectro de absorvência em função do comprimento de onda (430-490 nm) para várias concentrações de cortisol padrão obtido em poços de PDMS.	123
Figura 5.7 Curva de calibração obtida com o imunoenensaio otimizado em poços de PDMS (adaptado de [5]).	124
Figura 5.8 Poços de PDMS com o imunoenensaio final, testado em duplicado, no qual se verifica as diferentes intensidades da cor amarela em função da concentração do cortisol.	124
Figura 5.9 Controlos experimentais do imunoenensaio competitivo desenvolvido para cortisol salivar em poços de PDMS (adaptado de [5]).	125
Figura 5.10 Condições de fronteira nas entradas e na saída, utilizadas na simulação.	127
Figura 5.11 Simulação da mistura de fluidos em microcanais em forma de Y lineares com comprimento de 20 mm: (a) microcanal com largura 200 μm ; (b) microcanal com largura 400 μm . Em ambos encontra-se um detalhe do final do microcanal (direita).	128
Figura 5.12 Simulação da mistura de fluidos em microcanais em forma de serpentina: (a) microcanal com comprimento de 20 mm e largura 200 μm ; (b) microcanal com comprimento de 20 mm e largura 400 μm ; (c) microcanal com comprimento de 40 mm e largura 200 μm . Em todos encontra-se um detalhe do final do microcanal (direita) (adaptado de [5]).	129
Figura 5.13 Representação esquemática das várias etapas do processo de fabrico do molde em SU-8.	132
Figura 5.14 Fotomáscara utilizada na etapa de exposição UV no fabrico do molde em SU-8.	132
Figura 5.15 Molde em SU-8 dos microcanais com as seguintes dimensões: 5 mm de comprimento da entrada em forma de Y e 40 mm de comprimento do canal de	

serpentina; todo o microcanal tem uma largura de 200 μm e uma espessura de 100 μm ; a saída do microcanal tem 500 μm de largura e 3 mm de comprimento.....	134
Figura 5.16 Desenho 3-D do molde em acrílico com dimensões da câmara cilíndrica de reação de 3 mm de diâmetro e de altura.	135
Figura 5.17 Representação esquemática do processo de fabrico do (A) microcanal e (B) câmara de reação.....	136
Figura 5.18 Sistema de vácuo para remoção de bolhas de ar da mistura de PDMS: bomba de vácuo (esquerda) e exsiccador de vácuo (direita).	136
Figura 5.19 Partes do sistema microfluídico em PDMS separadas: (a) fotografia dos microcanais obtidos por molde em SU-8 (esquerda) e ampliação obtida por microscopia ótica (direita), e (b) câmara de reação obtida por molde em acrílico. ...	137
Figura 5.20 Equipamento utilizado para gerar plasma de O_2 . O equipamento é constituído por: 1) câmara de reação em aço inoxidável; 2) Botão de ligar/desligar o equipamento; 3) Indicador de pressão; 4) Temporizador; 5) Botão de ventilação; 6) Botão de ligar/desligar o gerador de plasma; 7) Botão ligar/desligar a bomba de vácuo e 8) Botão de abrir/fechar válvula do gás.....	138
Figura 5.21 Dispositivo microfluídico em PDMS com dimensões externas de 20 mm de largura \times 30 mm comprimento \times 5 mm de altura (adaptado de [5]).....	138
Figura 5.22 Adaptador em acrílico.	139
Figura 5.23 Diagrama de blocos da montagem experimental utilizado nos testes do imunossensor microfluídico para a quantificação de cortisol salivar.	140
Figura 5.24 Fotografia da montagem experimental utilizado para os testes do imunossensor microfluídico para a quantificação de cortisol salivar.	141
Figura 5.25 Sistema de bombeamento <i>Nemesys Syringe Pump</i> utilizado para testar o imunossensor microfluídico.....	142
Figura 5.26 Câmara de reação ilustrando (a) a cor azul quando foi adicionada a solução de TMB e (b) a cor amarela quando foi adicionada a solução STOP (adaptado de [5]).....	143
Figura 5.27 (a) Sistema ótico incluindo o imunossensor microfluídico e (b) detalhe do fotodíodo <i>on-chip</i>	145

Figura 5.28 Características espectrais do fotodíodo *on-chip* com uma área ativa de 1×1 mm: (a) curva da responsividade e (b) curva da eficiência quântica..... 145

Figura 5.29 Espectro de absorvência em função do comprimento de onda no espectro de luz visível de várias concentrações de cortisol padrão e (b) curva de calibração, obtidos a partir do imunossensor microfluídico *on-chip* (adaptado de [5])...... 146

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Desempenhos analíticos dos diferentes métodos de quantificação de cortisol no sangue (plasma ou soro), na urina e na saliva (adaptado de [13], com autorização de <i>Elsevier</i>).....	30
Tabela 5.1 A_{450nm} das diferentes soluções de bloqueio (unidades arbitrárias) (adaptado de [5]).....	119
Tabela 5.2 Formato e dimensões dos canais microfluídicos para a simulação (adaptado de [5]).....	126
Tabela 5.3 Desempenho analítico do imunossensor microfluídico em comparação com os métodos ELISA convencionais (adaptado de [5]).....	147

Lista de Símbolos

Símbolo	Descrição	Unidade
A	Absorvência	-
a	Assíntota máxima	-
A_0	Absorvência para a concentração zero	-
b	Declive	-
C	Concentração molar de cortisol total do soro	mol/L
c	Ponto de inflexão	mol/L
CV	Coefficiente de variação	%
d	Assíntota mínima	-
D	Coefficiente de difusão	m ² /s
d	Espessura da amostra	m
I_0	Intensidade de luz incidente	J.s.m ⁻¹
I_T	Intensidade de luz transmitida	J.s.m ⁻¹
K	Afinidade de CBG para o cortisol à temperatura de 37°C	M ⁻¹
N	Razão de albumina ligada com o cortisol livre do soro	-
P	Pressão	Pa
\mathfrak{R}	Responsividade	A/W
T	Concentração de CBG	mol/L
T	Transmitância	%
T	Temperatura	°C
t	Tempo	s
U	Concentração molar do cortisol não ligado	mol/L
x	Logaritmo da concentração	mol/L
y	Valor da absorvência	-
α	Coefficiente de absorção ótico	m ⁻¹
λ	Comprimento de onda	m
ρ	Densidade	Kg/m ³

Lista de Acrónimos e Termos

ABTS	<i>2,2'-azino-di(2-ethyl-benzthiazoline)sulfonic acid</i>
Ac	Anticorpo
ACTH	Hormona adrenocorticotrofina (<i>adrenocorticotrophic hormone</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNcs	Ácido desoxirribonucleico de cadeia simples
AFM	Microscopia de força atômica (<i>atomic force microscopy</i>)
Ag	Antigénio
Ag/AgCl	Eléctrodo de prata/cloreto de prata
AP	Fosfatase alcalina (<i>alkaline phosphate</i>)
APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
ARN	Ácido ribonucleico
AVP	Arginina-vasopressina
BSA	Albumina sérica bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Região constante
CAD	Desenho auxiliado por computador (<i>computer aided design</i>)
CBG	<i>Corticosteroid binding globulin</i>
CDR	<i>Complementary-determining regions</i>
CF₄	Tetrafluorometano (fórmula química)
C_H	Domínio constante da cadeia pesada
CH₃	Metil (fórmula química)
CHF₃	Trifluorometano (fórmula química)
Chip	Circuito integrado e encapsulado
CL	Cromatografia líquida
C_L	Domínio constante da cadeia leve
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FLU	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta
C-mAb	<i>Monoclonal cortisol antibody</i>
CMOS	<i>Complementary metal oxide semiconductor</i>

Col1	Colagénio tipo 1
CRH	Hormona libertadora de corticotrofina (<i>corticotropin releasing hormone</i>)
DTSP	<i>Dithiobis succinimidyl propionate</i>
E2	Estradiol
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EIA	Espetroscopia de impedância eletroquímica (<i>electrochemical impedance spectroscopy</i>)
ELISA	Ensaio imunosorbente ligado a enzima (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)
EM	Espectrometria de massa
Fab	Fração de ligação ao antigénio
Fc	Fração constante
FCG	Fluido crevicular gengival
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
FTIR	Espetroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (<i>fourier transform infrared spectroscopy</i>)
GA	Glutaraldeído
GH	Hormona de crescimento (<i>growth hormone</i>)
GOD	Glicose oxidase
GPIB	<i>General purpose interface bus</i>
HAC	Hiperplasia adrenal congénita
HPA	Eixo hipotálamo – pituitária – adrenal
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICL	Índice de cortisol livre
ID_μE	Microeléctrodo interdigitado (<i>interdigitated microelectode</i>)
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina classe A
IgD	Imunoglobulina classe D
IgE	Imunoglobulina classe E
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à do eixo insulina tipo 1 (<i>insulin-like growth factor</i>)
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M
IPA	Álcool isopropílico

IV	Infravermelhos
LC	Locus ceruleus
LD	Limite de deteção
LED	<i>Light emitting diode</i>
LH	Hormona luteinizante (<i>luteinizing hormone</i>)
LOC	<i>Lab-on-a-chip</i>
MAC	Manufatura auxiliada por computador
MEMS	Sistema eletromecânicos (<i>micro eletro mechanical system</i>)
MSCs	Células-tronco mesenquimais (<i>mesenchymal stem cells</i>)
NaBH₄	Borohidreto de sódio (fórmula química)
NaCNBH₃	Cianoborohidreto de sódio (fórmula química)
NH₂	Aminas primárias (fórmula química)
NHS	Amina-N-hidroxisucinimida
NSQ	Células do núcleo supraquiasmático
O₂	Oxigénio (fórmula química)
OMS	Organização mundial de saúde
OPD	<i>O-phenylenediamine</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Policarbonato
PCB	<i>Printed Circuit Board</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PET	Polietileno tereftalato
pH	Potencial de hidrogénio
PMMA	Polimetil-metacrilato
pNP	<i>p-nitrophenol</i>
pNPP	<i>p-nitrophenil phosphate</i>
POC	<i>Point-of-care</i>
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoretileno
PVA	Álcool polivinílico (<i>poly(vinyl alcohol)</i>)
PVC	Policloreto de vinil
RIA	Radioimunoensaio

SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
Si-OH	Silanol (fórmula química)
SNA	Sistema nervosa autónomo
SPR	Ressonância de plasma de superfície (<i>surface plasmon ressonance</i>)
SU-8	Éter glicidílico de bisfenol A
Sulfo-NHS	N-hidroxisulfosucinimida
SWCNTs	<i>Single-Walled Carbon Nanotubes</i>
T	Testosterona
T3	Triodotironina
TMB	<i>3,3',5,5'-tetramethylbenzidine</i>
TSH	Hormona estimuladora da tiróide (<i>thyroid-stimulating hormone</i>)
u.a.	Unidades arbitrárias
UV	Ultravioleta
V	Região variável
V_H	Domínio variável da cadeia pesada
VIS	Visível
V_L	Domínio variável da cadeia leve

1 Introdução

O presente capítulo apresenta de forma sucinta o enquadramento e a relevância do trabalho, através de uma breve descrição da importância da quantificação de cortisol e das vantagens dessa quantificação ser efetuada na saliva. Seguidamente refere-se a principal motivação e os objetivos que levaram ao desenvolvimento deste projeto. Por fim, apresenta-se a organização da tese.

1.1 Enquadramento e relevância do trabalho

1.1.1 Breve descrição da importância da quantificação de cortisol

Hoje em dia, o *stress*¹ físico e psicológico, originado a partir da rotina diária da sociedade moderna, exigente e industrializada é, em parte, responsável por várias doenças em todo o mundo, tais como depressão, ansiedade, enfarte do miocárdio, dor no cérebro, entre outras, acarretando um elevado fardo económico para a sociedade atual. Segundo informações da organização mundial de saúde (OMS), prevê-se que as doenças mentais, especialmente as relacionadas com o *stress*, sejam a segunda principal causa de doenças em 2020, acarretando encargos significativos relacionados com os custos médicos e os seguros, para além da diminuição da produtividade laboral [1-3]. Desta forma, tem sido feito um

¹ *Stress* é geralmente definido como qualquer estímulo que perturba o equilíbrio interno do corpo (isto é, a homeostase fisiológica).

grande esforço no desenvolvimento de ferramentas para monitorizar o *stress*. Um dos biomarcadores importantes do *stress* é a hormona de cortisol [1] que desempenha um papel crucial em vários processos fisiológicos, tais como a regulação da pressão arterial, os níveis de glicose, o metabolismo de hidratos de carbono, a homeostasia cardiovascular, do sistema imunológico, renal e endócrino [4, 5]. Os níveis de cortisol num indivíduo saudável são caracterizados por um ciclo circadiano², com um pico máximo de manhã (pouco antes de acordar), diminuindo lentamente ao longo do dia, registando um mínimo por volta da meia-noite [1, 5]. Portanto, é de extrema importância monitorizar a concentração de cortisol no corpo humano e ainda avaliar a sua variação ao longo do dia devido ao seu ciclo circadiano, com o objetivo de avaliar se a produção e a variação ao longo do dia seguem um padrão que possa ser considerado normal ou se revelam anomalias que podem estar associadas com a incapacidade de responder a *stress* psicológico/físico ou outras doenças que alterem a produção desta hormona [1, 5, 6]. O *stress* pode ser provocado por uma variedade de fatores como doenças, exposição prolongada a frio ou calor extremo, fome ou outro. O conjunto de fatores às quais as pessoas são expostas e as reações biológicas, fisiológicas e/ou patológicas podem ser restritas a um período curto (*stress* agudo) ou mais prolongadas (*stress* crónico). O *stress* agudo normalmente gera uma resposta benéfica sem causar problemas. Por outro lado, o *stress* crónico pode provocar diferentes respostas quando presentes ao mesmo estímulo, isto é, perante a mesma situação de *stress*, há indivíduos que conseguem responder de uma forma “bem-adaptada” e há indivíduos com incapacidade de responder bem a esse estímulo (resposta “mal-adaptada”), sendo estes os que sofrem alterações relevantes, especialmente com aumentos dos níveis de cortisol em períodos específicos ou com um ciclo circadiano anormal [1, 7].

Além disso, a variação dos níveis de cortisol pode também estar relacionada com diversos estados patológicos inerentes ao funcionamento das glândulas. Como exemplos encontra-se o hipercortisolismo extremo (níveis de cortisol muito elevados) que pode levar ao desenvolvimento da doença de *Cushing*, e o hipocortisolismo extremo (níveis de cortisol muito baixos) que pode levar à doença de *Addison* [4, 8].

² Período de 24 h no qual se completam as atividades do ciclo biológico dos seres vivos.

1.1.2 Breve descrição da importância da quantificação de cortisol salivar

A medição quantitativa de cortisol pode ser efetuada a partir de vários fluidos biológicos, tais como soro, urina, saliva e fluido intersticial. Apesar do sangue se apresentar como uma boa fonte de amostra, onde a concentração de cortisol é mais elevada (20-250 ng/mL), a sua utilização pode ser afetada por alguns inconvenientes, nomeadamente, a necessidade de perfuração das veias, que pode potencialmente provocar *stress* para o indivíduo levando a resultados enganosos. Para além disso, necessita de pessoal qualificado e não se apresenta como a melhor fonte de amostra quando se pretende várias medições ao longo do dia [9, 10].

Recentemente, a saliva emergiu como um fluido alternativo para a medição da concentração de cortisol, devido às suas vantagens inerentes. Em primeiro lugar, é recolhida através de um método fácil, de natureza não-invasivo e com possibilidade de auto-recolha fora do ambiente clínico, reduzindo a resposta ao *stress* e permitindo uma amostragem rápida em curtos intervalos de tempo. Assim é possível uma monitorização dos níveis de cortisol com elevada frequência, requisito essencial para avaliar as variações ao longo do ciclo circadiano. Em segundo lugar, o cortisol salivar está presente no estado livre (biologicamente ativo), que é a forma pertinente para a sua deteção, ao contrário do que ocorre com o cortisol sanguíneo, onde cerca de 94% do cortisol está ligado a proteínas [9, 11]. Além disso, os níveis de cortisol salivar estão bem documentados e correlacionados com os níveis de cortisol no sangue permitindo obter o mesmo resultado de diagnóstico. No entanto, os níveis de cortisol salivar, que variam entre 1 e 8 ng/mL em adultos saudáveis, são muito menores do que os níveis de cortisol no sangue, o que requer métodos de quantificação extremamente sensíveis e precisos [12, 13].

1.1.3 Breve descrição dos principais métodos de quantificação de cortisol salivar

Os principais métodos de quantificação utilizados nos laboratórios de análises clínicas para a quantificação de cortisol salivar são baseados em técnicas de cromatografia líquidas de

alta eficiência (CLAE) [9, 14] ou em imunoenaios tais como radioimunoenaios (RIA), ensaio imunosorbente ligado a enzima (ELISA do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*), ensaios luminescentes e fluorescentes [9, 15, 16]. Embora estes métodos forneçam uma sensibilidade e especificidade elevada eles apresentam, contudo, algumas limitações tais como: análises demoradas com elevado consumo de reagentes/amostra envolvendo múltiplos passos de reação e lavagem; custos elevados; e alguns envolvem o uso de radioisótopos [9, 16]. Desta forma, não são apropriados para dispositivos portáteis e miniaturizados que permitam a realização da medição fora do ambiente hospitalar e várias vezes durante o mesmo dia. Recentemente, têm sido relatados vários imunossensores (biossensores baseados em anticorpos) para a detecção de cortisol baseados em técnicas eletroquímicas [16] e óticas, especialmente através da ressonância de plasma de superfície (SPR do inglês *surface plasmon resonance*), com vista à miniaturização do dispositivo [12].

1.1.4 Importância de um imunossensor microfluídico para quantificação de cortisol salivar

As plataformas microfluídicas que têm vindo a ser desenvolvidas nesta última década para análises de fluidos biológicos com eletrónica integrada procuram responder à necessidade de se obterem dispositivos com elevada eficiência, rapidez de resposta, potencial para automatização e controlo, portabilidade, redução do consumo de reagentes/amostra e do tempo de análise, e acima de tudo, redução do custo de fabrico, quando produzido em massa, bem como redução do custo de cada análise [17]. Estas características são particularmente adequadas para aplicações em imunoenaios, nos quais o desempenho analítico pode ser melhorado conjuntamente com a redução do consumo de reagentes, diminuição do tempo de análise, aumentando a confiabilidade, reprodutibilidade e sensibilidade através da automação e integração de múltiplos processos num único dispositivo [18, 19]. Assim, têm sido feitos enormes esforços para o desenvolvimento de imunossensores microfluídicos que combinam as vantagens das microtecnologias direcionadas para a implementação de microssistemas fluídicos com a elevada especificidade da interação anticorpo (Ac) - antígeno (Ag) dos imunoenaios [18]. Estas plataformas mostram poder ser uma solução bastante eficaz para a

monitorização contínua dos níveis de cortisol salivar, utilizando um método não invasivo e um dispositivo de custo reduzido.

1.2 Motivação e objetivos

No âmbito do enquadramento descrito na secção anterior, a principal motivação do presente trabalho prende-se com a necessidade de serem implementadas ferramentas para a monitorização do cortisol capazes de fornecerem resultados rápidos com elevada sensibilidade e especificidade, de fácil manipulação e de baixo custo e que permitam realizar várias medições ao longo do dia fora do ambiente hospitalar. Assim, o principal objetivo deste trabalho recai sobre o desenvolvimento de um imunossensor microfluídico em poli(dimetilsiloxano) (PDMS) para a quantificação de cortisol utilizando a saliva como fluido biológico. Este dispositivo integra técnicas óticas para a deteção rápida e extremamente sensível da concentração de cortisol salivar. Do nosso conhecimento não há relatos anteriores sobre imunossensores microfluídicos para a quantificação de cortisol salivar integrando o imunoensaio num dispositivo microfluídico em PDMS e utilizando absorção ótica como técnica de deteção.

A escolha do desenvolvimento de um imunossensor baseado num ensaio competitivo prende-se com o facto da hormona de cortisol ter um baixo peso molecular e uma baixa concentração na saliva [20]. Este tipo de ensaio possui um sinal de saída que é inversamente proporcional à concentração de cortisol, o que é uma característica adequada para as baixas concentrações de cortisol como as apresentadas na saliva (1-8 ng/mL). A escolha do PDMS deve-se ao facto de ser o material que apresenta as melhores propriedades para o *die* microfluídico, ou seja, transparência ótica, o que é necessário para a deteção ótica; fabrico com características nanométricas; fabrico sem necessidade de sala limpa; e baixo custo para prototipagem [21]. Para além disso, o extenso conhecimento acerca da química e dos métodos de modificação da superfície do PDMS [17] fazem dele um excelente candidato para um processo de imobilização fiável de biorreagentes, como os Ac, processo esse necessário no imunoensaio para a deteção do cortisol.

A concepção geral do imunossensor microfluídico para a quantificação de cortisol salivar encontra-se na figura 1.1. O dispositivo compreende: os microcanais para o transporte e mistura dos fluidos; três entradas de fluidos, uma para os Ac de captura (IgG anti-cortisol), outra para o cortisol marcado com peroxidase (HRP do inglês *horseradish peroxidase*) conjuntamente com a amostra de saliva e a terceira para o substrato colorimétrico de TMB (do inglês *3,3',5,5'-tetramethylbenzidine*) e solução STOP; e uma câmara de reação onde ocorre o imunoensaio. A quantificação de cortisol baseia-se na detecção colorimétrica por absorção ótica a 450 nm. Para isso, por baixo da câmara de reação posicionam-se fotodetectores de silício integrados num *chip* CMOS (do inglês *complementary metal oxide semiconductor*) que medem a intensidade de luz transmitida através da mistura. Os filtros óticos posicionados sobre esses fotodetectores servem para filtrar o feixe de luz obtendo-se apenas um feixe centrado na gama espectral de interesse, neste caso a 450 nm. A utilização de filtros óticos permite que as medições sejam realizadas com uma fonte de luz convencional (por exemplo, simples luz branca), evitando assim as tradicionais e dispendiosas fontes de luz dependentes do comprimento de onda (λ) (por exemplo, fonte monocromática), conferindo portabilidade ao imunossensor microfluídico e adequando-o para medições *point-of-care* (POC). O desenvolvimento e fabrico do sistema eletrónico de detecção e da filtragem ótica não são objetivos deste trabalho, tendo sido realizados por colegas do grupo de investigação CMEMS-UMinho no qual este trabalho se realizou.

O desenvolvimento de um imunossensor baseado num ensaio competitivo requer várias etapas de otimização, entre as quais, o estudo de um processo de imobilização adequado para os Ac na superfície do PDMS, bem como a avaliação e determinação das condições ótimas de todo o imunoensaio tendo em vista a gama de medição necessária para quantificar o cortisol salivar. Para além disso, é necessário projetar-se e fabricar-se uma plataforma microfluídica tendo em vista as suas vantagens de automatização, redução de reagentes/amostras, rapidez do tempo de análise, entre outras. Assim, acredita-se que esta abordagem tornará este imunossensor num dispositivo eficaz para medir os níveis de concentração de cortisol salivar em diferentes intervalos de tempo durante as 24 h do ciclo circadiano utilizando um método não invasivo e um dispositivo de baixo custo.

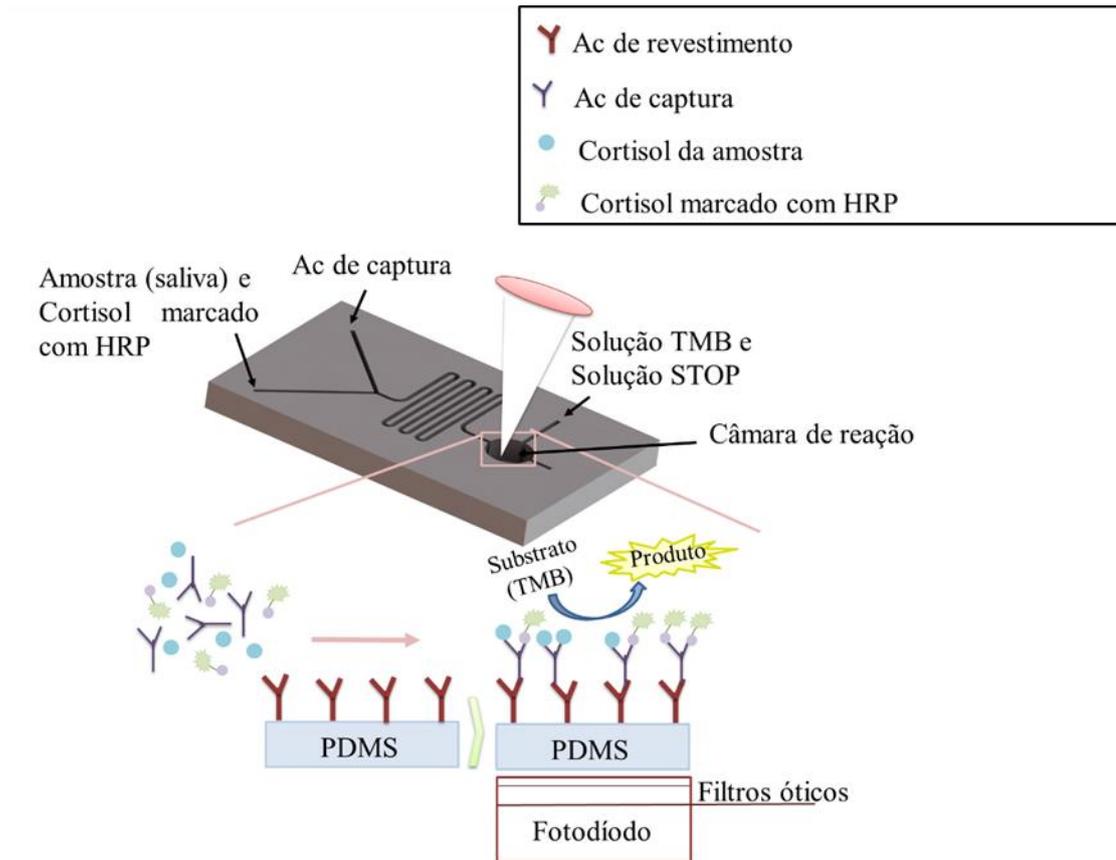


Figura 1.1 Representação esquemática do imunossensor microfluídico para o cortisol salivar.

1.3 Organização da tese

No enquadramento anteriormente descrito, e para a concretização dos objetivos definidos, o trabalho foi subdividido em vários estudos que seguem a ordem dos capítulos apresentados no presente documento. Esses capítulos englobam secções teóricas de desenvolvimento e de implementação, o trabalho experimental, os resultados obtidos e a respetiva discussão.

O capítulo 1 descreve de forma resumida o tema em estudo no âmbito deste trabalho, bem como a motivação e os principais objetivos. Por fim, é apresentada a organização do documento.

No capítulo 2 são apresentadas as considerações gerais sobre o cortisol e a sua importância clínica justificativa do presente estudo. Incluem-se, para além de todo o

mecanismo de regulação dos níveis de cortisol, os métodos atuais utilizados para a sua quantificação bem como a relevância de ultrapassar algumas limitações apresentados por estes métodos. Neste capítulo demonstra-se ainda a importância de se utilizarem fluidos biológicos alternativos ao sangue, como forma de reduzir as desvantagens do método invasivo e doloroso associado à recolha de sangue, e provavelmente provocador de *stress* com a consequente alteração dos níveis de cortisol. Por esse motivo, demonstra-se a importância clínica de se utilizar a saliva como fluido biológico, nomeadamente para a quantificação de cortisol, mas com consequente necessidade de meios de diagnósticos mais sensíveis.

O capítulo 3 contém considerações gerais sobre os imunoensaios e a sua combinação com tecnologias microfluídicas. Além disso, apresenta-se uma visão geral dos recentes desenvolvimentos dos imunossensores bem como dos materiais utilizados para o seu fabrico. Neste capítulo faz-se ainda uma breve descrição dos métodos de deteção ótica utilizados nos imunossensores microfluídicos. Por fim, são tecidas algumas considerações finais.

O capítulo 4 descreve os métodos de imobilização mais relevantes para a imobilização de Ac ou proteínas em superfície sólidas. Além disso, é feito um estudo comparativo entre três métodos de imobilização de Ac na superfície do PDMS de forma a escolher qual o mais adequado à aplicação pretendida. Para isso, apresentam-se os estudos realizados e os resultados obtidos no processamento e na caracterização das superfícies imobilizadas, que permitiram determinar o método de imobilização mais eficiente, estável e de fácil processamento para ser aplicado no sistema microfluídico para cortisol salivar.

O capítulo 5 descreve, em primeiro lugar, o processo de otimização do imunoensaio competitivo para o cortisol salivar em poços de PDMS de modo a estabelecer as condições ótimas para posterior utilização no imunossensor microfluídico. Além disso, apresenta-se a descrição e a simulação do dimensionamento e do processo de fabrico do sistema microfluídico tendo em vista a quantificação de cortisol salivar. Neste capítulo incluem-se ainda os principais resultados do trabalho realizado, nomeadamente a curva de calibração donde se conclui o limite de deteção (LD) obtido bem como a gama de trabalho conseguida com todas as condições ótimas.

No capítulo 6 são tecidas algumas conclusões e considerações finais sobre o trabalho realizado bem como algumas sugestões que poderão ser úteis nos desenvolvimentos futuros.

Referências

- [1] P. J. Lucassen, J. Pruessner, N. Sousa, O. F. Almeida, A. M. Van Dam, G. Rajkowska, *et al.*, "Neuropathology of stress," *Acta neuropathologica*, vol. 127, pp. 109-135, 2014.
- [2] D. S. Q. Koh and G. C.-H. Koh, "The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine," *Occupational and environmental medicine*, vol. 64, pp. 202-210, 2007.
- [3] F. Lederbogen, P. Kirsch, L. Haddad, F. Streit, H. Tost, P. Schuch, *et al.*, "City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans," *Nature*, vol. 474, pp. 498-501, 2011.
- [4] A. Levine, O. Zagoory-Sharon, R. Feldman, J. G. Lewis, and A. Weller, "Measuring cortisol in human psychobiological studies," *Physiology & behavior*, vol. 90, pp. 43-53, 2007.
- [5] R. A. Quax, L. Manenshijn, J. W. Koper, J. M. Hazes, S. W. Lamberts, E. F. Van Rossum, *et al.*, "Glucocorticoid sensitivity in health and disease," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 9, pp. 670-686, 2013.
- [6] H. Raff and H. Trivedi, "Circadian rhythm of salivary cortisol, plasma cortisol, and plasma ACTH in end-stage renal disease," *Endocrine Connections*, vol. 2, pp. 23-31, 2013.
- [7] C. Tsigos and G. P. Chrousos, "Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress," *Journal of psychosomatic research*, vol. 53, pp. 865-871, 2002.
- [8] L. K. Nieman, B. M. Biller, J. W. Findling, J. Newell-Price, M. O. Savage, P. M. Stewart, *et al.*, "The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 93, pp. 1526-1540, 2008.
- [9] A. Kaushik, A. Vasudev, S. K. Arya, S. K. Pasha, and S. Bhansali, "Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 53, pp. 499-512, 2014.
- [10] U. Turpeinen and E. Hämäläinen, "Determination of cortisol in serum, saliva and urine," *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 27, pp. 795-801, 2013.

- [11] M. Gröschl, "Current status of salivary hormone analysis," *Clinical Chemistry*, vol. 54, pp. 1759-1769, 2008.
- [12] R. C. Stevens, S. D. Soelberg, S. Near, and C. E. Furlong, "Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system," *Analytical chemistry*, vol. 80, pp. 6747-6751, 2008.
- [13] M. Yamaguchi, Y. Matsuda, S. Sasaki, M. Sasaki, Y. Kadoma, Y. Imai, *et al.*, "Immunosensor with fluid control mechanism for salivary cortisol analysis," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 41, pp. 186-191, 2013.
- [14] L. Q. Chen, X. J. Kang, J. Sun, J. J. Deng, Z. Z. Gu, and Z. H. Lu, "Application of nanofiber-packed SPE for determination of salivary-free cortisol using fluorescence precolumn derivatization and HPLC detection," *Journal of separation science*, vol. 33, pp. 2369-2375, 2010.
- [15] A. M. Sesay, L. Micheli, P. Tervo, G. Palleschi, and V. Virtanen, "Development of a competitive immunoassay for the determination of cortisol in human saliva," *Analytical biochemistry*, vol. 434, pp. 308-314, 2013.
- [16] C. Tlili, N. V. Myung, V. Shetty, and A. Mulchandani, "Label-free, chemiresistor immunosensor for stress biomarker cortisol in saliva," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 4382-4386, 2011.
- [17] A. Bange, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Microfluidic immunosensor systems," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2488-2503, 2005.
- [18] Y. Ling, "Modified plastic surfaces for high performance microfluidic immunoassay devices," 2009.
- [19] C.-C. Lin, J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, "Microfluidic immunoassays," *Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 15, pp. 253-274, 2010.
- [20] N. Bojorge Ramírez, A. Salgado, and B. Valdman, "The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives," *Brazilian journal of chemical engineering*, vol. 26, pp. 227-249, 2009.
- [21] V. C. Pinto, P. J. Sousa, V. F. Cardoso, and G. Minas, "Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities," *Micromachines*, vol. 5, pp. 738-755, 2014.

2 Quantificação de cortisol salivar

Neste capítulo apresenta-se a importância da saliva como fluido de diagnóstico e a sua relevância na quantificação de cortisol. Apresentam-se ainda os principais distúrbios relacionados com as variações dos níveis do cortisol, bem como os seus métodos convencionais de deteção.

2.1 Importância do cortisol no corpo humano

O cortisol, também conhecido como biomarcador de *stress*, é uma hormona esteróide muito importante do corpo humano [1-4]. As hormonas são moléculas extremamente poderosas, produzidas em glândulas específicas e reguladas pelo sistema endócrino, que têm como principal função estabelecer a comunicação entre os diversos tecidos e sistemas orgânicos regulando os processos fisiológicos. No corpo humano existem mais de cinquenta hormonas diferentes e cada uma delas apresenta uma série de funções específicas [5]. O cortisol, sendo ele uma hormona, desempenha um papel fundamental na regulação de vários processos fisiológicos, tais como, a manutenção de níveis normais de glicose no sangue, a regulação da pressão sanguínea, a regulação do equilíbrio homeostático do sistema

cardiovascular, dos sistemas imunitário, renal, músculo-esquelético, nervoso e do próprio sistema endócrino. Apesar de estar relacionado com variadíssimos processos fisiológicos, o cortisol apresenta como uma das suas principais funções a regulação do metabolismo energético. Sempre que é desencadeada uma resposta a um estímulo *stressante* ou detetado um nível baixo de açúcar no sangue, é produzido cortisol pelo córtex adrenal e utilizado para estimular o processo da gliconeogénese no fígado (produção de glicose a partir de precursores não glicídicos). Para isto, o cortisol aumenta a produção das enzimas necessárias para converter os aminoácidos em glicose. Por outro lado, quando existem níveis elevados de açúcar no sangue, o cortisol estimula a glicogénese que diminui os níveis de açúcar no sangue. Portanto, o cortisol desempenha um papel importante na regulação minuciosa dos níveis de glicose que circulam na corrente sanguínea [6, 7]. Em adição à função metabólica, o cortisol desempenha também um papel fundamental no sistema imunitário. Entre outros, esta hormona evita uma sobre-ativação da resposta inflamatória em casos de inflamação crónica, através do bloqueio da proliferação de células T e inibição da secreção de histamina [6, 8].

Os níveis de cortisol nos fluidos biológicos são afetados por vários fatores, entre os quais se encontram a atividade física, algumas patologias, e a resposta do organismo a situações de *stress* crónico. Este último fator, tem mostrado grande impacto por parte do sistema de saúde devido ao aumento drástico dos níveis de *stress* provocado pela globalização, estilo de vida alterado e competição social que, em casos extremos, leva a doenças fatais, tais como enfarte do miocárdio, depressão, entre outras.[8, 9]. Por este motivo, têm sido feitos esforços para desenvolver dispositivos que permitam a quantificação exata e precisa do *stress* crónico de forma a obter informações úteis para o diagnóstico e o tratamento atempado. Assim, a quantificação dos níveis de cortisol tornou-se um biomarcador importante para o diagnóstico de *stress* e prevenção de doenças associadas.

O cortisol está presente no organismo em duas formas distintas onde a maior fração, cerca de 94%, é representada pelo cortisol ligado a proteínas específicas de transporte (CBG do inglês *corticosteroid binding globulin* e albumina) responsáveis por controlar a penetração do cortisol através da membrana plasmática para as células alvo. O restante encontra-se na forma livre, correspondendo a cerca de 6 % do cortisol total, que é a única fração biologicamente ativa e responsável por todas as atividades relacionadas com o cortisol no corpo [10-12]. Na prática clínica, a quantificação dos níveis de cortisol é feita pelo cortisol total (soma do cortisol ligado às proteínas com o cortisol livre). Contudo, a fim de

diagnosticar com precisão e de tratar patologias relacionadas com o cortisol, é necessária uma avaliação regular do cortisol livre. A maioria das estratégias atuais para a estimativa do cortisol livre limitam-se a técnicas laboratoriais complexas, demoradas, caras e exigem grandes volumes de amostra, pelo que não são utilizadas na monitorização em tempo real e em contínuo [13, 14]. Existe assim uma necessidade de desenvolver plataformas para a deteção de cortisol que satisfaçam estas características, fornecendo informação valiosa de uma forma mais simples e rápida que poderá ajudar a melhorar o diagnóstico e o tratamento por parte do médico. Como tal, o objetivo deste trabalho visa superar as limitações apresentadas pelos sistemas atualmente utilizados fornecendo uma plataforma miniaturizada para a quantificação de cortisol, com baixo consumo de amostras e reagentes, descartável, de fácil utilização, com redução do tempo de análise e de baixo custo.

2.2 Secreção do cortisol

O cortisol é uma hormona esteróide, da classe dos glucocorticoides, de baixo peso molecular (aproximadamente 362 Da) produzida pela adrenal. A regulação da produção desta hormona depende do controlo do eixo hipotálamo – pituitária – adrenal (HPA do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*) através de uma cascata de sinais neuronais e endócrinos [3, 7, 8, 13, 15]. O processo de secreção do cortisol pela adrenal é iniciado no hipotálamo em resposta a estímulos, tais como *stress*, hemorragias, dores, infeções, exercício físico, entre outras, que levam à produção de neurotransmissores, nomeadamente, a acetilcolina e serotonina. Estes neurotransmissores induzem a produção da hormona libertadora de corticotrofina (CRH do inglês *corticotropin releasing hormone*), a qual viaja para a glândula pituitária. Na glândula pituitária, a CRH interage com os recetores específicos na membrana plasmática das células secretoras da hormona adrenocorticotrofina (ACTH do inglês *adrenocorticotrophic hormone*) provocando a sua libertação para a corrente sanguínea. Esta hormona vai interagir com recetores específicos da membrana plasmática das células da zona fascicular e zona reticular do córtex da adrenal. No córtex da adrenal a ACTH estimula a secreção do cortisol [6, 11, 16].

Em situações normais (ausente de *stress*), o CRH é libertado de uma forma circadiana e pulsátil com uma frequência de cerca de dois a três episódios de secreção por hora. Em

condições de repouso, a amplitude dos pulsos de CRH aumenta antes de acordar, resultando num aumento da libertação de ACTH e cortisol na corrente sanguínea [7, 11].

O eixo HPA funciona por retroalimentação negativa, onde o cortisol desempenha um papel fundamental na regulação da atividade do eixo, nomeadamente, no controlo da síntese de CRH e de ACTH (figura 2.1). Portanto, concentrações elevadas de cortisol na corrente sanguínea inibem a produção de CRH e de ACTH, assim como concentrações baixas induzem a sua secreção [11, 17]. Em resumo, o corpo humano regula os níveis de cortisol controlando a sua secreção e a sua produção com base nos níveis presentes na corrente sanguínea.

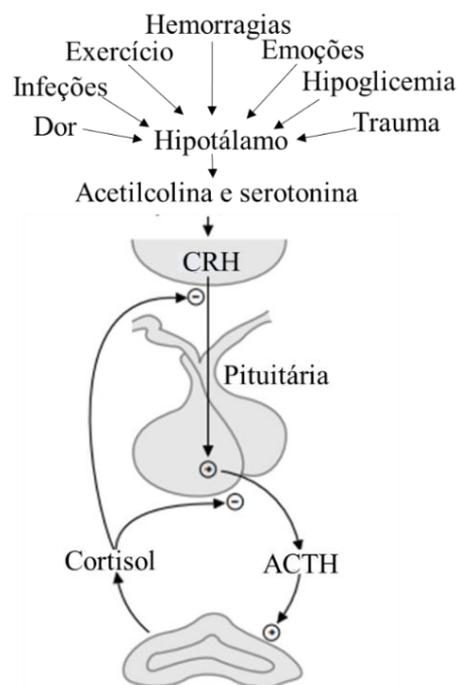


Figura 2.1 Mecanismo de regulação da secreção do cortisol (adaptado de [12]).

2.3 Variação dos níveis de cortisol com o ciclo circadiano

O ciclo circadiano consiste em oscilações biológicas que ocorrem num período de aproximadamente 24 h e estão presentes em quase todos os seres vivos [18]. Este ciclo baseia-se num relógio biológico que permite preparar e controlar o organismo para as mudanças físicas e ambientais, permitindo-lhe responder de forma adequada no momento certo do dia. Nos mamíferos, este relógio biológico encontra-se no cérebro formado pelas

células do núcleo supraquiasmático (NSQ) situadas na base do hipotálamo [18-20]. Esta estrutura recebe informação da luz como estímulo principal para sincronizar a sua atividade circadiana com o ciclo dia-noite. Portanto, este sistema funciona como o relógio central responsável pela coordenação de vários processos fisiológicos e psicológicos, incluindo o ciclo de repouso-atividade, apetite, temperatura corporal, pressão arterial, síntese e secreção de hormonas, como o cortisol [18, 19, 21].

O cortisol, tal como referido anteriormente, é uma hormona extremamente rítmica com uma libertação diurna bem definida. A libertação de cortisol apresenta, tipicamente, um pico máximo de manhã (pouco antes de acordar) com níveis decrescentes ao longo do dia, atingindo um mínimo à noite (por volta da meia-noite) e um aumento acentuado na segunda metade da noite (figura 2.2).

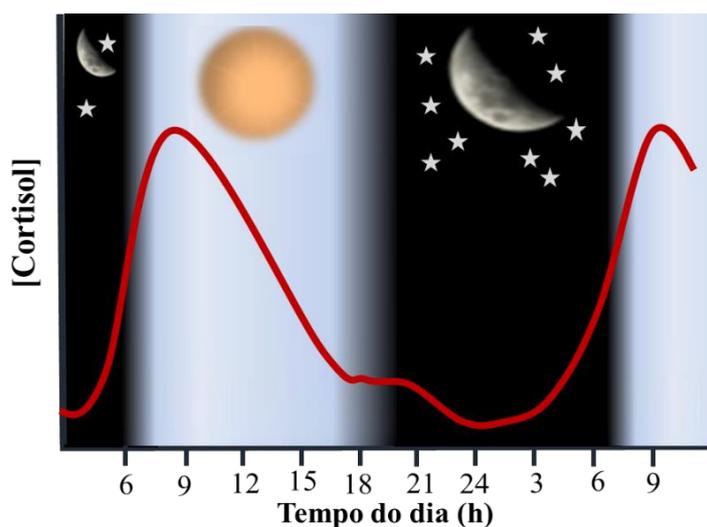


Figura 2.2 Variação típica dos níveis de cortisol ao longo de um ciclo de 24 h (adaptado de [11]).

Vários estudos foram realizados para comprovar a relação da secreção do cortisol com o ciclo circadiano. Estes estudos consistiram na quantificação de cortisol plasmático e do cortisol salivar durante um período de 24 h em indivíduos jovens e saudáveis. Os resultados demonstraram que o cortisol, quer o plasmático [22] quer o salivar [23], exibiu um ritmo circadiano. No plasma, os níveis de cortisol variaram de 40 ng/mL às 23 h para 200 ng/mL às 9 h. O cortisol salivar atingiu um pico às 8 h, com uma concentração de 4,2 ng/mL, e um mínimo às 22 h, com uma concentração de 1,1 ng/mL. Estes estudos permitiram concluir que

os níveis de cortisol atingem o pico no início da manhã e vão tendo uma redução gradual ao longo do dia [22, 23].

A variação diária dos níveis de cortisol é uma característica fundamental que se relaciona com vários mecanismos muito em especial com o sono. Por outro lado, pode ocorrer desregulação da secreção do cortisol (híper ou hipossecreção) devido, por exemplo, ao *stress* crónico, podendo induzir o aparecimento de diversas condições patológicas, nomeadamente, perturbações do metabolismo de hidratos de carbono e de lípidos, perturbações da resposta imunológica, da atividade cardiovascular e das funções cognitivas do cérebro [18, 24]. Desta forma, torna-se evidente que é importante não só medir os níveis de cortisol que circulam no corpo num determinado momento, mas também a sua atividade rítmica, uma vez que ela desempenha um papel significativo na saúde. Portanto, torna-se relevante compreender os mecanismos de regulação do ritmo diário de cortisol e a sua importância fisiológica, de modo a fornecer uma visão de diagnóstico e de tratamento clínico das doenças que estejam relacionadas com a secreção anormal do cortisol [4, 18].

2.4 Patologias relacionadas com o cortisol

Os níveis de cortisol no corpo humano podem ser influenciados por diversos fatores, nomeadamente, por perturbações relacionadas com o *stress*, caracterizadas por uma produção excessiva ou por um ciclo circadiano anormal do cortisol. Outro fator é o mau funcionamento das glândulas com conseqüente produção aumentada ou muito reduzida de cortisol. Seguidamente descreve-se a influência de cada um destes fatores.

2.4.1 Efeito do *stress* nos níveis de cortisol

Sempre que um desafio endógeno ou exógeno é percebido como desagradável, aversivo ou ameaçador e, portanto, reconhecido pelo organismo como um estímulo *stressante*, são ativados uma série de processos para gerarem uma resposta coordenada a esse desafio, denominada resposta ao *stress* (figura 2.3) [8, 15]. Esta resposta biológica adaptativa ao *stress* é particularmente ativada quando a homeostase, o bem-estar ou a saúde de um

indivíduo está ameaçada. A simples percepção de medo (susto) bem como a presença de notícias desagradáveis, problemas de relacionamento ou problemas económicos, o luto, a imprevisibilidade são situações comuns que podem iniciar uma resposta ao *stress*. Para além de situações emocionais, perturbações físicas, tais como, uma lesão física, hemorragias, ou uma inflamação, podem também desencadear este tipo de resposta. Contudo, as respostas fisiológicas ao *stress* podem ainda ocorrer após estímulos positivos (como por exemplo, ganhar uma competição) com a mesma intensidade das respostas a estímulos mais adversos, embora muitas vezes não sejam consideradas como fatores de *stress* [4, 15].

De uma forma geral, a resposta ao *stress* pode ser dividida em dois domínios diferentes com uma resposta muito rápida e uma resposta mais lenta. O primeiro tipo de resposta, que é considerado uma "reação de alarme", envolve a ativação do sistema nervoso autónomo (SNA) com secreção de epinefrina e norepinefrina [15, 25]. Estas hormonas são responsáveis por aumentar o ritmo cardíaco, a pressão arterial e a frequência respiratória, a ativação da resposta imunitária e o aumento do fluxo sanguíneo quer no coração, quer no cérebro, quer nos tecidos músculo-esqueléticos de forma a preparar o corpo com uma resposta de "luta ou fuga". Em simultâneo com a ativação do SNA, ocorre uma resposta mais lenta, mediada por glucocorticoides (hormona de cortisol) como consequência da ativação do eixo HPA. Estas hormonas têm diversas funções sobre a maioria dos tecidos alterando o seu metabolismo, síntese de proteínas, resistência imunológica, entre outras. A ativação destes sistemas, isto é, do SNA e do eixo HPA, tem como objetivo preparar o corpo para uma resposta rápida preservando o equilíbrio homeostático [8, 15].

Dependendo da intensidade e do tempo de exposição ao *stress*, ele pode ser considerado *stress* agudo ou crónico. O *stress* agudo ou de curto prazo é geralmente considerado normal e benéfico para o indivíduo com uma resposta "bem-adaptada" recuperando o seu estado de equilíbrio [15]. Por outro lado, quando o estímulo *stressante* persiste por vários dias, semanas ou meses, é considerado *stress* crónico, com ativação excessiva e prolongada do eixo HPA que pode levar ao aparecimento de alterações patológicas provocadas por níveis elevados de cortisol que se prolongam ao longo do tempo. O cortisol tem no seu conjunto um efeito catabólico, contribuindo positivamente para a ação defensiva contra o *stress*. No entanto, se os níveis de cortisol ultrapassarem os níveis normais por um período extenso, pode levar a efeitos negativos, nomeadamente, diminuição da capacidade de resposta do sistema imunitário aumentando a suscetibilidade a determinadas

doenças, aumento da glicemia e da massa gorda, e perda de massa muscular. Para além disso, o *stress* crónico pode levar a alterações no sistema nervoso central e consequentemente levar ao desencadeamento de doenças psiquiátricas como ansiedade, esgotamento e depressão [15, 25, 26].

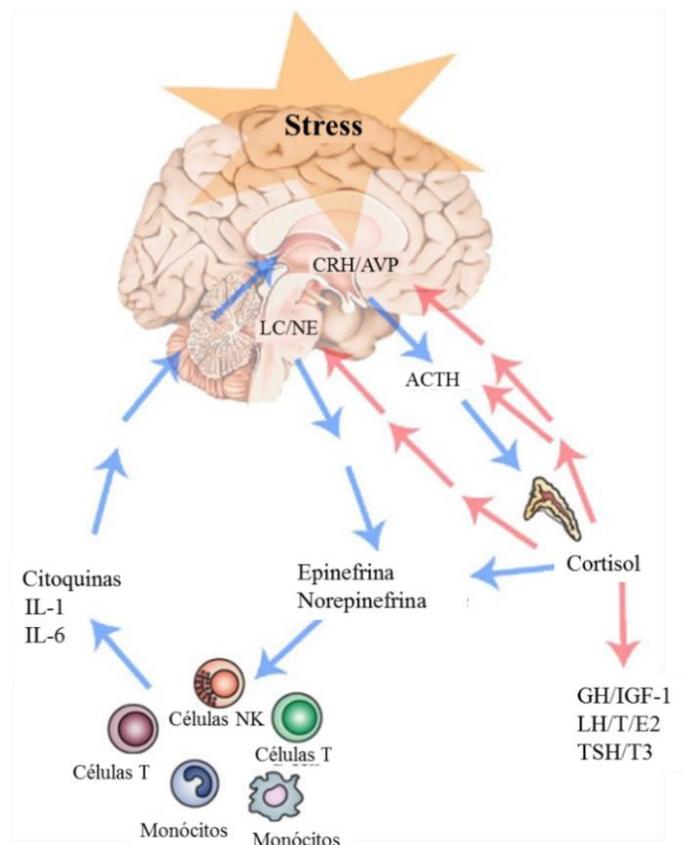


Figura 2.3 Representação esquemática simplificada da reação ao *stress* e os seus efeitos durante a resposta. O eixo HPA é controlada por vários mecanismos que tendem a normalizar a secreção de cortisol. A ativação do eixo HPA leva à supressão do eixo de hormona luteinizante (LH do inglês *luteinizing hormone*)/testosterona (T)/estradiol (E2), hormona de crescimento (GH do inglês *growth hormone*)/fator de crescimento semelhante à do eixo insulina tipo 1 (IGF-1 do inglês *insulin-like growth factor*) e do eixo da hormona estimuladora da tiróide (TSH do inglês *thyroid-stimulating hormone*)/ triiodotironina (T3). As linhas azuis indicam estimulação; as linhas vermelhas indicam inibição (adaptado de [23]).

Recentemente, vários estudos apresentaram um aumento dessas doenças psiquiátricas provocado pelas novas exigências da sociedade, nomeadamente, necessidade de alteração do estilo de vida, competição e derrota social [3, 4]. Segundo a OMS as doenças mentais relacionadas com o *stress*, serão a segunda principal causa de doença em 2020. Por esse

motivo, têm sido feitos esforços para a monitorização do *stress*, nomeadamente na deteção dos níveis aumentados de *stress* (resposta mal-adaptada) e na prevenção de doenças associadas [16].

No que diz respeito ao *stress* agudo, vários estudos foram feitos para avaliar a resposta ao *stress* de indivíduos expostos a diferentes estímulos ambientais recorrendo à quantificação de cortisol. Weibel *et al.* (2003) [24], avaliaram o *stress* provocado por um ambiente de trabalho extremamente *stressante* através da quantificação de cortisol salivar. Entre as várias profissões, os médicos encontram-se entre os que estão mais expostos a condições de elevado *stress* devido à elevada responsabilidade exigida. Neste estudo, o cortisol salivar foi medido em sujeitos que trabalhavam num hospital na unidade de cuidados de emergência. Estas medições foram feitas durante um dia de trabalho, a cada 2 h entre 9 e 19 h. As concentrações de cortisol salivar dos técnicos de emergência foram comparadas com concentrações em indivíduos com o mesmo sexo e a mesma idade durante o seu tempo de lazer. Os resultados obtidos mostraram um aumento significativo dos níveis de cortisol nos técnicos de emergência durante o tempo de trabalho em comparação com os indivíduos utilizados para controlo. Estes investigadores comprovaram a correlação dos níveis de cortisol com o *stress*, demonstrando ser um método bastante atraente e fiável para avaliar o *stress* emocional [13, 24]. Vivian *et al.* (2003) [25], recorreram à quantificação de cortisol para compreender o *stress* provocado em alunos universitários perante uma avaliação. Para isso, estes investigadores mediram os níveis de cortisol de estudantes de odontologia antes e depois de um exame académico. Os resultados experimentais mostraram níveis de cortisol mais elevados antes do exame (média: 2,29 ng/mL) do que após o exame (média: 1,87 ng/mL). Estes estudos concluíram que os níveis de cortisol salivar aumentam com o *stress* agudo comprovando mais uma vez a importância do cortisol como biomarcador para monitorização do *stress* [16, 25].

Relativamente ao *stress* crónico, alguns autores basearam-se na quantificação de cortisol para avaliar este tipo de *stress* em indivíduos com depressão, obesidade, diabetes ou outras doenças. Nestes estudos, foi possível comprovar que, normalmente, existe uma relação de hiperatividade do eixo HPA e dos níveis elevados de cortisol com a ocorrência destas doenças provocadas por *stress* crónico. Para além disso, numa resposta mal-adaptada ao *stress* crónico podem ainda ocorrer variações anormais do ciclo circadiano [26-28].

2.4.2 Efeito do mau funcionamento das glândulas nos níveis de cortisol

O grande interesse clínico na medição dos níveis de cortisol também reside no facto de que em muitos estados patológicos são evidentes distúrbios dos níveis de cortisol. Em casos extremos de hipercortisolismo, o excesso de cortisol pode conduzir à disfunção do eixo HPA, que pode levar ao desenvolvimento do Síndrome de *Cushing* com sintomas que incluem obesidade, fadiga, fragilidade óssea e da pele, bem como desenvolver hipercortisolismo não autónomo (pseudo-*Cushing*) que está associado a várias doenças, como transtornos psiquiátricos, obesidade mórbida, diabetes tipo 2 e alcoolismo [7, 13, 15, 29]. Os níveis elevados de cortisol podem ainda inibir a resposta inflamatória debilitando o sistema imunitário e aumentando os níveis de lípidos e aminoácidos no sangue. Por outro lado, níveis de cortisol baixos podem ser observados em indivíduos com hiperplasia adrenal congénita (HAC) e, em casos extremos de hipocortisolismo, podem levar ao desenvolvimento da doença de *Addison* com sintomas que incluem perda de peso, fadiga, escurecimento da pele e dobras cutâneas. Além disso, os indivíduos que sofrem de trauma físico extremo, bem como os indivíduos que são submetidos a cirurgias profundas podem necessitar de um acompanhamento rigoroso dos níveis de cortisol, uma vez que a função adrenal pode ficar comprometida, sendo esta uma das complicações mais frequente em cirurgia [1, 13, 30]. Outras patologias associadas com níveis de cortisol baixos incluem o síndrome de fadiga crónica e a fibromialgia [13, 31, 32].

2.5 Fluidos biológicos para quantificação de cortisol

Fluido biológico é a designação dada aos compostos líquidos presentes nos organismos vivos. No ser humano, os fluidos mais importantes são o sangue (o soro e o plasma), a urina, a saliva, a bÍlis, o fluido cerebrospinal, o fluido linfático, fluido intersticial (fluido extracelular que rodeia as células no corpo humano), o fluido lacrimal e o fluido sinovial. Estes fluidos apresentam diversos constituintes como água, vários iões, aminoácidos, glícidos, lípidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, entre outros,

constituintes estes que podem ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico para determinadas doenças [36].

A hormona de cortisol é libertada na corrente sanguínea, e conseqüentemente, difunde-se para diversos fluidos biológicos, tais como o sangue, a urina, o fluido intersticial e a saliva. O sangue é o fluido biológico com maior concentração de cortisol, com valores normais que variam entre 250 µg/mL (de manhã) a 20 µg/mL (à meia-noite) [12]. Apesar disso, este fluido biológico apresenta alguns inconvenientes no fornecimento de amostra para análise. Em primeiro lugar, a recolha de amostra de sangue é obtida pelos métodos tradicionais requerendo pessoal médico e equipamento especializado e esterilizado. Além disso, requer a perfuração de veias, um procedimento doloroso para o paciente que pode provocar um pequeno *stress* agudo podendo levar a um ligeiro aumento dos níveis de cortisol e, por isso, pode induzir resultados enganosos. Outra desvantagem do sangue é que 94% do cortisol está no estado inativo (ligado a CBG e a albumina) e apenas 6% do cortisol total está no estado biologicamente ativo (cortisol livre) [11, 12]. Tipicamente, os ensaios para a quantificação de cortisol no sangue envolvem a quantificação de cortisol total através do qual é deduzida a fração ativa, também designada por índice de cortisol livre (ICL), utilizando a equação de Coolen [37, 38]:

$$U^2K(1+N)+U[1+N+K(T-C)]-C=0 \quad (2.1)$$

onde U representa a concentração molar do cortisol não ligado, C é a concentração molar de cortisol total do soro, T é a concentração de CBG, K é a afinidade de CBG para o cortisol à temperatura de 37°C e N é a razão de albumina ligada com o cortisol livre do soro sendo 1,74 o valor convencionalmente utilizado [34].

A urina tem sido também considerada um fluido biológico relevante para a quantificação de cortisol, uma vez que contém apenas cortisol na sua forma livre. A variação normal para o cortisol na urina é de 10 – 100 µg/24 h [11, 13, 14]. Além disso, a excreção de hormonas, sais e outros produtos químicos residuais através da urina é um processo bem caracterizado. No entanto, a quantificação de cortisol na urina requer uma recolha contínua da totalidade de urina excretada no período de 24 h, o qual é designado por teste de cortisol livre urinário de 24 h. A necessidade de realizar uma recolha por um período mais prolongado, deve-se ao facto da excreção de determinadas substâncias na urina variarem

consoante a hora do dia. Por este motivo, utiliza-se um período de recolha mais longo, de forma a minimizar essas variações naturais [13, 36]. Apesar de ser um método de recolha não-invasivo e indolor, poderá causar algum embaraço e desconforto para o indivíduo, pois este deverá transportar consigo um recipiente específico para recolha de urina ou ficar confinado a um espaço durante o período referido. Tudo isto limita a utilização da urina para determinação de níveis de cortisol em tempo real bem como em sistemas POC [11, 36].

Outro fluido biológico onde se pode encontrar quantidades detetáveis de cortisol é no fluido intersticial, presente em todos os tecidos, que apresenta uma composição semelhante ao plasma sanguíneo. Os níveis de cortisol presentes neste fluido encontram-se na mesma proporção que no sangue, o que torna o fluido intersticial atraente para a análise de cortisol. No entanto, este fluido apresenta algumas limitações, principalmente, no que diz respeito ao seu método de recolha. Na literatura, têm sido referidas várias abordagens tendo em conta um processo minimamente invasivo e indolor. Contudo, estes métodos apresentam ainda algumas limitações, nomeadamente, a dificuldade de obtenção instantânea de níveis de cortisol, biocompatibilidade e esterilização dos novos materiais, e risco de infeções [11].

Nos últimos anos, a saliva emergiu como fonte de amostras preferencial para a medição dos níveis de cortisol devido às suas inúmeras vantagens. Em primeiro lugar, o método de recolha da saliva é um método não-invasivo e indolor provocando menos ansiedade aos indivíduos reduzindo a resposta ao *stress*. Por isso, permite amostragens repetidas em ambientes naturais e em curtos intervalos de tempo, sem a necessidade de pessoal e equipamento especializado, possibilitando uma monitorização contínua dos níveis de cortisol, o que é essencial para avaliar as variações ao longo do ciclo circadiano [10, 11, 16, 36]. Para a recolha da saliva, podem utilizar-se dispositivos pequenos e simples (por exemplo *Salivettes*) permitindo que esta seja efetuada pelo próprio utilizador fora do ambiente hospitalar (auto-recolha), o que facilita a sua utilização em testes POC [37, 38]. Em segundo lugar, o cortisol na saliva está presente apenas no estado livre, estado este que é a forma desejável para a sua deteção, ao contrário do que ocorre com o cortisol sanguíneo. Além disso, os níveis de cortisol salivar são bem correlacionados e bem documentados com os níveis de cortisol no sangue permitindo o mesmo diagnóstico. As amostras de saliva refletem também os níveis dos biomarcadores em tempo real, ao contrário de outros fluidos biológicos, tais como a urina que é armazenada na bexiga algumas horas antes da amostragem [11, 39, 40]. Contudo, a saliva apresenta algumas limitações que podem

afetar negativamente a escolha da saliva para a detecção de cortisol. Uma vez que apenas o cortisol livre está presente na saliva, a concentração de cortisol na saliva é muito menor do que no sangue. Os valores normais para o cortisol na saliva durante o ciclo diurno variam de 1 a 8 ng/mL, requerendo ensaios com elevada sensibilidade e baixos LD [41, 42]. Além disso, a avaliação do ciclo circadiano durante o período de sono apresenta-se como uma limitação, uma vez que a recolha de saliva exige que o indivíduo esteja acordado. Contudo, quando a finalidade é a obtenção de amostras para testes de diagnóstico, a recolha durante o período de vigília é suficiente.

Assim, tendo em conta o processo invasivo para a recolha do sangue e do fluido intersticial, o que pode provocar *stress*, bem como o desconforto de recolha e dificuldade de obter urina em momentos específicos do dia, a saliva mostra-se como o fluido biológico que melhor satisfaz as necessidades para a determinação circadiana dos níveis de cortisol durante o período de vigília. Por este motivo, o dispositivo desenvolvido neste trabalho foi pensado para a gama de trabalho e para o baixo LD que permitem a quantificação de cortisol salivar.

2.6 Composição e função da saliva

A saliva é um fluido corporal essencial para a saúde da cavidade oral. É um líquido incolor constituído por 98% de água com densidade entre 1,002 e 1,012 kg/m³ e pH de cerca de 6,64. Contém uma variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, magnésio, bicarbonato e fosfatos) e proteínas representadas por várias enzimas, imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) e outros fatores antimicrobiais, mucinas, hormonas (cortisol, andrógenos, estrogénios, progesterona e aldosterona), e alguns polipeptídeos e oligopeptídeos de importância para a saúde oral. Estão também presentes na saliva glicose e produtos azotados, tais como: ureia e amoníaco [43, 44]. Todos estes compostos são responsáveis por várias funções atribuídas à saliva [44, 45].

As principais funções da saliva são lubrificação, participação na cicatrização de feridas e interação contínua com a superfície dos dentes contribuindo para a sua mineralização. Além disso, a saliva é a primeira barreira contra xenobióticos e microrganismos e influencia, potencialmente, a colonização não só da cavidade oral mas

também de muitos outros órgãos do corpo [46]. A atividade antibacteriana e antiviral é atribuída principalmente às imunoglobulinas e mucinas salivares, que se ligam às bactérias e previnem a adesão de bactérias ao esmalte do dente. A saliva contém também a lisozima, uma enzima que é capaz de matar bactérias contribuindo para o controlo das populações microbianas na boca. Os bicarbonatos, fosfatos e ureia atuam para modular o pH e a capacidade tampão da saliva [45].

Relativamente à origem da saliva pode considerar-se dois tipos, um tipo corresponde à saliva específica de cada glândula, a qual pode ser obtida diretamente a partir das glândulas salivares individuais, e o outro tipo é a saliva total. A saliva é segregada principalmente por três pares de glândulas: parótidas (20 %), submandibulares (65-70 %) e sublinguais (7-8 %). Estas glândulas são responsáveis pela produção de aproximadamente 90% do volume total de saliva, sendo os restantes (<10 %) produzidos principalmente por uma série de glândulas salivares menores [47]. A saliva total corresponde a uma mistura de fluídos orais que incluem as secreções das glândulas salivares juntamente com vários constituintes de origem não salivar, como o fluido crevicular gengival (FCG), secreções nasais e bronquiais expetoradas, derivados do sangue provenientes de lesões orais, bactérias e produtos bacterianos, vírus, fungos, células epiteliais descamadas, outros compostos celulares e substâncias extrínsecas (restos de bebidas e alimentos, pasta dentífrica, etc). A saliva total é mais frequentemente utilizada para o diagnóstico de doenças sistémicas, porque pode ser facilmente recolhida e, mais importante, contém compostos do soro [48]. Por este motivo, futuramente, será a saliva total o fluido biológico utilizado no imunossensor desenvolvido neste trabalho.

2.6.1 Condições de recolha e tratamento de amostras salivares

2.6.1.1 Recolha de amostras de saliva

As condições no interior da cavidade oral podem ser influenciadas por vários fatores (especialmente, pelo fumo, refeições e bebidas) tendo um forte impacto sobre a composição e taxa de fluxo da saliva. Assim, para que os valores obtidos sejam comparáveis é necessário que as condições de recolha sejam as mais semelhantes possíveis. Existem diferentes abordagens para a recolha da saliva que seguem instruções diferentes, contudo, todas elas

baseiam-se nas mesmas regras: as amostras de saliva são geralmente recolhidas antes de escovar os dentes; os utilizadores devem abster-se de fumar, comer e beber durante 1 a 2 h antes da recolha; e é necessário a lavagem da boca com água fria para remover os restos de alimentos e de outros contaminantes não salivares antes da recolha [49, 50].

Existem vários dispositivos que podem ser utilizados para a recolha da saliva, baseados em dois tipos de procedimentos: através de estimulação (utilizando um rolo de algodão ou de fibra sintética biocompatível); ou de salivacão passiva para um tubo de plástico (método de recolha no qual o indivíduo expela saliva diretamente para um recipiente de plástico). Atualmente, os sistemas mais utilizados são através da estimulação, tais como, o *Salivette*® (*Sarstedt*, figura 2.4a), o *Quantisal*® (*Immunoanalysis*, figura 2.4b), e o *Intercept*® (*OraSure Technologies*, figura 2.4c). Estes utilizam um rolo de algodão ou de fibra sintética biocompatível absorvente que é mantido na boca, quer sob a língua ou na parede interna da face, para absorver a saliva por um período de tempo normalizado (1 a 2 min), sendo de seguida transferido para um recipiente de armazenamento [51]. Seguidamente, processa-se à centrifugação para remoção da amostra de saliva do algodão e para posterior utilização. Estes dispositivos têm originado resultados reprodutíveis para a análise de muitos esteróides salivares [10]. Entre estes sistemas, o *Salivette* é o método de recolha de saliva preferido, uma vez que pode ser manipulado pelos indivíduos sem necessidade de pessoal técnico. Além disso, existe no mercado o *Salivette*® *Cortisol*, que foi especialmente projetado para a recolha de amostras de saliva para determinação de cortisol. Este sistema de recolha permite a posterior obtenção de valores analíticos precisos com pequenos volumes de amostra (cerca de 50 µL). A eficácia do *Salivette*® *Cortisol* é estabelecida não apenas pela quantidade de volume de amostra recuperado, mas mais importante pelo elevado volume de cortisol recuperado. Este método mostrou ser o mais eficaz para a recolha de saliva para posterior determinação do cortisol. Poll *et al.* (2007) [52], realizaram um estudo para comparar a eficiência do método de recolha na análise desta molécula. Neste estudo foram comparados os níveis de cortisol do soro com os níveis de cortisol salivar, obtidos através de dois métodos de recolha diferente: o método de salivacão passiva e o método de estimulação com a utilização do *Salivette*. Os resultados demonstraram uma maior confiabilidade para a quantificação de cortisol salivar utilizando o *Salivette* como método de recolha.

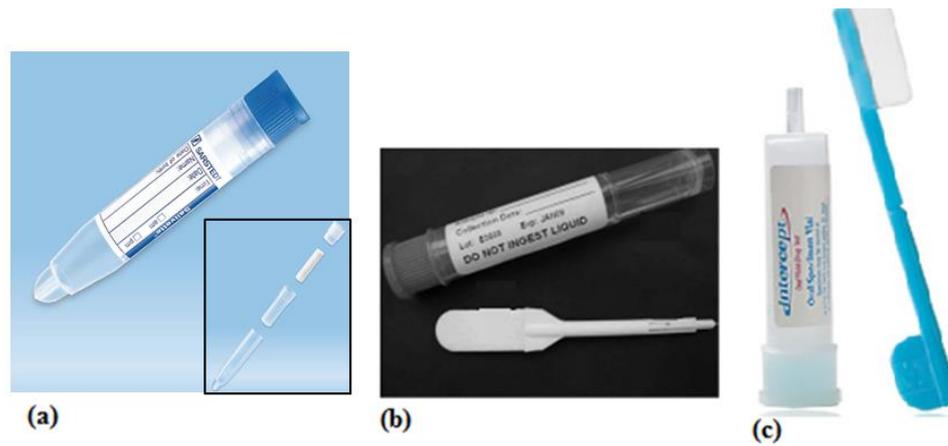


Figura 2.4 Dispositivos para recolha de saliva: (a) *Salivette*® (adaptado de [51]), (b) *Quantisal*® (adaptado de [10]) e (c) *Intercept*® [53].

2.6.1.2 Tratamento das amostras de saliva

As amostras de saliva são notoriamente difíceis de tratar devido à sua elevada viscosidade e à presença de restos alimentares e células. Em canais microfluídicos torna-se uma grande ameaça, uma vez que apresentam elevado risco de entupimento. Por esse motivo, algumas etapas básicas de preparação das amostras são necessária antes de a saliva ser utilizada em sistemas com canais microfluídicos [54], tais como: filtração (filtros de seringa, ultrafiltração e filtros-H microfluídicos), centrifugação, diluição, congelamento-descongelamento e lise celular [54, 55].

Para aplicações microfluídicas o método de preparação por filtração é o mais apropriado. Neste método pode optar-se por vários tipos de filtros, sendo os mais utilizados os filtros de seringa com poros de tamanho de $0,2 \mu\text{m}$ e o filtro de membrana *Mini-UniPrep*, ambos podendo ser obtidos comercialmente [56]. A filtração ocorre por aplicação de uma pressão manual que força a passagem da amostra de saliva através de uma membrana, a partir de um recipiente externo para um compartimento interno, permitindo assim, a sua posterior utilização para análise. Outros sistemas de filtragem com grande interesse para aplicações microfluídicas são os filtros-H microfluídicos (figura 2.5) [54]. Um filtro-H é uma geometria de co-fluxo, o qual pode ser utilizado para fins de filtração ou extração líquido-líquido. Neste filtro, reúnem-se dois líquidos num canal (canal de difusão) com um fluxo paralelo. Com base nas condições de fluxo laminar, os líquidos não se misturam e podem ser separados

novamente após o processo de filtração. A filtração ocorre apenas por difusão onde as partículas ou moléculas mudam de um líquido para o outro. A distância percorrida de um dos solutos depende do seu coeficiente de difusão (D) que está mais ou menos relacionado com o inverso do tamanho da molécula (o raio hidrodinâmico) [55, 57]. Portanto, os solutos com elevados coeficientes de difusão podem ser separados dos compostos da amostra com coeficientes de difusão baixos (figura 2.5). Esta é uma técnica flexível, portátil e de baixo custo. Helton *et al.* (2008) [55] desenvolveram imunoenaios em sistemas de diagnóstico salivar capazes de utilizar saliva não tratada, utilizando sistemas de filtragem. Estes autores utilizaram um dispositivo microfluídico descartável com dois filtros integrados, um filtro membranar e o filtro-H reduzindo significativamente a viscosidade da saliva. As células, detritos e glicoproteínas de elevado peso molecular (mucinas) da saliva foram, primeiro, filtradas através dos filtros membranares. O filtro-H separou os compostos de proteínas de baixo peso molecular das partículas maiores por difusão diferencial durante o fluxo laminar.

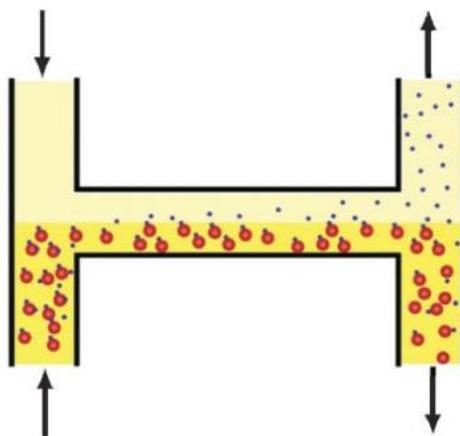


Figura 2.5 Princípio de funcionamento de um filtro-H microfluídico. As partículas de menor tamanho apresentam um maior coeficiente de difusão do que as partículas de maior tamanho e, por conseguinte, movimentam-se mais rapidamente para o outro líquido podendo ser filtradas (adaptado de [58], com autorização de *The Royal Society of Chemistry*).

Os restantes métodos de preparação de amostras de saliva (centrifugação, diluição, congelamento-descongelamento e lise celular) apresentam algumas limitações. O método de centrifugação necessita de equipamento de laboratório e, portanto, dificilmente pode ser utilizado em sistemas POC. A diluição não é aconselhável devido à baixa concentração de analito, neste caso de cortisol, na saliva. O congelamento-descongelamento e a lise celular

podem levar a alterações da molécula de cortisol [54]. O método de filtração membranar e o filtro-H mostram-se como os mais indicados para a aplicação em sistemas microfluídicos.

2.7 Métodos de quantificação de cortisol

O cortisol tem sido analisado recorrendo a vários métodos analíticos, tal como mostra a figura 2.6. As técnicas cromatográficas foram as primeiras a serem utilizadas para a separação e quantificação de cortisol. Entre elas, têm sido relatados vários métodos cromatográficos, tais como, cromatografia líquida (CL), espectrometria de massa (EM), cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CL/EM) e CLAE. A maior parte destes métodos têm sido aplicados em amostras de sangue e de urina. A concentração do cortisol na saliva é mais baixa e, portanto, requer métodos cromatográficos com maior sensibilidade [11, 14]. A CL/EM é a técnica cromatográfica mais utilizada para análise de cortisol salivar apresentando um LD entre 25 – 40 pg/mL. A CLAE com deteção por fluorescência (CLAE-FLU) e com deteção por ultravioleta (CLAE-UV) são também fortes candidatos à quantificação de cortisol salivar, uma vez que oferecem maior sensibilidade, no entanto, necessitam de equipamentos bastantes dispendiosos [11, 59].

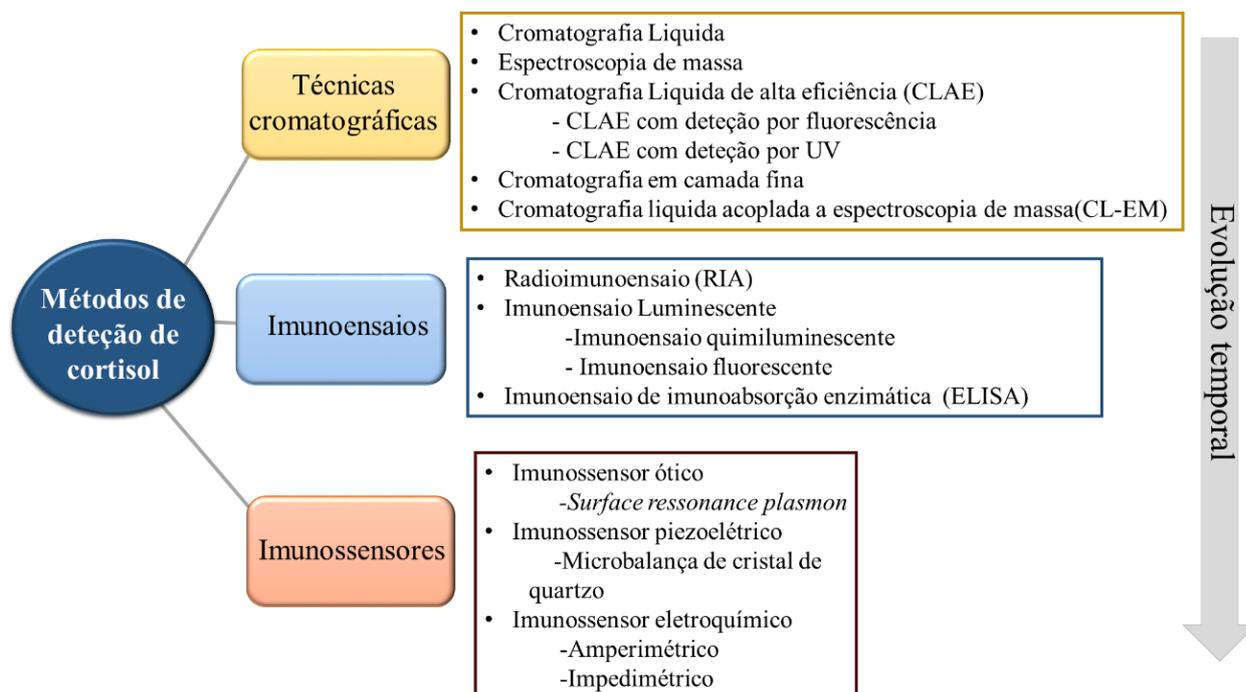


Figura 2.6 Representação esquemática do estado da arte dos métodos de quantificação de cortisol (adaptado de [12]).

Apesar dos métodos cromatográficos apresentarem elevada sensibilidade para a quantificação de cortisol, eles não são práticos para uma utilização frequente em laboratórios de análises clínicas. Isto deve-se à sua complexidade, elevado custo e necessidade de instrumentação dispendiosa. Além disso, no caso da CLAE requer ainda vários processos de pré-tratamento da amostra (tipicamente a extração com solventes). Estes problemas podem ser superados quantificando o cortisol através dos imunoensaios [11].

Os imunoensaios baseiam-se na capacidade de um Ac reconhecer e ligar-se seletivamente a um Ag (também designado de analito). O elevado grau de seletividade e especificidade da interação Ag-Ac faz com que os imunoensaios sejam as técnicas mais elegidas para quantificação de cortisol [63]. Os imunoensaios mais utilizados para a quantificação de cortisol são o RIA, ELISA, imunoensaio de fluorescência e de quimiluminescência. Para o caso da quantificação de cortisol salivar, o LD destes métodos ronda os 192 pg/mL para o imunoensaio de fluorescência, 145 pg/mL para o RIA, 70 pg/mL para o imunoensaio de quimiluminescência e 30 pg/mL para o teste ELISA [43, 52]. Entre estes imunoensaios, o método ELISA é o mais sensível e versátil sendo mesmo a técnica mais amplamente utilizada para a quantificação de cortisol e, por isso, muitas vezes, é utilizado para validar os resultados obtidos a partir de outras técnicas recentemente desenvolvidas [12]. No entanto, apesar de estes métodos apresentarem elevada sensibilidade e especificidade exibem algumas limitações, tais como: necessidade de grandes volumes de amostra e reagentes, longos tempos de espera para a obtenção de resultados, envolvem vários passos de reações e processos de lavagem, elevado custo por análise, pouca ou nenhuma automação e manipulação de radioisótopos perigosos como é o caso do RIA [43].

A tabela 2.1 fornece com mais detalhe o desempenho das várias técnicas cromatográficas e dos imunoensaios utilizados para a quantificação de cortisol no sangue, na urina e na saliva.

Tabela 2.1 Desempenhos analíticos dos diferentes métodos de quantificação de cortisol no sangue (plasma ou soro), na urina e na saliva (adaptado de [13], com autorização de *Elsevier*).

Fonte de amostra	Tipo de método	LD (nmol/L)*	Coefficiente de variação (CV)(%) intra-ensaio	CV (%) inter-ensaio
Plasma/soro	EIA	5,0	5,2	6,8
	FIA	-	2,1	8,8
	RIA (Kit comercial da <i>Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach</i>)	13,8	4,4	4,9
	RIA (Kit comercial da <i>Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA 92713</i>)	-	5,4	7,8-15,2
	RIA (Kit comercial da <i>Nichols Institute, San Pedro, CA 90731</i>)	-	5,2-7,9	6,3-10,9
	CL	10,0	4,4-5,7	5,0-8,5
	CLAE	30,0	--	-
	CL-EM/EM	0,003	6,0	12,0
	CL-EM/EM	0,25	3,5-7,1	4,6-7,7
Saliva	ELISA	0,082	2,8	2,8
	RIA (Kit comercial da <i>Covance Laboratories, Inc., Vienna</i>)	2,8 (2,2-5,8)	3,4	12,8
	RIA (Kit comercial da <i>Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach</i>)	1,4	4,5	5,8
	RIA (Kit comercial da <i>Coat-a-Count, Diagnostic Products, Los Angeles</i>)	1,4	3,9-5,4	6,8-10,1
	RIA (Kit comercial da <i>Coat-a-Count, Diagnostic Products, Los Angeles</i>)	0,4	3,0	12,1-6,1
	RIA (Kit comercial da <i>CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette</i>)	0,8	7,0	-
	RIA (Kit comercial da <i>CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette</i>)	0,8	6,7	11,0
	RIA (Kit comercial da <i>Diagnostic Products, Los Angeles</i>)	-	14,0	15,0
	CL-EM/EM	1,4	7,0	11,0
	CL-EM/EM	0,1	7,2	5,8
Urina	RIA (Kit comercial da <i>SmithKline Bioscience Laboratories, King of Prussia</i>)	-	6,0	11,5

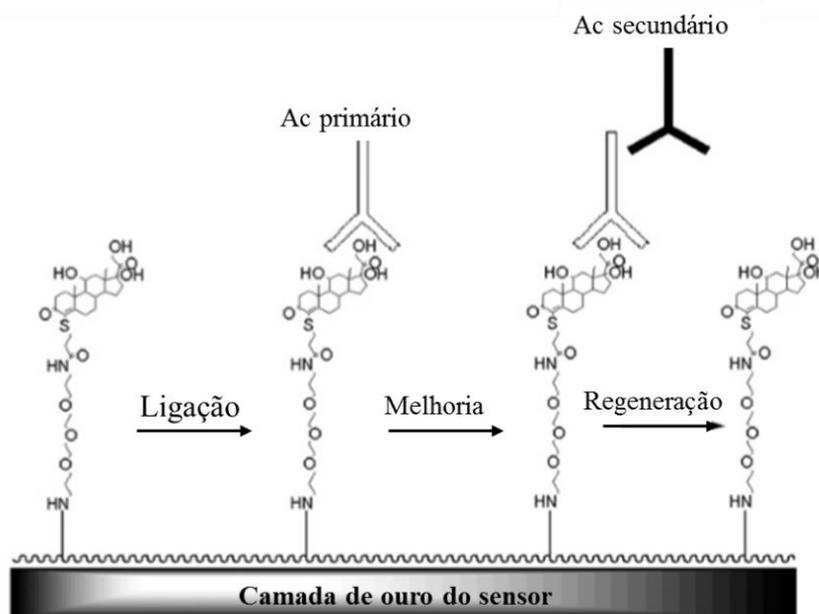
	RIA (Kit comercial da <i>Diagnostic Products, Los Angeles</i>)	13,8	3,5	6,2
	RIA (Kit comercial da <i>CIS Biointernational, Gif-sur-Yvette</i>)	6,9	-	-
	CL-EM/EM	Loq=2,0	3,7-4,3	4,9-4,2
	CL-EM/EM	3,0	3,3-7,6	8,4-9,4
	CL-EM/EM	0,03	<5,8	<6,5
	CLAE	-	-	5,7
	CLAE	15,0	2,1-4,4	-
	CLAE	9,0	0,9	1,5

* A quantidade de urina é expressa em nmol/24h

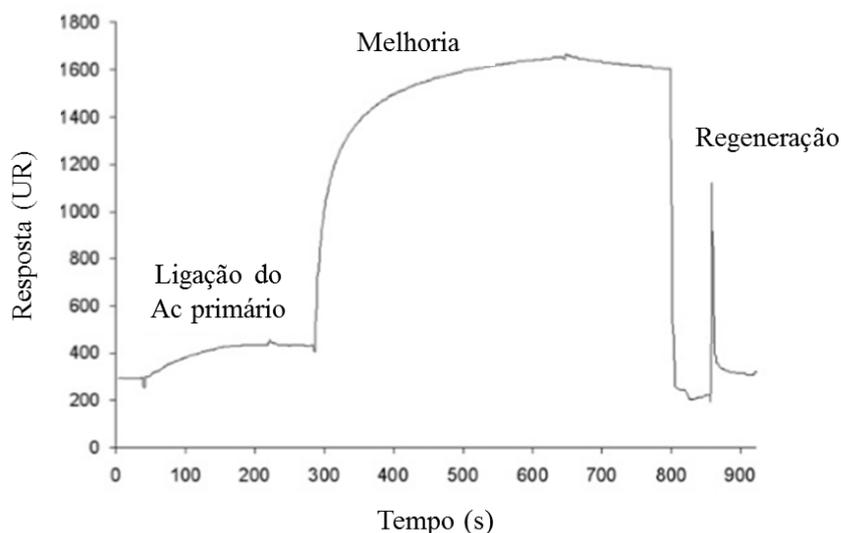
Para superar as limitações descritas têm sido desenvolvidos vários imunossensores [microdispositivos com instrumentação integrada que utilizam metodologias similares aos imunoenaios para as reações (bio)químicas] baseados em técnicas de detecção óticas, piezoelétricas e eletroquímicas com vista à miniaturização dos dispositivos [61]. Algumas destas técnicas, nomeadamente detecção ótica por SPR e piezoelétrica por microbalança de quartzo, permitem quantificação livre de marcação, nos quais a quantidade de cortisol é quantificada apenas por alterações físicas e/ou químicas resultantes da sua captura pela superfície de detecção [11]. Os vários imunossensores desenvolvidos fornecem dispositivos simples, rápidos, económicos, sensíveis, robustos e reprodutíveis [43, 44].

Em 1995 foi desenvolvido por Attili e Suleiman um imunossensor piezoelétrico para quantificação de cortisol [62]. Estes autores imobilizaram Ac anti-cortisol na superfície do elétrodo de ouro da microbalança de cristal de quartzo utilizando as suas propriedades ressonantes (a 10 MHz) para a quantificação de cortisol. As microbalanças de cristal de quartzo são um tipo de dispositivo com detecção acústica que se baseiam na geração e propagação de uma onda acústica através de todo o cristal piezoelétrico de quartzo. A ligação do analito provoca um desvio da frequência de ressonância do cristal, desvio esse que é medido. O imunossensor de microbalança de quartzo desenvolvido foi capaz de detetar concentrações de 3,628 µg/mL com procedimentos simples e com boa seletividade. No entanto, o LD apresentado por esta abordagem não permite a quantificação de cortisol na saliva [11, 62]. Além disso, a resposta deste tipo de imunossensores pode ser fortemente influenciada pela ocorrência de reações cruzadas nos materiais piezoelétricos [63]. Outras técnicas de detecção também livres de marcação foram desenvolvidas por

Steven *et al.* (2008) [41]. Estes autores desenvolveram um imunossensor SPR para quantificação de cortisol salivar com elevada sensibilidade, através de um ensaio competitivo utilizando Ac monoclonais específicos para o cortisol. A técnica SPR é uma técnica ótica que permite um LD muito baixo e uma elevada sensibilidade. Uma descrição sobre esta técnica encontra-se no trabalho publicado por Guo (2012) [64]. Este dispositivo apresentou um LD de 1,0 ng/mL para quantificação de cortisol salivar, suficientemente sensível para a utilização em diagnóstico. Outros autores publicaram trabalhos relatando uma melhoria acentuada no desempenho destes sistemas SPR conseguindo um LD de 49 pg/mL [65]. Esta resolução ultrabaixa baseou-se num imunoensaio competitivo, com a utilização de Ac secundários, contra o Ac anti-cortisol primário, aumentando, assim, a massa ligada sobre a superfície metálica (ouro) do sensor e conseqüentemente aumentando o sinal obtido à saída do sensor (figura 2.7). Apesar destas técnicas serem bastante promissoras, a deteção ótica por SPR tem a desvantagem da sua miniaturização ser complexa, principalmente pelo facto dos componentes óticos utilizados serem dispendiosos, o que torna o dispositivo bastante dispendioso. Por este motivo, têm surgido os imunossensores eletroquímicos que, apesar de alguns não serem livres de marcação, pela própria natureza do método de transdução apresentam as vantagens da facilidade de utilização, facilidade de miniaturização possuindo propriedades analíticas aceitáveis, como sensibilidade, LD e reprodutibilidade.



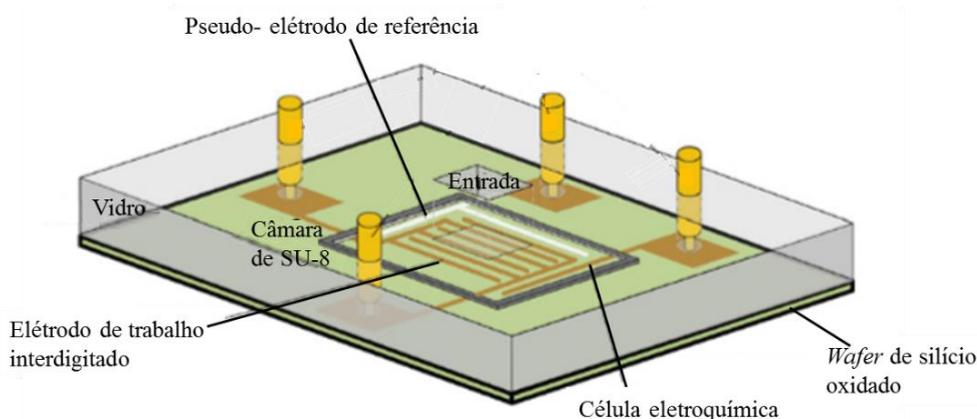
(a)



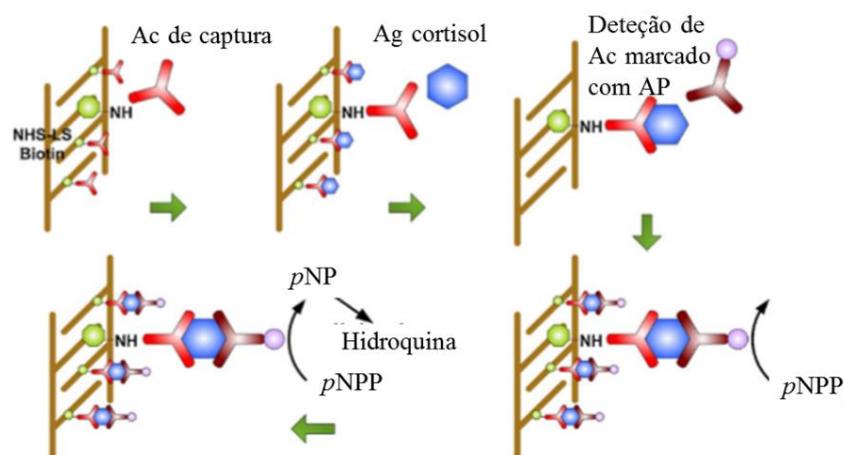
(b)

Figura 2.7 (a) Representação esquemática do biossensor SPR e (b) sensograma da resposta em função da ligação do Ac primário, melhoria do sinal com ligação do Ac secundário e regeneração da superfície (adaptado de [65], com autorização de *Royal Society of Chemistry*).

Sun *et al.* (2008) [49], desenvolveram imunossensores eletroquímicos (com detecção amperimétrica) para a quantificação de cortisol com LD de 275 pg/mL. Neste sensor, os Ac anti-cortisol são imobilizados em microelétrodos de ouro para a captura do cortisol, ao qual se ligarão os Ac de detecção conjugados com a enzima fosfatase alcalina (AP do inglês *alkaline phosphatase*). Esta enzima reage com o pNPP (*p-nitrophenil phosphate*), dando origem ao pNP (*p-nitrophenol*) (figura 2.8). Este composto é detetado através de voltametria cíclica.



(a)



(b)

Figura 2.8 Representação esquemática de: (a) imunossensor eletroquímico e (b) imunoenensaio para a quantificação de cortisol (adaptado de [49], com autorização de Elsevier).

Outro imunossensor eletroquímico, desenvolvido por Arya *et al.* (2010) [66], relaciona a concentração de cortisol com a variação da impedância utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica (EIA do inglês *electrochemical impedance spectroscopy*). Neste imunossensor, foram imobilizados Ac monoclonais específicos para a detecção do cortisol (C-mAb do inglês *monoclonal cortisol antibody*) na superfície dos microelétrodos interdigitados (ID μ E do inglês *interdigitated microelectrode*) através do composto *dithiobis succinimidyl propionate* (DTSP), formando uma monocamada (*self-assembled monolayer*) (figura 2.9). Este dispositivo apresenta uma sensibilidade de 2,855 kohms/M com uma gama de quantificação de cortisol salivar de 0,36 pg/mL até 3,6 ng/mL. Apesar desta abordagem apresentar elevada sensibilidade não cobre toda a gama necessária para detetar os níveis de cortisol salivar.

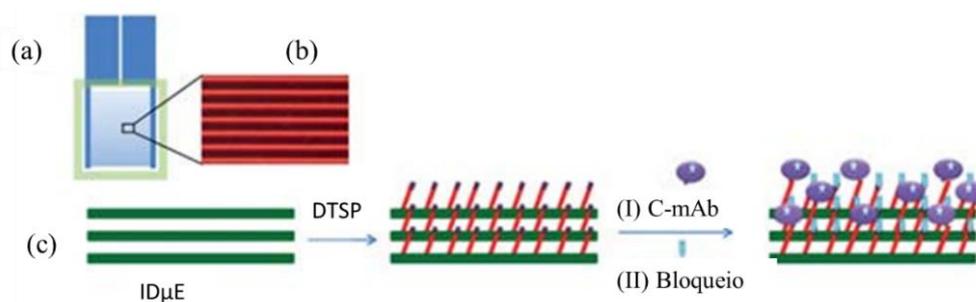


Figura 2.9 Representação esquemática dos (a) microelétrodos interdigitados, (b) imagem ampliada de microscopia ótica e (c) fabrico do bioelétrodo (adaptado de [66], com autorização de Royal Society of Chemistry).

Nos últimos anos, a exploração dos nanomateriais como uma matriz de suporte para a imobilização de Ac demonstrou ser bastante promissora quanto ao aumento da sensibilidade e da seletividade na quantificação de cortisol. Tlili *et al.* (2011) [40], desenvolveram um imunossensor utilizando nanotubos de carbono (SWCNTs – *Single-Walled Carbon Nanotubes*), que se encontram ligados a transdutores quimiorresistivos (figura 2.10). Estes nanotubos são funcionalizados através de um composto análogo ao cortisol (cortisol-3-CMO-NHS éster) ao qual se liga um C-mAb para quantificação de cortisol. A concentração desta hormona relaciona-se com a resistência/condutância dos nanotubos. Este imunossensor apresenta um LD bastante baixo (1 pg/mL) com uma gama linear de 1 pg/mL a 10 ng/mL apresentando muito boa seletividade e sensibilidade ($13,97 \text{ (ng/mL)}^{-1}$) [40]. Contudo, o fabrico deste imunossensor é muito complexo utilizando processos fotolitográficos e de *lift-off* com necessidade de instalações dispendiosas, como salas limpas. Para além disso, o alinhamento e deposição dos nanotubos bem como a subsequente imobilização de moléculas na sua superfície apresentam-se como tarefas complexas que exigem diversos equipamentos.

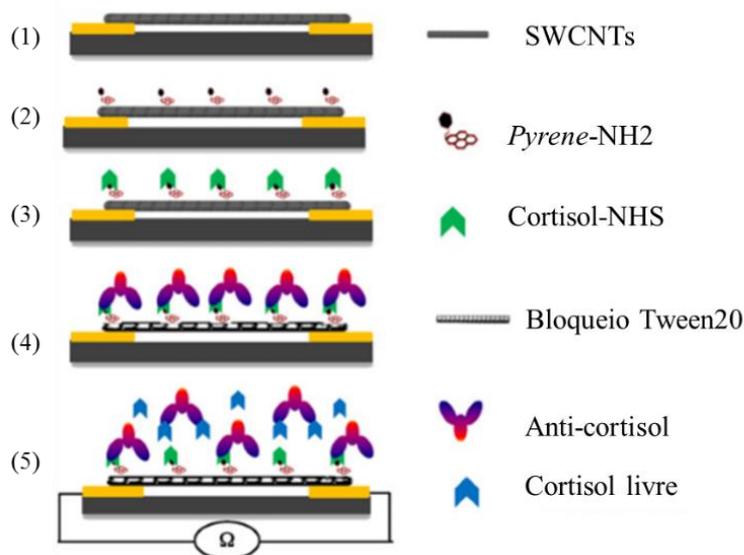


Figura 2.10 Representação esquemática do fabrico do imunossensor quimiorresistivo. (1) Alinhamento dos SWCNTs; (2) funcionalização não covalente com *Pyrene*; (3) ligação covalente de cortisol-NHS; (4) ligação do Ac anti-cortisol ao cortisol e bloqueio com Tween20; (5) deslocação do Ac anti-cortisol da superfície para ligação ao cortisol livre na amostra (adaptado de [40], com autorização de *Elsevier*).

Yamaguchi *et al.* (2013) [42], desenvolveram um imunossensor eletroquímico que possui um mecanismo de controlo de fluido com fluxo lateral e vertical que permite a

quantificação de cortisol na saliva com concentrações entre 0,1 e 10 ng/mL. (figura 2.11). A reação do imunossensor ocorre no componente com fluxo vertical enquanto o componente com fluxo lateral serve para remover proteínas e outras hormonas. A corrente detetada pelo dispositivo resulta de uma reação competitiva entre o cortisol da amostra e o cortisol marcado com glicose oxidase (GOD) pelo Ac anti-cortisol imobilizado, sendo que o seu valor está inversamente relacionado com a concentração de cortisol na amostra.

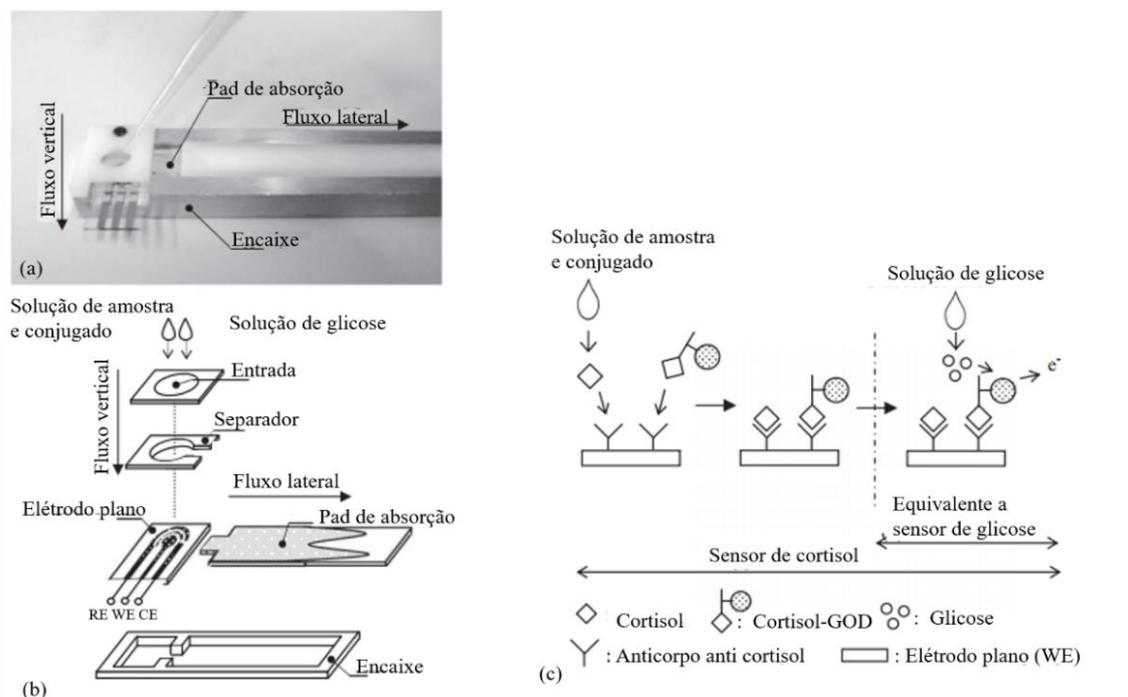


Figura 2.11 Representação esquemática do imunossensor de fluxo lateral e vertical: (a) vista lateral do imunossensor, (b) representação esquemática do imunossensor e (c) representação esquemática da reação eletroquímica (adaptado de [42], com autorização de *Elsevier*).

Apesar dos imunossensores eletroquímicos apresentarem boas características para serem utilizados na quantificação de cortisol, estes podem ser afetados por algumas limitações, nomeadamente a sua estabilidade e confiabilidade a longo prazo que pode ser comprometida com a incorporação de eletrólitos líquidos, o seu tempo de vida e as questões relacionadas com o número de ciclos, bem como com o envenenamento dos eléctrodos frequentemente utilizados de Ag/AgCl [67, 68]. Para além disso, a desnaturação dos Ac devido à alteração da temperatura e à alteração de fatores químicos como o pH e concentrações iónicas, a acumulação dos produtos da reação e as condições da superfície do eléctrodo, podem impor condições rigorosas de armazenamento especialmente em aplicações

POC (por exemplo, já foram propostas abordagens de encapsulamento dos Ac com vista ao melhoramento da estabilidade mas ainda não foram colocadas em prática) [11]. Podem ainda ocorrer reações não-específicas entre as impurezas eletroativas da amostra na superfície do eletrodo que podem, também, limitar a sensibilidade destes sensores. Para além disso, a miniaturização do sistema leva a uma diminuição da corrente gerada, implicando uma melhoria na eletrónica de deteção para que possa ser medida com precisão e com ausência de ruído. Por fim, é necessário fabricar eletrodos de referência miniaturizados estáveis, o que atualmente, ainda não é estado da arte [67].

Apesar de existirem diversos dispositivos de quantificação de cortisol salivar em investigação, tal como foi referido, eles apresentam ainda algumas limitações, principalmente quando se quer um dispositivo de fabrico fácil, autónomo, com elevada sensibilidade e baixo LD, com capacidade de medições em tempo real e acima de tudo que permitam análises com baixo custo. Por este motivo, estão ainda a ser feitos esforços no sentido de superar estas limitações e de se desenvolver um dispositivo comercial miniaturizado para a quantificação precisa e extremamente sensível do cortisol salivar. É neste sentido que se apresenta o trabalho descrito nesta tese, com vista ao desenvolvimento de um imunossensor microfluídico com elevada sensibilidade, baixo LD, baixo custo por teste, boa estabilidade e de fácil fabrico. Assim, a escolha da técnica de quantificação recai na deteção ótica, uma vez que permite cumprir estes requisitos. Do nosso conhecimento, ainda não foi desenvolvido nenhum dispositivo que integre o imunoensaio num *die* microfluídico de PDMS e a técnica de deteção ótica num *chip* CMOS.

2.8 Conclusão

Atualmente, o cortisol apresenta-se como um biomarcador de grande interesse clínico uma vez que os seus níveis alterados podem estar associados a muitos estados patológicos, principalmente como indicador de *stress*. A facilidade de recolha da saliva faz dela o fluido biológico com mais interesse para quantificação de cortisol, no entanto exige métodos mais sensíveis devido à baixa concentração de cortisol presente neste fluido biológico. Desta forma, torna-se necessário desenvolver dispositivos de quantificação de cortisol cada vez mais sensíveis e com possibilidade de monitorização em contínuo. A seleção da saliva como

fluido biológico, tal como foi introduzida neste capítulo, apresenta-se como um método de eleição pelas inúmeras vantagens referidas na secção 2.7. Comparativamente com o sangue, este fluido apresenta a principal vantagem de facilidade de recolha, sendo possível encontrar comercialmente diversos kits desenvolvidos especificamente para a auto-recolha da saliva de forma facilitada. As limitações do tratamento da saliva em dispositivos microfluídicos podem ser ultrapassadas utilizando diretamente as amostras fornecidas por esses kits após centrifugação ou através de filtros integrados no dispositivo microfluídico. Por exemplo, a utilização do *Salivette* de cortisol permite obter amostras limpas e fluídicas apenas com um passo de centrifugação de 2 min para posterior análise.

Os recentes desenvolvimentos em imunossensores para a quantificação de cortisol criaram oportunidades excitantes para a quantificação de cortisol salivar, com análises mais rápidas, precisas e com resolução suficiente para igualar ou melhorar os ensaios desenvolvidos em laboratórios. Apesar de existirem diversos métodos de quantificação de cortisol salivar, os imunossensores totalmente autónomos para detetar e quantificar cortisol salivar ainda se encontram muito escassos. Assim, a presente tese teve como objetivo desenvolver um imunossensor microfluídico que integre técnicas de deteção ótica para uma deteção e quantificação rápida e extremamente sensível de cortisol em amostras de saliva, com um baixo LD, um baixo custo por teste e com boa estabilidade. As técnicas óticas possibilitam estes requisitos.

O trabalho desenvolvido nesta tese teve em conta os baixos valores de concentração do cortisol presentes na saliva, no entanto não foram utilizadas amostras reais de saliva e como consequência, não foi exigido este passo de tratamento. Em desenvolvimentos futuros, serão pontos críticos a considerar, sendo que o *Salivette* de cortisol poderá ser a solução mais eficiente para este tipo de análise. Para o conceito POC ser totalmente integrado, os sistemas com filtros de membrana e filtros H apresentam-se como as melhores soluções, uma vez que evitam a necessidade do passo de centrifugação.

Referências

- [1] A. M. Sesay, L. Micheli, P. Tervo, G. Palleschi, and V. Virtanen, "Development of a competitive immunoassay for the determination of cortisol in human saliva," *Analytical biochemistry*, vol. 434, pp. 308-314, 2013.
- [2] C. M. McCormick, I. Z. Mathews, C. Thomas, and P. Waters, "Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models," *Brain and cognition*, vol. 72, pp. 73-85, 2010.
- [3] N. Takai, M. Yamaguchi, T. Aragaki, K. Eto, K. Uchihashi, and Y. Nishikawa, "Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults," *Archives of oral biology*, vol. 49, pp. 963-968, 2004.
- [4] M. A. C. Stephens and G. Wand, "Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence," *Alcohol Research-Current Reviews*, vol. 34, p. 468, 2012.
- [5] J. McDowell, "Encyclopedia of Human Body Systems", vol. 1: *ABC-CLIO*, 2010.
- [6] M. Randall, "The physiology of stress: Cortisol and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis," *Dartmouth Undergraduate Journal of Science*, vol. 13, pp. 22-24, 2010.
- [7] A. Levine, O. Zagoory-Sharon, R. Feldman, J. G. Lewis, and A. Weller, "Measuring cortisol in human psychobiological studies," *Physiology & behavior*, vol. 90, pp. 43-53, 2007.
- [8] C. Tsigos and G. P. Chrousos, "Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress," *Journal of psychosomatic research*, vol. 53, pp. 865-871, 2002.
- [9] F. Lederbogen, P. Kirsch, L. Haddad, F. Streit, H. Tost, P. Schuch, *et al.*, "City living and urban upbringing affect neural social stress processing in humans," *Nature*, vol. 474, pp. 498-501, 2011.
- [10] M. Gröschl, "Current status of salivary hormone analysis," *Clinical Chemistry*, vol. 54, pp. 1759-1769, 2008.
- [11] A. Kaushik, A. Vasudev, S. K. Arya, S. K. Pasha, and S. Bhansali, "Recent advances in cortisol sensing technologies for point-of-care application," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 53, pp. 499-512, 2014.
- [12] D. S.-Q. Koh and G. C.-H. Koh, "The use of salivary biomarkers in occupational and environmental medicine," *Occupational and environmental medicine*, vol. 64, pp. 202-210, 2007.

- [13] R. Gatti, G. Antonelli, M. Prearo, P. Spinella, E. Cappellin, and F. Elio, "Cortisol assays and diagnostic laboratory procedures in human biological fluids," *Clinical biochemistry*, vol. 42, pp. 1205-1217, 2009.
- [14] U. Turpeinen and E. Hämäläinen, "Determination of cortisol in serum, saliva and urine," *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 27, pp. 795-801, 2013.
- [15] P. J. Lucassen, J. Pruessner, N. Sousa, O. F. Almeida, A. M. Van Dam, G. Rajkowska, *et al.*, "Neuropathology of stress," *Acta neuropathologica*, vol. 127, pp. 109-135, 2014.
- [16] D. H. Hellhammer, S. Wüst, and B. M. Kudielka, "Salivary cortisol as a biomarker in stress research," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 34, pp. 163-171, 2009.
- [17] E. Hill, E. Zack, C. Battaglini, M. Viru, A. Viru, and A. C. Hackney, "Exercise and circulating cortisol levels: the intensity threshold effect," *Journal of endocrinological investigation*, vol. 31, pp. 587-591, 2008.
- [18] S. Chung, G. H. Son, and K. Kim, "Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, vol. 1812, pp. 581-591, 2011.
- [19] W. A. Hofstra and A. W. de Weerd, "How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature," *Epilepsy & Behavior*, vol. 13, pp. 438-444, 2008.
- [20] S. Chan and M. Debono, "Review: Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy," *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, vol. 1, pp. 129-138, 2010.
- [21] H. Raff and H. Trivedi, "Circadian rhythm of salivary cortisol, plasma cortisol, and plasma ACTH in end-stage renal disease," *Endocrine Connections*, vol. 2, pp. 23-31, 2013.
- [22] F. Levi, C. Canon, Y. Touitou, J. Sulon, M. Mechkouri, E. D. Ponsart, *et al.*, "Circadian rhythms in circulating T lymphocyte subtypes and plasma testosterone, total and free cortisol in five healthy men," *Clinical and experimental immunology*, vol. 71, p. 329, 1988.
- [23] U. M. Nater, L. S. Youngblood, J. F. Jones, E. R. Unger, A. H. Miller, W. C. Reeves *et al.*, "Alterations in diurnal salivary cortisol rhythm in a population-based sample of cases with chronic fatigue syndrome," *Psychosomatic medicine*, vol. 70, pp. 298-305, 2008.

- [24] N. Nader, G. P. Chrousos, and T. Kino, "Interactions of the circadian CLOCK system and the HPA axis," *Trends in Endocrinology & Metabolism*, vol. 21, pp. 277-286, 2010.
- [25] E. O. Johnson, T. C. Kamilaris, G. P. Chrousos, and P. W. Gold, "Mechanisms of stress: a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis," *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, vol. 16, pp. 115-130, 1992.
- [26] M. Bose, B. Oliván, and B. Laferrère, "Stress and obesity: the role of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in metabolic disease," *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, vol. 16, p. 340, 2009.
- [27] C. Gragnoli, "Depression and type 2 diabetes: cortisol pathway implication and investigational needs," *Journal of cellular physiology*, vol. 227, pp. 2318-2322, 2012.
- [28] G. Tirabassi, M. Boscaro, and G. Arnaldi, "Harmful effects of functional hypercortisolism: a working hypothesis," *Endocrine*, vol. 46, pp. 370-386, 2014.
- [29] L. K. Nieman, B. M. Biller, J. W. Findling, J. Newell-Price, M. O. Savage, P. M. Stewart, *et al.*, "The diagnosis of Cushing's syndrome: an endocrine society clinical practice guideline," *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 93, pp. 1526-1540, 2008.
- [30] K. Løvås, T. Thorsen, and E. Husebye, "Saliva cortisol measurement: simple and reliable assessment of the glucocorticoid replacement therapy in Addison's disease," *Journal of endocrinological investigation*, vol. 29, pp. 727-731, 2006.
- [31] A. Parker, S. Wessely, and A. Cleare, "The neuroendocrinology of chronic fatigue syndrome and fibromyalgia," *Psychological medicine*, vol. 31, pp. 1331-1345, 2001.
- [32] E. Fries, J. Hesse, J. Hellhammer, and D. H. Hellhammer, "A new view on hypocortisolism," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 30, pp. 1010-1016, 2005.
- [33] V. Thongboonkerd, *Proteomics of human body fluids: principles, methods, and applications*: Springer Science & Business Media, 2008.
- [34] J.-L. Coolens, H. Van Baelen, and W. Heyns, "Clinical use of unbound plasma cortisol as calculated from total cortisol and corticosteroid-binding globulin," *Journal of steroid biochemistry*, vol. 26, pp. 197-202, 1987.
- [35] C. Jung, S. Greco, H. H. Nguyen, J. T. Ho, J. G. Lewis, D. J. Torpy, *et al.*, "Plasma, salivary and urinary cortisol levels following physiological and stress doses of hydrocortisone in normal volunteers," *BMC endocrine disorders*, vol. 14, p. 1, 2014.
- [36] A. Thomson, M. Devers, A. Wallace, D. Grant, K. Campbell, M. Freel, *et al.*, "Variability in hydrocortisone plasma and saliva pharmacokinetics following

- intravenous and oral administration to patients with adrenal insufficiency," *Clinical endocrinology*, vol. 66, pp. 789-796, 2007.
- [37] L. R. Bigler, C. F. Streckfus, and W. P. Dubinsky, "Salivary biomarkers for the detection of malignant tumors that are remote from the oral cavity," *Clinics in laboratory medicine*, vol. 29, pp. 71-85, 2009.
- [38] D. T. Wong and A. Segal, "Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better," *European Journal of Dental Education*, vol. 12, pp. 22-29, 2008.
- [39] T. Pfaffe, J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, and C. Punyadeera, "Diagnostic potential of saliva: current state and future applications," *Clinical chemistry*, vol. 57, pp. 675-687, 2011.
- [40] C. Tlili, N. V. Myung, V. Shetty, and A. Mulchandani, "Label-free, chemiresistor immunosensor for stress biomarker cortisol in saliva," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 26, pp. 4382-4386, 2011.
- [41] R. C. Stevens, S. D. Soelberg, S. Near, and C. E. Furlong, "Detection of cortisol in saliva with a flow-filtered, portable surface plasmon resonance biosensor system," *Analytical chemistry*, vol. 80, pp. 6747-6751, 2008.
- [42] M. Yamaguchi, Y. Matsuda, S. Sasaki, M. Sasaki, Y. Kadoma, Y. Imai, *et al.*, "Immunosensor with fluid control mechanism for salivary cortisol analysis," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 41, pp. 186-191, 2013.
- [43] Y.-H. Lee and D. T. Wong, "Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases," *American journal of dentistry*, vol. 22, p. 241, 2009.
- [44] P. D. V. de Almeida, A. Gregio, M. Machado, A. De Lima, and L. R. Azevedo, "Saliva composition and functions: a comprehensive review," *J Contemp Dent Pract*, vol. 9, pp. 72-80, 2008.
- [45] E. Papacosta and G. P. Nassis, "Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science," *Journal of Science and Medicine in Sport*, vol. 14, pp. 424-434, 2011.
- [46] I. Messana, R. Inzitari, C. Fanali, T. Cabras, and M. Castagnola, "Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us?," *Journal of separation science*, vol. 31, pp. 1948-1963, 2008.
- [47] M. Greabu, M. Battino, M. Mohora, A. Totan, A. Didilescu, T. Spinu, *et al.*, "Saliva-a diagnostic window to the body, both in health and in disease," *J Med Life*, vol. 2, pp. 124-132, 2009.

- [48] S. P. Humphrey and R. T. Williamson, "A review of saliva: normal composition, flow, and function," *The Journal of prosthetic dentistry*, vol. 85, pp. 162-169, 2001.
- [49] K. Sun, N. Ramgir, and S. Bhansali, "An immunoelectrochemical sensor for salivary cortisol measurement," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 133, pp. 533-537, 2008.
- [50] C.-Y. Yang, E. Brooks, Y. Li, P. Denny, C.-M. Ho, F. Qi, *et al.*, "Detection of picomolar levels of interleukin-8 in human saliva by SPR," *Lab on a Chip*, vol. 5, pp. 1017-1023, 2005.
- [51] Salivette® Cortisol. (20/04/2016). Available: <https://www.sarstedt.com/en/products/diagnostic/salivasputum/product/51.1534.500/>
- [52] E.-M. Poll, I. Kreitschmann-Andermahr, Y. Langejuergen, S. Stanzel, J. M. Gilsbach, A. Gressner, *et al.*, "Saliva collection method affects predictability of serum cortisol," *Clinica Chimica Acta*, vol. 382, pp. 15-19, 2007.
- [53] Intercept® Oral Fluid drug Test. (14/04/2016). Available: <http://www.orasure.com/products-substance/products-substance-abuse-intercept.asp>
- [54] P. Wägli, "Integrated Microfluidic Liquid-Liquid Extraction for Cocaine Detection in Human Saliva," École Polytechnique Fédéral de Lausanne, 2012.
- [55] K. L. Helton, K. E. Nelson, E. Fu, and P. Yager, "Conditioning saliva for use in a microfluidic biosensor," *Lab on a Chip*, vol. 8, pp. 1847-1851, 2008.
- [56] K. R. Atkinson, K. R. Lo, S. R. Payne, J. S. Mitchell, and J. R. Ingram, "Rapid saliva processing techniques for near real-time analysis of salivary steroids and protein," *Journal of clinical laboratory analysis*, vol. 22, pp. 395-402, 2008.
- [57] E. L. Cussler, *Diffusion: mass transfer in fluid systems*: Cambridge university press, 2009.
- [58] D. N. Breslauer, P. J. Lee, and L. P. Lee, "Microfluidics-based systems biology," *Molecular Biosystems*, vol. 2, pp. 97-112, 2006.
- [59] H. Kataoka, E. Matsuura, and K. Mitani, "Determination of cortisol in human saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry," *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 44, pp. 160-165, 2007.
- [60] C.-C. Lin, J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, "Microfluidic immunoassays," *Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 15, pp. 253-274, 2010.

- [61] P. B. Lippa, L. J. Sokoll, and D. W. Chan, "Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry," *Clinica Chimica Acta*, vol. 314, pp. 1-26, 2001.
- [62] B. Attili and A. Suleiman, "A piezoelectric immunosensor for the detection of cortisol," *Polymer—Plastics Technology and Engineering*, vol. 28, pp. 2149-2159, 1995.
- [63] K. N. Han, C. A. Li, and G. H. Seong, "Microfluidic chips for immunoassays," *Annual review of analytical chemistry*, vol. 6, pp. 119-141, 2013.
- [64] X. Guo, "Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review," *Journal of biophotonics*, vol. 5, pp. 483-501, 2012.
- [65] J. S. Mitchell, T. E. Lowe, and J. R. Ingram, "Rapid ultrasensitive measurement of salivary cortisol using nano-linker chemistry coupled with surface plasmon resonance detection," *Analyst*, vol. 134, pp. 380-386, 2009.
- [66] S. K. Arya, G. Chornokur, M. Venugopal, and S. Bhansali, "Antibody functionalized interdigitated μ -electrode (ID μ E) based impedimetric cortisol biosensor," *Analyst*, vol. 135, pp. 1941-1946, 2010.
- [67] T. Lindblom, "Qualitative Comparison of Optical and Electrochemical Sensors for Measuring Dissolved Oxygen in Bioreactors," 2009.
- [68] D. W. Kimmel, G. LeBlanc, M. E. Meschievitz, and D. E. Cliffel, "Electrochemical sensors and biosensors," *Analytical Chemistry*, vol. 84, pp. 685-707, 2011.

3 Imunossensores microfluídicos

Neste capítulo aborda-se a importância da combinação das tecnologias microfluídicas com os imunoenaios para o desenvolvimento de plataformas de diagnóstico rápido, sensíveis e baratos. Apresentam-se ainda os princípios de funcionamento dos imunossensores bem como os materiais utilizados para o fabrico de dispositivos microfluídicos. Por fim descrevem-se as técnicas de deteção óticas frequentemente utilizadas em imunossensores microfluídicos.

3.1 Imunossensor

Um imunossensor é um caso específico de um biossensor³, i.e., quando o elemento biológico sensível, que se encontra imobilizado ou integrado com o transdutor, é um Ac, um fragmento de um Ac, um Ag ou um aptamero [1, 2]. O princípio de funcionamento dos imunossensores baseia-se no biorreconhecimento molecular específico de um Ag presente na amostra (analito) por um Ac, formando um complexo estável. Este biorreconhecimento produz sinais analíticos dinamicamente variáveis em função das concentrações do analito [3].

³ Os biossensores são dispositivos analíticos que incluem um elemento biológico sensível imobilizado ou integrado com um transdutor para quantificação de moléculas de interesse. O elemento biológico é uma camada de biomoléculas com função de biorreconhecimento e podem incluir enzimas, proteínas, ADN de cadeia simples ou células vivas.

Assim, a constituição de um imunossensor inclui o elemento biológico (Ac, Ag ou aptamero), o transdutor físico-químico responsável por converter a interação físico-química entre o elemento biológico e o analito num sinal mensurável, e a eletrônica responsável pela instrumentação do sinal de saída do transdutor (figura 3.1) [1, 3, 4]. Os recentes avanços em áreas como a microeletrônica, a eletroquímica, a ótica, e as micro e nanotecnologias têm contribuído para o desenvolvimento de vários elementos transdutores com elevada sensibilidade, resultando em imunossensores com aplicações para uma ampla variedade de analitos, como por exemplo, hormonas, enzimas, vírus, Ag tumorais, Ag bacterianos, entre muitos outros [2, 5].

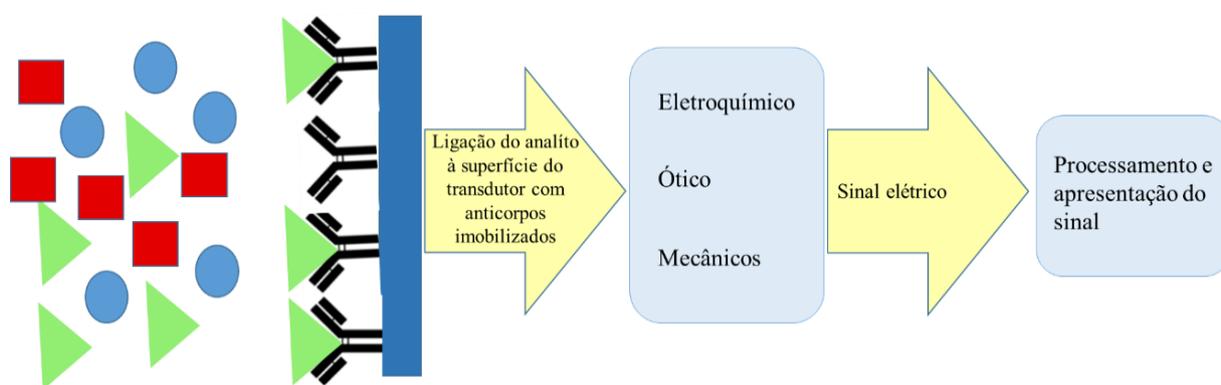


Figura 3.1 Representação esquemática do funcionamento de um imunossensor (adaptado de [4]).

A maioria dos imunossensores desenvolvidos são baseados nas tecnologias dos Ac, no entanto, recentemente, tem sido reportada a utilização de aptameros como alternativa aos Ac. Um aptamero é um oligonucleótido de cadeia simples de ácido desoxirribonucleico (ADN) ou ácido ribonucleico (ARN) com a capacidade de se ligar especificamente a um determinado analito [6]. As principais vantagens da utilização de aptameros residem na sua produção sistemática *in vitro*, na elevada estabilidade e especificidade, uma vez que a sequência de oligonucleótidos pode ser produzida especificamente contra um determinado alvo. Estes alvos podem ser pequenas moléculas, toxinas, péptidos, proteínas, partículas virais e bactérias [2, 6, 7]. Na detecção desses aptameros têm sido empregues várias técnicas, nomeadamente, eletroquimioluminescência e FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), técnicas estas que requerem marcações complexas dos aptameros. Outras

abordagens utilizadas baseiam-se em aptassensores livres de marcação, os quais oferecem métodos de processamento mais simples com elevada sensibilidade e rápida resposta. Apesar disso, a maioria destes métodos apresentam elevado ruído devido à ligação não-específica [6].

Os aptameros são artificialmente selecionados e amplificados, por um processo designado de SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*), a partir de uma mistura de sequências de ácidos nucleicos aleatórios, utilizando vários ciclos para se obter o aptamero ótimo. Este processo apresenta algumas limitações que podem influenciar negativamente a afinidade de ligação dos aptameros, por exemplo, a sua limitada diversidade molecular e a possível perda da sua elevada afinidade devido aos vários ciclos do processo de amplificação PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) [8]. As moléculas de ADN ou ARN utilizadas no processo SELEX apenas compreendem quatro nucleótidos naturais, enquanto que os Ac compreendem até vinte aminoácidos. Assim, a diversidade de oligonucleótidos que podem ser aplicados é limitada. Outro problema que pode afetar a utilização dos aptameros reside no seu tamanho pequeno, que conseqüentemente, pode levar a que eles sejam facilmente degradados por nucleases, resultando num tempo de vida reduzido. As nucleases estão presentes na maior parte dos fluidos biológicos e, por isso, devem ser tidas precauções na utilização de aptameros [7-9].

Apesar de este novo mecanismo de deteção apresentar algum potencial para ser utilizado em imunossensores e até para rivalizar com a tecnologia dos Ac, estas últimas, atualmente, ainda são as preferidas. Esta preferência deve-se aos desafios e às limitações descritas, as quais necessitam de ser ultrapassadas para a ampla utilização dos aptameros. Mais ainda, quando se pretende um imunossensor microfluídico POC com vista a poder ser um dispositivo comercial, a tecnologia dos Ac está muito bem estabelecida e encontram-se, comercialmente disponíveis, numerosos imunoreagentes para uma ampla gama de analitos. Para além disso, os Ac têm uma afinidade de ligação superior aos aptameros, sendo necessário maior quantidade de aptameros que de Ac para fazer o mesmo trabalho. Assim, nesta tese será abordado apenas os imunossensores baseados em Ac.

3.1.1 Estrutura e função dos Ac

Os Ac ou imunoglobulinas (Ig) são proteínas produzidas nos animais e no ser humano e são muito importantes na resposta imunológica à infecção por microrganismos patogênicos. Os Ac reconhecem porções dos constituintes destes microrganismos, assim como de outras substâncias estranhas, designados de Ag. A porção do Ag à qual se ligam os Ac é designada de epítopo (zona de ligação específica reconhecida pelo Ac). Os Ag podem conter apenas um ou vários epítopos (que podem ser diferentes entre si ou repetições). A especificidade da interação Ac-Ag resulta da estrutura única reconhecida pelo Ac para o Ag correspondente. Normalmente, para métodos de diagnóstico são escolhidos os Ac com elevada afinidade para o analito de interesse [4, 5].

Os Ac são proteínas de estrutura simétrica, com peso molecular de cerca de 150 kDa, sendo composta por duas cadeias pesadas (50 kDa) e duas cadeias leves (25 kDa), que estão ligadas através de pontes dissulfeto (S-S) dando aos Ac uma configuração tipo Y, como se observa na figura 3.2. Estas cadeias são constituídas por regiões variáveis (V) e constantes (C) sendo que cada cadeia leve é formada por um domínio constante (C_L) e um domínio variável (V_L) enquanto as cadeias pesadas são constituídas por porções constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) e um domínio variável (V_H) [4, 10, 11]. A região Fv é composta pela justaposição dos domínios variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve, formando o local de ligação ao Ag. Nesta região (Fv) existem três segmentos hipervariáveis, designados por *complementary-determining regions* (CDR), que conferem a especificidade de ligação do Ac ao material estranho (Ag) que estimulou a sua síntese. A região Fab (fração de ligação ao Ag), constituída pela região Fv e pelos domínios C, corresponde ao fragmento do Ac para ligação ao Ag. O segmento singular na outra extremidade da forma em Y é conhecido como região Fc (fração constante) que não se liga ao Ag mas tem a capacidade de interagir com outras moléculas (por exemplo recetores) ou células efectoras do sistema imunitário [11, 12]. Nos mamíferos existem cinco classes distintas de Ac, que diferem na sequência dos aminoácidos das suas cadeias pesadas, conhecidas como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, sendo a IgG a classe a mais abundante (70%) e a mais utilizada em técnicas imunanalíticas. Ac da mesma classe denominam-se isótopos [4, 5, 11, 12].

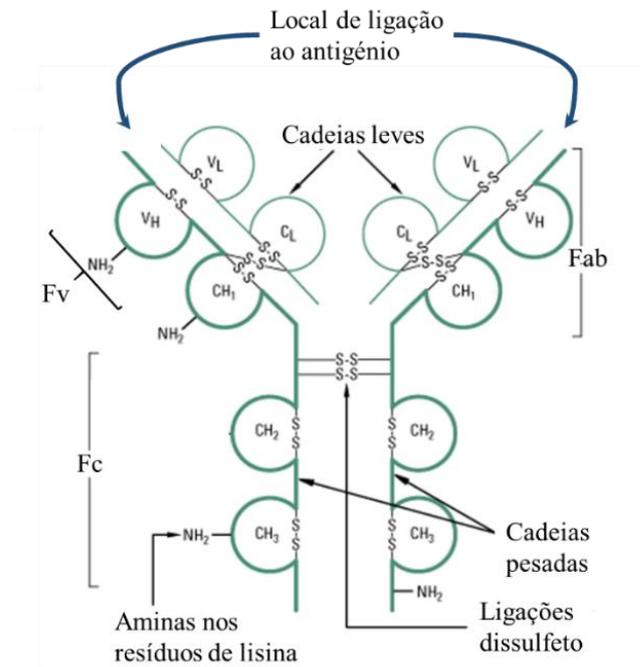


Figura 3.2 Representação esquemática da estrutura de um Ac (adaptado de [12]).

3.1.2 Imunoensaios

Os imunoensaios são tecnologias analíticas sensíveis e específicas que utilizam as propriedades únicas dos Ac no desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico clínico [3, 13]. Imunoensaio é a designação atribuída aos métodos de análise quantitativos ou qualitativos que se baseiam na reação extremamente específica entre uma molécula de interesse (designada de um modo geral por Ag) e Ac específicos para esse Ag. Neste caso específico, o analito é o Ag que pode ser uma proteína, uma hormona, uma célula ou uma pequena biomolécula (hapteno) cujos níveis, estado ou atividade variam em função ou estadio da doença, podendo fornecer informações importantes de diagnóstico e prognóstico [4, 5, 14]. A quantificação dessa reação Ac-Ag pode ser efetuada através de avaliação visual ou utilizando uma variedade de instrumentação. A escolha do formato do imunoensaio, da marcação (processo bioquímico que permite a deteção e localização de um Ag através da utilização de marcadores fluorescentes, enzimáticos, luminescentes, entre outros) e do mecanismo de deteção influenciam as características do ensaio no que diz respeito ao LD, precisão e gama analítica [15, 16]. Um imunoensaio pode ser utilizado para

detetar quer os Ac quer os Ag, de acordo com a necessidade experimental. Normalmente, ele é classificado em formato não-competitivo ou formato competitivo [4, 14, 17].

Num formato não-competitivo, o analito da amostra é capturado por uma quantidade em excesso de Ac de captura (imobilizado previamente numa superfície sólida) responsável por separar o analito (que é o Ag) da restante amostra. De seguida, o analito capturado é medido através da adição de Ac de deteção em excesso, que se ligarão ao complexo inicialmente formado a partir do analito-Ac de captura, como ilustrado na figura 3.3 [14, 17]. A utilização em excesso de Ac de deteção é feita para garantir que todo o analito reage e, consequentemente, a sua quantificação não é influenciada negativamente pela falta de Ac. Esta estrutura representa o analito ensanduichado entre os dois Ac, sendo que o Ac de deteção é frequentemente conjugado com um marcador enzimático ou eletroativo que produz um sinal proporcional à quantidade de analito ligado. Num formato não-competitivo ideal, seria de prever uma ausência de sinal quando nenhum analito estivesse presente na amostra. No entanto, na prática, isto não acontece, devido às interações não-específicas entre o Ac e os componentes do imunoensaio, especialmente adsorção aos materiais dos transdutores, que podem originar sinal de saída mesmo na ausência de analito. Assim, é sempre desejável a utilização de soluções de bloqueio para reduzir este efeito. Apesar de este tipo de formato apresentar maior sensibilidade e especificidade do que o competitivo, só pode ser utilizado quando o analito apresenta mais do que um epítopo, de forma a poder ser reconhecido por dois Ac ao mesmo tempo (pelo Ac de captura e pelo Ac de deteção). Para além disso, o formato não-competitivo não pode ser utilizado para determinação de hapteno (analito de baixo peso molecular) dado que o pequeno tamanho da molécula não é suficiente para interagir com mais do que um Ac [5]. Este tipo de formato é suscetível de sofrer do efeito de “hook”, isto é, os níveis medidos apresentam um sinal de absorvência significativamente mais baixo do que os níveis reais presentes na amostra [4]. Assim a incompatibilidade deste formato para moléculas de baixo peso molecular, como o cortisol, invalida a sua utilização, uma vez que necessitam de ser reconhecidos por dois Ac em simultâneo.

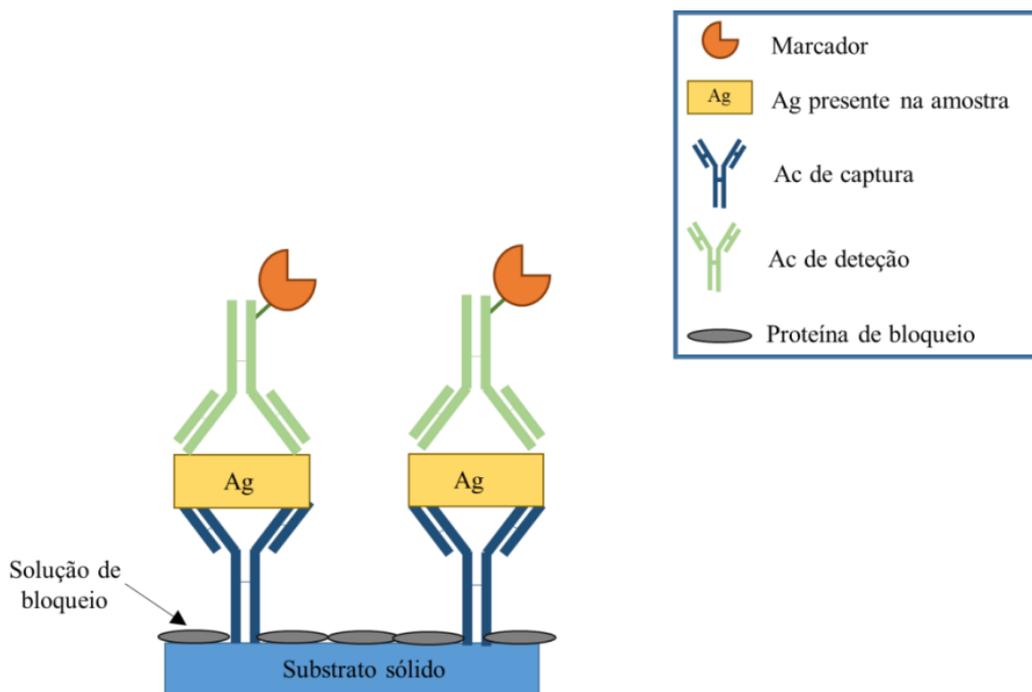


Figura 3.3 Representação esquemática dos imunossaios não-competitivos (adaptado de [4]).

Quanto ao formato competitivo (figura 3.4), o analito da amostra (Ag) compete com uma quantidade fixa de Ag marcado (Ag^*) por um número limitado de locais de ligação do Ac específico imobilizado numa superfície sólida. A concentração de analito da amostra pode ser quantificada através da proporção de Ag^* que se liga ao Ac, ou seja, à medida que o Ag aumenta, a quantidade de Ag^* ligado ao Ac (Ag^*-Ac) diminui, verificando-se uma redução do sinal a ser detetado (menor Ag^*-Ac). Por outro lado, quando a concentração de Ag na amostra diminui, a quantidade de Ag^* ligado ao Ac aumenta, sendo verificado um aumento do sinal a ser detetado (maior Ag^*-Ac). Assim, há uma correlação inversa entre a quantidade de Ag^* ligado ao Ac e a concentração de Ag presente na amostra. A utilização de uma quantidade fixa de Ag^* é de extrema importância, uma vez que possibilita a comparação com uma série de calibradores para a obtenção de resultados quantitativos [5, 17].

O formato competitivo utiliza-se sobretudo para a detecção de Ag de pequeno tamanho (baixo peso molecular) ou com apenas um epítipo. Este formato, normalmente, não requer processamento de amostra, para além da centrifugação ou filtração, e é significativamente menos sensível aos efeitos de diluição e efeitos da matriz da amostra (efeito provocado por

todos os constituintes da amostra com exceção do analito em estudo) do que os ensaios em formato não-competitivo. Para além disso, normalmente apresenta ainda uma melhor precisão, melhor exatidão e melhor reprodutibilidade. Contudo, tipicamente, a sensibilidade é menor [3, 4, 14].

O formato competitivo pode ainda ser dividido em formato homogéneo ou heterogéneo. No heterogéneo, os Ac ou Ag são imobilizados numa superfície sólida onde se forma a ligação Ac-Ag (exemplo da figura 3.4), enquanto que os ensaios homogéneos são realizados em solução (figura 3.5) [5, 14, 17]. Os imunoenaios heterogéneos apresentam como vantagem uma maior razão área de superfície/volume, o que origina uma boa sensibilidade. No entanto, este tipo de formato implica um passo adicional de imobilização. Por outro lado, os formatos homogéneos beneficiam da multiplexagem e separação eletroforética rápida, mas, normalmente, necessitam de etapas de pré-concentração.

Toda esta variedade de formatos tem sido estudada e implementada em dispositivos microfluídicos [14].

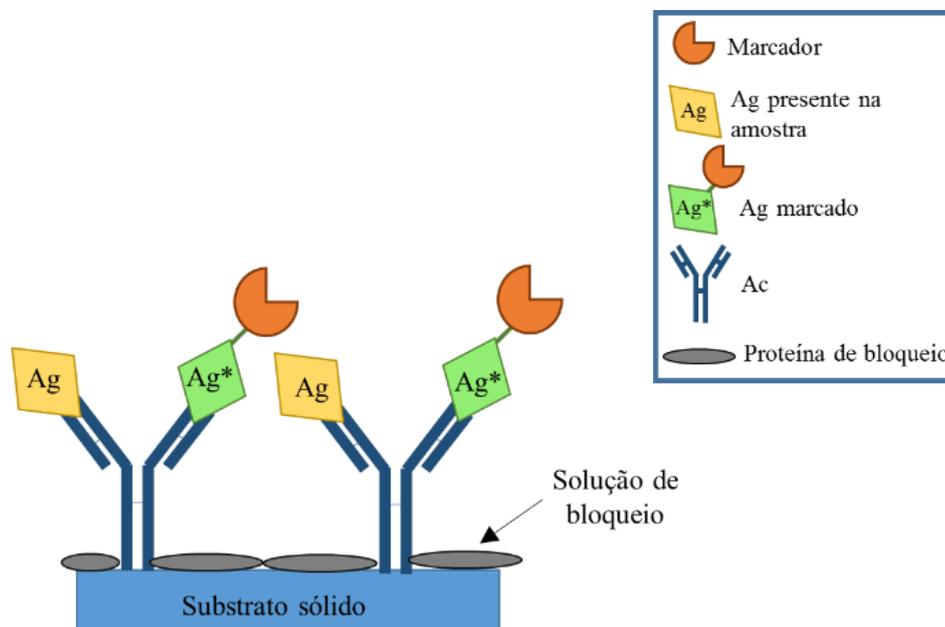


Figura 3.4 Representação esquemática dos imunoenaios competitivos (adaptado de [4]).

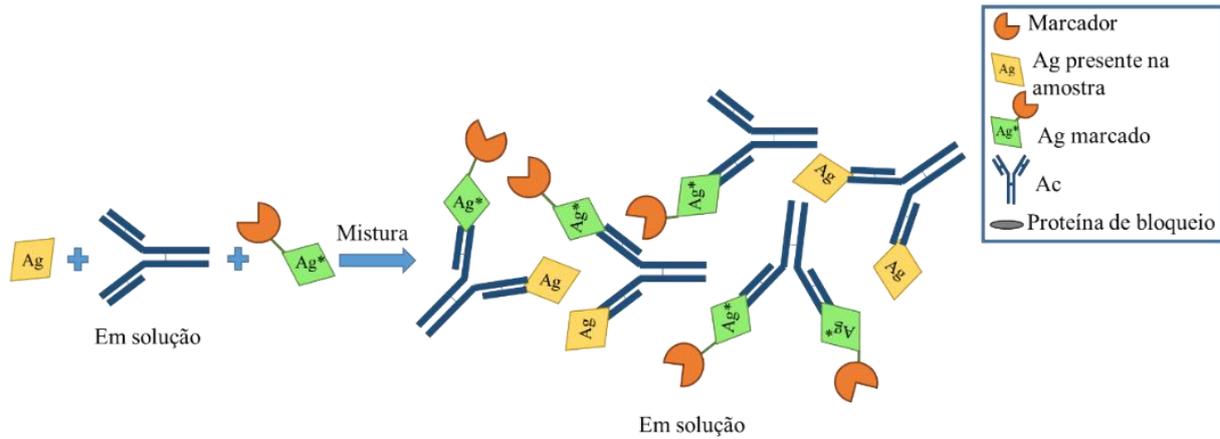


Figura 3.5 Representação esquemática dos imunoenaios competitivos homogêneos (adaptado de [5]).

Nos imunoenaios a interação entre os Ac e os Ag pode ser detetada através da conjugação ou modificação de um dos imunorreagentes (Ac ou Ag) com uma molécula específica ou marcador biológico de forma a facilitar a quantificação da substância. Comercialmente, estão disponíveis vários marcadores biológicos tais como radioativos, fluoróforos, quimiluminescentes, iões metálicos, partículas e enzimas [5, 18]. Os radioisótopos (^{125}I , ^3H , ^{57}Co e ^{14}C) foram os primeiros a ser utilizados devido à sua sensibilidade, no entanto, as preocupações resultantes da exposição à radiação e dos problemas relacionados com a eliminação dos resíduos radioativos tem estimulado a utilização de outros marcadores [5]. Os marcadores enzimáticos foram desenvolvidos para ultrapassar as deficiências dos radioisótopos. As enzimas podem ser covalentemente ligadas às proteínas permitindo desenvolver métodos extremamente eficientes para a deteção do sinal. De facto, as enzimas, são atualmente os marcadores mais utilizados em testes ELISA [18, 19]. As enzimas permitem a quantificação de concentrações muito baixas através da catalisação de um substrato incolor resultando num produto de reação colorimétrico que pode ser quantificado. Uma única molécula de enzima pode catalisar até 10^7 moléculas de substrato por minuto, aumentando assim, significativamente a sensibilidade do ensaio, quando comparada com marcadores que produzem apenas um único sinal. A marcação enzimática de biomoléculas é utilizada numa ampla variedade de métodos de deteção, como os colorimétricos, os fluorescentes ou os quimioluminescentes, dependendo do substrato e do *setup* de deteção [5, 20, 21]. Em muitas aplicações, a utilização de substratos colorimétricos

demonstrou fornecer níveis suficientes de sensibilidade e de gama dinâmica [20, 21]. As enzimas mais utilizadas como marcadores biológicos são as β -galactosidase, fosfatase alcalina e a HRP [21]. Dentro destas, a enzima HRP é a mais utilizada uma vez que é a de menor tamanho o que minimiza os efeitos estéricos (espaço ocupado pela molécula) sobre a conjugação ao Ac ou ao analito. Para além disso, tem também demonstrado uma sensibilidade superior e uma maior rapidez no ensaio (rápida degradação do substrato pela enzima) relativamente à β -galactosidase e fosfatase alcalina [20].

A enzima HRP faz parte da família das oxiredutase que catalisa a redução do peróxido de hidrogénio com oxidação simultânea do substrato. Existe uma diversidade de substratos cromogénicos disponíveis para a HRP que incluem o OPD (do inglês *O-phenylenediamine*), ABTS (do inglês *2,2'-azino-di(2-ethyl-benzthiazoline)sulfonic acid*) e TMB [20, 21]. O TMB apresenta-se como o substrato mais adequado, uma vez que não é mutagénico nem carcinogénico, como o OPD e o ABTS. Para além disso, o TMB apresenta maior sensibilidade para a quantificação de HRP comparativamente com os outros dois substratos [21].

O sistema de quantificação da HRP/TMB baseia-se numa reação consecutiva irreversível de dois passos: $A \rightarrow B \rightarrow C$ (sendo que A é o TMB e B e C são o primeiro e segundo produtos de oxidação do TMB) catalisados pela HRP na presença de H_2O_2 . O produto de oxidação final do TMB (C) só é estável em condições muito ácidas e, por isso é adicionado ácido sulfúrico que leva a uma diminuição do pH e a uma conversão completa do produto de oxidação azul à sua forma dinâmica amarela, a qual pode ser quantificada por absorvência a 450 nm (figura 3.6). Esta enzima é caracterizada por apresentar uma resposta estável, durante longos períodos de tempo, à temperatura ambiente e a uma ampla gama de pH, ao mesmo tempo que apresenta um custo relativamente baixo [22].

Assim, tendo em conta as vantagens e as limitações apresentadas anteriormente, especialmente o pequeno tamanho (baixo peso molecular) e a baixa concentração da hormona de cortisol na saliva, utilizar-se-á, no imunoensaio para a quantificação de cortisol salivar, o formato competitivo. Os sistemas de marcação enzimática oferecem boa sensibilidade e, por isso, o imunoensaio competitivo utilizará o cortisol marcado com a enzima HRP e o substrato TMB para obter uma reação colorimétrica que pode ser quantificada por deteção ótica. Para

além disso, a seleção destes imunoreagentes teve em conta a facilidade da sua obtenção comercial a um custo relativamente baixo.

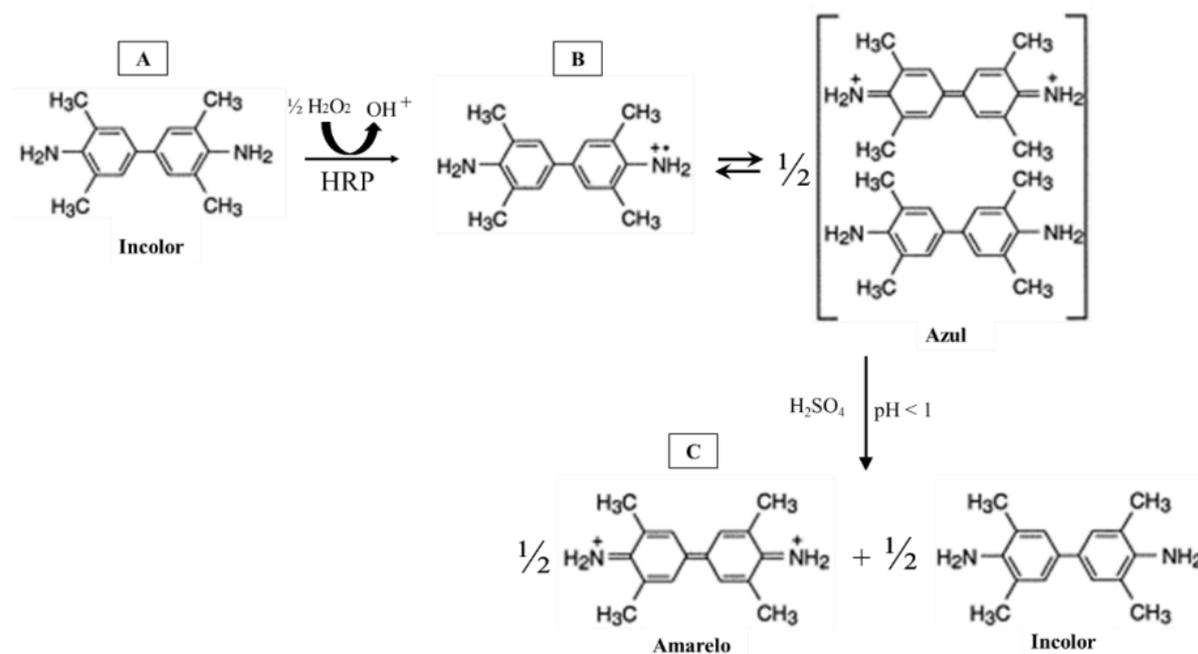


Figura 3.6 Oxidação do substrato TMB catalisada pela enzima HRP (adaptado de [21], com autorização de *Elsevier*).

3.2 Tecnologia microfluídica

Os imunoenaios mais frequentemente utilizados na prática clínica são desenvolvidos em placas de microtitulação, tipicamente em placas de 96 poços utilizando técnicas de detecção ótica [5, 14]. Este tipo de diagnóstico apresenta algumas limitações principalmente no que diz respeito à manipulação da amostra, consumo excessivo de reagentes (cerca de $100 \mu\text{L}$), longos tempos de análise (cerca de 14h) e elevado custo por ensaio (aproximadamente 250 € por Kit ELISA) [23]. Embora esta técnica seja considerada o método de eleição para o diagnóstico clínico, há já algum tempo surgiu a necessidade, e começaram mesmo a ser desenvolvidas novas plataformas que consigam fornecer uma resposta mais rápida, com elevada eficiência e com um custo mais reduzido, principalmente o custo por teste [24]. Os sistemas microfluídicos, também conhecidos como *lab-on-a-chip* (LOC) ou microsistema de análise total, são exemplos desses avanços e têm atraído muita

atenção devido às suas vantagens associadas, tais como a miniaturização, integração e automação. Estes sistemas combinam a microeletrônica, mecânica, ótica, biotecnologia e outras áreas científicas com o propósito de se desenvolverem plataformas sobre as quais um ou mais testes laboratoriais são completamente integradas num único *chip* com o tamanho de alguns centímetros quadrados usando pequenos volumes de fluidos para a análise. Para além disso, oferecem dispositivos capazes de efetuar medições com elevada especificidade e sensibilidade. A funcionalidade destes dispositivos inclui a manipulação da amostra, mistura, filtragem, análise e monitorização [25-27]. A combinação destas plataformas com os imunoenaios tem sido extensivamente explorada nos últimos anos, o que levou ao aparecimento de dispositivos miniaturizados, i.e., LOC para ensaios imunológicos, de baixo custo e autónomos com elevada especificidade e sensibilidade cuja atividade analítica é baseada na interação Ac-Ag [3, 25]. Um LOC típico contém: microcanais para transporte dos fluidos biológicos (sangue, líquido cefalorraquidiano, urina ou saliva); componentes de transdução/deteção (óticos, térmicos, piezoelétricos, etc.); componentes de atuação (microválvulas, misturadores, etc.); e a microeletrônica de conversão do sinal do transdutor num sinal elétrico (figura 3.7) [28].

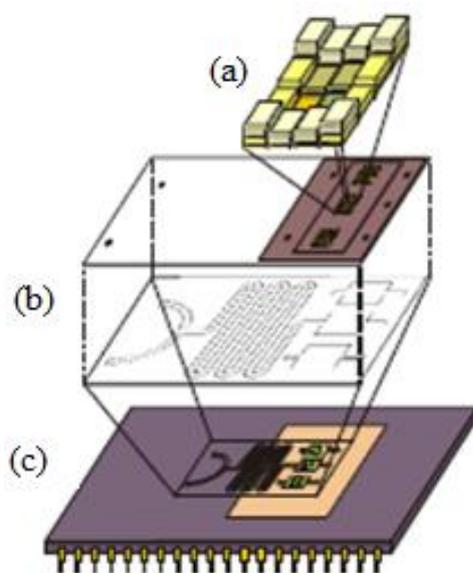


Figura 3.7 Esquema de um LOC, que inclui: (a) sistema de filtragem ótica; (b) sistema de microfluidos; (c) sistema de deteção e leitura (adaptado de [29]).

A tecnologia microfluídica visa, em geral, desenvolver um dispositivo com melhor desempenho analítico, reduzindo o consumo de reagentes, diminuindo o tempo de análise,

aumentando a confiabilidade e a sensibilidade, através da automação e da integração de múltiplos processos num único dispositivo [3, 14, 28, 30]. Estas características são extremamente importantes para aplicações em imunoensaios por diversas razões:

(1)Quantidade reduzida de amostra e reagentes: a maioria dos reagentes, principalmente os Ac e os marcadores utilizados nos imunoensaios são muito caros sendo por isso muito importante desenvolver métodos de diagnóstico com pouco consumo de reagentes [31]. Os sistemas miniaturizados, devido ao seu pequeno tamanho, ajudam a superar esta limitação, reduzindo drasticamente a quantidade de reagentes utilizados e por isso o custo por teste [4, 17]. Por outro lado, estes dispositivos permitem também análises com pequenos volumes de amostra, sendo de extrema importância, por exemplo na análise de sangue de recém-nascidos ou análises de fluido da espinal medula.

(2)Diminuição do tempo de análise: a utilização de sistemas microfluídicos para realizar imunoensaios permite reduzir o tempo de análise de algumas horas ou dias para alguns segundos ou minutos, devido à redução da distância de difusão dos fluidos, o que acelera a mistura dos reagentes. Assim, estes sistemas podem ser rápidos o suficiente para medições contínuas e em tempo real sem perder sensibilidade e confiabilidade relativamente aos métodos convencionais [30, 31].

(3)Automação: a realização de análises pelos métodos convencionais é por vezes afetada pelo simples erro humano reduzindo a precisão do método. Os sistemas robóticos em grande escala obviam este problema, no entanto, encarece todo o processo de análise para além de conterem partes móveis que sofrem desgaste e quebras. No caso dos dispositivos microfluídicos, podem ser construídos sistemas para o controlo da circulação dos fluídos, baseados em microbombas, válvulas, misturadores, etc., controlados por *software*. Estes sistemas conferem autonomia ao dispositivo e um menor custo que os sistemas robóticos de grande escala [28, 31].

(4)Integração e portabilidade: Nos procedimentos convencionais o atraso inerente à recolha da amostra, envio para o laboratório, análise e obtenção dos resultados pode ser eliminado utilizando sistemas microfluídicos que integram diversas funcionalidades como os componentes de manipulação, atuação e deteção num

único *chip* aumentando assim a sua portabilidade com fornecimento de resultados de uma forma mais rápida [25, 28, 31].

3.3 Materiais utilizados como substratos nos dispositivos microfluídicos

Os dispositivos microfluídicos podem ser fabricados por uma variedade de materiais dependendo da aplicação pretendida. A precisão necessária para se obterem estruturas complexas e para se criarem sistemas que são cada vez mais pequenos, precisos, e com um elevado nível de funcionalidades (transporte de fluidos, mistura, separação, manipulação, detecção, etc.) está a crescer tão rapidamente quanto o número de aplicações para esses dispositivos miniaturizados. Isto é ditado pela disponibilidade dos materiais e da tecnologia para os manipular [30, 32]. Os principais materiais utilizados para o fabrico desses dispositivos incluem o silício, o vidro, os polímeros e recentemente o papel. Cada um deles apresenta algumas vantagens e limitações, as quais são abordadas a seguir.

3.3.1 Silício

O desenvolvimento verificado na indústria da microeletrónica e dos sistemas eletromecânicos (MEMS do inglês *micro eletro mechanical system*) permitiu estabelecer processos de microfabricação do silício, que foram transferidos para o fabrico dos primeiros dispositivos microfluídicos. As principais características do silício fazem dele um bom candidato para os dispositivos microfluídicos, uma vez que possui uma estrutura bastante rígida, pode ser padronizado por técnicas de corrosão com dimensões à escala nanométrica, apresenta boa condutividade térmica, boa resistência a elevadas temperaturas, facilidade de deposição de metais e permite integração de eletrónica [17, 30]. Para além disso, a química de superfície do silício tem sido muito estudada para ligar covalentemente moléculas ou revestimentos através dos seus grupos reativos de silanol da superfície [31]. Apesar destas vantagens, o silício foi substituído pelo vidro e pelos polímeros na maior parte das aplicações microfluídicas, uma vez que o silício não é ópticamente transparente [30, 31], o que impede a

sua utilização conjuntamente com sistemas de detecção ótica. Para além disso, as propriedades condutoras da superfície do silício tornam-no incompatível com aplicações em que é necessário um fluxo eletrocínético para movimentar os reagentes [28]. Mais ainda, as proteínas e algumas biomoléculas apresentam tendência para se ligar aos grupos de superfície do silício, sendo necessário um tratamento de superfície para reduzir essa adsorção não-específica [28, 31]. O silício apresenta ainda baixa permeabilidade, o que o torna inadequado para estudos de células a longo prazo. No que diz respeito ao custo, os substratos de silício são relativamente mais caros comparativamente com o vidro e com os polímeros [17, 31]. Por fim, o processo de fabrico de dispositivos microfluídicos baseados em silício envolve inúmeros passos, tais como, limpeza, revestimento com resina fotossensível, fotolitografia, revelação, corrosão química ou física, passos morosos em termos de tempo e com um custo de fabrico elevado [30]. Estas limitações tornam-no um material não preferencial para aplicações práticas em imunoensaios comerciais.

3.3.1 Vidro

A maior parte dos problemas apresentados pelo silício podem ser ultrapassados utilizando substratos de vidro. O vidro é um sólido duro e amorfo que é frequentemente incluídos nos LOC devido às suas propriedades, tais como, transparência na gama visível do espectro eletromagnético (o que permite detecção ótica ou mesmo visualização), baixa autofluorescência, isolamento elétrico (podendo ser utilizado para o transporte de fluidos electrocineticamente), e apresenta-se como um substrato ligeiramente mais barato que o silício [17, 30]. Para além disso, o vidro é rígido e muito resistente aos solventes biológicos. Contudo, os dispositivos microfluídicos baseados em vidro, são padronizados através de técnicas de corrosão química (com ácido) ou física (utilização de gases CF_4 , CHF_3), de processamento a laser ou mecânico (abrasivos) e mais recentemente por moldagem a $1100^\circ C$ utilizando moldes em silício, permitindo apenas fabricar microestruturas com baixa razão de aspeto (cerca de 8 ou menos) [33]. Mais ainda, o fabrico de dispositivos em vidro é de elevado custo, podendo mesmo ser mais elevado que o fabrico em silício, uma vez que utiliza produtos químicos bastante perigosos (por exemplo HF) que requerem equipamentos e proteção especial [28, 33]. Além disso, os processos necessários para fazer a ligação de vidro são muito complicados, exigindo condições rigorosas de elevadas temperaturas, elevadas

pressões e ambientes de salas limpas. Por fim, o vidro não é permeável a gases, e como consequência limitam a sua utilização em *die* para cultura de células a longo prazo. Estas limitações motivaram o desenvolvimento de novos materiais para o fabrico de *die* microfluídicos de uma forma mais fácil, barata e compatível com uma maior variedade de aplicações biológicas [17, 33, 34].

3.3.2 Polímeros

Os *die* baseados em polímeros surgiram alguns anos mais tarde relativamente aos *die* em silício e vidro. Contudo, ganharam a liderança como substrato, devido às suas vantagens quando comparado com eles. Em particular, são de fácil acesso, baratos, requerem processos fáceis para o fabrico de estruturas tridimensionais complexas, e muitos polímeros não interagem com as soluções químicas [28, 34, 35]. Os polímeros estão disponíveis numa ampla variedade de materiais com propriedades específicas sendo possível classificá-los em termoendurecíveis, termoplásticos e elastómeros [30].

Os polímeros termoendurecíveis são caracterizadas pelo aumento das ligações cruzadas entre moléculas, após aquecimento ou irradiação, formando uma rede rígida que não pode ser modelada após a sua cura. Normalmente estes materiais são estáveis a temperaturas elevadas, resistentes à maioria dos solventes e são ópticamente transparentes [30, 34]. Uma das grandes vantagens da utilização destes materiais reside na possibilidade de microfabricação tridimensional utilizando fotopolimerização. Para além disso, a sua elevada robustez permite o fabrico de estruturas livres e com elevada razão de aspeto. No entanto, essa elevada rigidez torna impossível o fabrico de estruturas móveis, tais como válvulas e diafragmas. Mais ainda, o seu custo de fabrico, quando comparado com os outros tipos de polímeros, é mais elevado, limitando por isso, a sua utilização em dispositivos microfluídicos [35]. Alguns exemplos destes materiais incluem a resina fotossensível SU-8 e poliamidas que já foram utilizadas para o fabrico de *chips* microfluídicos. No entanto, as limitações apresentadas por estes materiais fizeram com que eles apenas se tornassem materiais para o fabrico de moldes e não da estrutura propriamente dita [30, 35]. Por exemplo, a resina fotossensível SU-8 (a qual será utilizada para o molde do *die* de microfluidos) tornou-se num molde com um processo de fabrico mais fácil e de mais baixo custo comparativamente aos moldes em silício e vidro,

permitindo ainda assim múltiplas reutilizações do molde e, conseqüentemente, elevada replicabilidade das estruturas [36, 37].

Os polímeros termosplásticos diferem dos anteriores pelo facto de poderem ser remodelados após a sua cura. Para este processo, é necessário aquecer o material até à temperatura de transição vítrea, a qual torna-os novamente passíveis de sofrer remodelação, sendo que este passo pode ser repetido várias vezes. Esta característica é importante para moldagem ou ligação deste material [30, 34, 35]. Os termoplásticos mais utilizados incluem o polimetil-metacrilato (PMMA), policarbonato (PC), poliestireno (PS) polietileno tereftalato (PET) e policloreto de vinil (PVC). Estes materiais apresentam algumas limitações principalmente porque são incompatíveis com alguns solventes orgânicos, como cetonas hidrocarbonetos, apresentando, no entanto, elevada resistência a álcoois. Tal como o silício e o vidro, os materiais termoplásticos também apresentam baixa permeabilidade, o que os torna inadequados para estudos de células a longo prazo. Para além disso, as estruturas móveis são difíceis de implementar devido à sua rigidez [30]. Os materiais termoplásticos são processados por termomoldagem, sendo possível produzir milhares de réplicas com uma taxa de fabrico elevada e com um baixo custo. No entanto, a necessidade de processamento a elevadas temperaturas requer moldes em metal ou silício capazes de suportar o fluxo de plástico [28, 30, 34]. Estes materiais tornam-se ideais para produção comercial, mas não para prototipagem.

Os elastómeros são uma alternativa aos polímeros referidos anteriormente para o fabrico de *dies* microfluídicos, principalmente para protótipos. Os elastómeros, são cadeias poliméricas reticuladas que podem ser comprimidas ou esticadas quando lhe são aplicadas forças, retomando a forma original quando a força lhe é retirada. O elastómero mais utilizado em microfluídica é o PDMS, composto por monómeros repetidos de $\text{OSi}(\text{CH}_3)_2$, que apresenta características vantajosas principalmente no que diz respeito à facilidade e ao baixo custo de fabrico [3, 31, 35]. O processamento do PDMS pode ser realizado em condições normais de laboratório, sem necessidade de sala limpa, o que torna o seu processo de fabrico mais barato quando comparado com os processos dos materiais referidos anteriormente. Com a utilização de moldes apropriados (por exemplo, da resina fotossensível SU-8) podem ser obtidas estruturas em PDMS com características que podem ir até à nanoescala. A baixa energia de superfície do PDMS facilita o seu destaque dos moldes após a cura. Para além disso, o PDMS pode ser ligado irreversivelmente a outras partes de PDMS, silício ou vidro,

utilizando plasma de oxigénio (O₂) ou simplesmente aplicando uma camada extremamente fina de PDMS (depositada por *spin coating*) que atua como cola [28, 35]. Com este processo, é possível fabricar estruturas multicamadas através da ligação de várias estruturas em PDMS. Para além disso, o carácter elastomérico do PDMS permite o fabrico de estruturas móveis no interior dos microcanais que podem atuar como microválvulas, microbombas, micromisturadores, entre outros [30, 38]. O PDMS apresenta permeabilidade a gases e impermeabilidade à água sendo, portanto, útil, para cultura de células a longo prazo em microcanais fechados. Mais ainda, é biocompatível e opticamente transparente na gama espectral visível tornando-o compatível com a maior parte dos sistemas de deteção ótica [39, 40]. A principal limitação do PDMS deve-se ao seu carácter hidrofóbico presente na superfície nativa proporcionando uma adsorção não-específica de proteínas ou outras moléculas. Apesar disso, o extenso conhecimento acerca do PDMS, principalmente no que diz respeito à modificação e funcionalização da superfície, fazem dele um excelente candidato para prototipagem de novos dispositivos microfluídicos, especialmente em imunossensores [39]. Este conhecimento é de especial interesse e permite, por exemplo, a modificação da superfície hidrofóbica nativa do PDMS para hidrofílica através de processos de plasma de O₂ ou tratamento químico. Para além disso, podem ser utilizadas diversas soluções de bloqueio para eliminar esse efeito da adsorção não-específica [3, 30, 31].

Pelas vantagens anteriormente apresentadas, o PDMS apresenta-se como o material mais utilizado a nível laboratorial para o fabrico de sistemas de microfluidos.

3.3.3 Papel

Os dispositivos fabricados em papel demonstraram que é possível realizar ensaios microfluídicos em canais não selados, contrariamente às abordagens descritas anteriormente em que os canais eram selados [30]. O papel é constituído por uma matriz de celulose extremamente porosa com excelente absorção de líquidos. Os dispositivos microfluídicos à base de papel são fabricados pela aplicação de materiais hidrofóbicos sobre o papel hidrofílico. Assim, a correta orientação do fluxo de soluções aquosas é efetuada através de barreiras hidrofóbicas em algumas regiões do papel, sendo que o fluxo será conduzido com precisão pelas regiões hidrofílicas através do efeito capilar, permitindo assim atuar como

bomba passiva sem necessidade de componentes externos [30, 41]. Este tipo de conceito apresenta-se como uma abordagem promissora para análises portáteis, de baixo custo e de fabrico simples. Os métodos para gerar padrões hidrofóbicos no papel podem ser feitos recorrendo ou ao método litográfico ou ao método de impressão. No método litográfico, aplica-se uma solução polimérica sobre o papel e seguidamente remove-se o revestimento nalgumas zonas para definição dos canais. Este método apresenta elevada resolução, mas a necessidade de aplicação do revestimento e posterior remoção, pode influenciar as propriedades de superfície do papel nas zonas dos canais [30, 42]. Além disso, este método é mais caro do que o método de impressão. No método de impressão utilizam-se equipamentos mais simples, padronizando diretamente as zonas hidrofóbicas pretendidas, sem a necessidade de pré-exposição dessas zonas aos reagentes [30].

A principal desvantagem dos canais microfluídicos fabricados em papel prende-se com a limitação dos métodos de deteção que podem ser utilizadas, principalmente alguns dos óticos, uma vez que não exhibe transparência [43]. A utilização do papel para o fabrico de dispositivos microfluídicos apresenta ainda alguns desafios nomeadamente na obtenção de uma sensibilidade satisfatória, uma vez que a matriz porosa do canal pode bloquear o sinal interno bem como diluir as amostras durante o fluxo [30]. Para além disso, os LD dos métodos colorimétricos utilizados em dispositivos à base de papel são insuficientes para a análise de amostras com concentrações muito baixas [41]. Os líquidos que têm uma tensão de superfície baixa não ficam bem confinados no canal definido pela hidrofobicidade, ultrapassando por vezes as barreiras que deveriam limitar esses canais tornando o dispositivo ineficaz para o transporte desse tipo de líquidos [41, 43]. As dimensões mínimas obtidas em canais de papel rondam os 200 μm e por esse motivo impedem integração com elevada densidade. Para além disso, existe uma dificuldade na integração de válvulas de pequeno tamanho nos dispositivos em papel. Este tipo de dispositivos pode ainda ser afetado por problemas relacionados com a evaporação ou retenção da amostra e reagentes (consumo ineficaz) nos canais abertos. O volume que atinge as zonas de deteção relativamente ao volume total dentro do dispositivo é normalmente inferior a 50%, sendo a perda muito significativa quando se utiliza quantidades de amostras/reagentes pequenas ou quando estas são dispendiosas [30, 41].

Os dispositivos microfluídicos à base de papel ainda se encontram numa fase inicial de desenvolvimento, sendo por isso, necessários esforços para tornar estes dispositivos com

utilidade prática. São necessários ainda mais estudos sobre a estrutura do papel, bem como as tecnologias de impressão para se conseguir diminuir a evaporação e a retenção da amostra. Para além disso, os fenómenos de absorção capilar têm de ser mais investigados para se controlar de uma forma mais precisa o fluxo no interior dos canais. No entanto, os principais desafios a serem superados centram-se na melhoria da sensibilidade, da seletividade, da especificidade e da operacionalidade. A combinação do papel com materiais inovadores (por exemplo, nanomateriais) apresenta-se como uma possível solução para melhorar as características descritas e, possivelmente, desenvolver dispositivos de diagnóstico que consigam competir com os materiais mais tradicionais apresentados anteriormente.

Dos materiais abordados, o PDMS ou o papel seriam os melhores candidatos ao fabrico da parte microfluídica do imunossensor desenvolvido neste trabalho. Contudo, devido às limitações referidas sobre o papel a escolha recaiu na utilização do PDMS.

3.4 Técnicas de deteção ótica utilizadas nos imunossensores microfluídicos

Existe uma ampla gama de técnicas de deteção que podem ser utilizadas para a transdução do sinal resultante da interação Ac-Ag. Na secção 2.7 descreveram-se algumas delas tendo em conta a quantificação de cortisol. Como se pode concluir, de entre essas a deteção ótica é a técnica mais utilizada em aplicações com imunoensaios. Os equipamentos que incorporam este tipo de deteção são extremamente estáveis relativamente à calibração, podendo responder simultaneamente a mais do que um analito e apresentam potencial para fornecer um maior número de informação do que os transdutores eletroquímicos ou piezoelétricos. Relembrando, que a maioria dos imunoensaios implicam a conjugação de imunoagentes com marcadores para facilitar a quantificação de analito. Estes marcadores (por exemplo, marcadores fluorescentes, enzimáticos ou partículas metálicas) facilitam a amplificação do sinal ótico bem como aumentam a sensibilidade de deteção [3, 20, 44]. A combinação de imunossensores óticos com *chips* microfluídicos tem-se apresentado como uma alternativa atraente para o desenvolvimento de aplicações de diagnóstico clínico, principalmente quando se pretende rastrear simultaneamente vários analitos. Além disso, os

sistemas de detecção ótica podem ser implementados e integrados em sistemas microfluídicos utilizando técnicas óticas de fluorescência, luminescência, absorvência (colorimetria) e SPR [3, 31]. A fluorescência e a absorvência, são as técnicas óticas mais utilizadas em laboratórios de análises clínicas. A sua desvantagem prende-se essencialmente com o custo. Contudo, graças à rápida redução dos custos dos componentes optoelectrónicos, a detecção ótica integrada em microfluídica está em grande desenvolvimento, permitindo assim elevada sensibilidade e um custo por teste vantajoso, com possibilidade de multiplexagem [45].

3.4.1 Fluorescência

A fluorescência é muito utilizada em imunossensores microfluídicos devido não só à elevada sensibilidade e seletividade que apresenta, mas também ao facto dos procedimentos de marcação estarem bem estabelecidos [3, 31].

A fluorescência baseia-se na medição da luz emitida por um marcador fluorescente quando excitado por uma fonte de luz a determinado comprimento de onda. O princípio da fluorescência baseia-se na excitação dos eletrões de uma molécula, por absorção da luz, de um estado de energia para um estado de energia superior, e que posteriormente regressam ao seu estado fundamental reemitindo energia fotónica. Este método requer diversos componentes que incluem uma fonte de luz de excitação, uma molécula marcada com fluoróforos, filtros óticos para isolar os fotões de emissão dos fotões de excitação e um fotodetector que converte a energia dos fotões emitidos pela amostra num sinal elétrico [3]. Informação detalhada sobre a técnica de fluorescência pode ser encontrado na publicação de Kuswandi *et al.* (2007) [46]. A fonte de luz de excitação é, normalmente, um laser uma vez que estes componentes apresentam baixa divergência e podem facilmente focar uma pequena região de detecção. Para além disso, existem já lasers baratos e que podem ser integrados num dispositivo portátil [45]. Outras alternativas para reduzir os custos incluem a utilização de LEDs (do inglês *light emitting diode*) como fontes de excitação [45, 47], no entanto, são menos aconselhados porque apresentam maior divergência e um espectro de emissão mais alargado. Estas limitações têm sido ultrapassadas incorporando nos dispositivos microfluídicos lentes, guias de onda ou filtros, no entanto aumentam a complexidade e custo de fabrico desses dispositivos [45]. No que diz respeito à leitura do sinal fluorescente, este

pode ser obtido utilizando fotodíodos de silício [48], fotomultiplicadores [49, 50], ou mesmo fotodíodos orgânicos (OPD do inglês *organic photodiodes*) que têm emergido como fotodetecores para integração em dispositivos microfluídicos [48, 51, 52].

A detecção por fluorescência apresenta algumas limitações. Uma delas é a autofluorescência característica de alguns materiais, nos quais se incluem muitos dos materiais poliméricos, bem como a autofluorescência de algumas biomoléculas não-específicas presentes na amostra. Este ruído de fluorescência, principalmente o dos materiais, afeta a medição, podendo mesmo ser mais elevado do que as emissões produzidas pela amostra [45, 52]. Assim, o desenvolvimento de sistemas com detecção por fluorescência deve ter em conta a seleção dos materiais bem como o grau de pureza da amostra. Para além destas limitações, o alinhamento da luz de excitação com a amostra e o sistema de detecção apresentam-se como uma tarefa desafiante quando se pretende a utilização em dispositivos com canais microfluídicos estreitos. Dado que as emissões de fluorescência são isotrópicas, a eficiência de recolha dos sinais é geralmente baixa. Isto pode ser melhorado utilizando um conjunto complexo de lentes, espelhos e filtros óticos de forma a direcionar a luz emitida para os detetores. Contudo, esta abordagem implica mais uma vez que os sistemas se tornem mais complexos, maiores e mais caros. Por fim, apesar de existirem uma diversidade de fluoróforos e marcadores químicos disponíveis, estes são caros, têm um tempo de vida útil limitado e são frequentemente influenciados por fatores químicos, como o pH, que pode variar em função das amostras e reagentes utilizados [15, 31].

3.4.2 Luminescência

A luminescência baseia-se na medição de uma luz emitida (emissão fotoquímica) que surge devido à excitação de uma molécula luminescente a partir de uma reação química (reação entre enzima e substrato luminescente), geralmente uma reação de oxidação irreversível. Os substratos quimiluminescentes mais utilizados são baseados no luminol e nos seus derivados que emitem luz azul a 425 nm quando oxidados [3, 31]. Informação detalhada sobre esta técnica ótica encontra-se publicado por Dodeigne *et al.* (2000) [53] e por Kuswandi *et al.* (2007) [46].

As vantagens desta técnica para aplicações microfluídicas são muito semelhantes às apresentadas para a fluorescência. Adicionalmente, apresenta ainda a vantagem de não necessitar de fonte de luz para a emissão luminescente o que, por si só, reduz a complexidade do dispositivo bem como uma potencial fonte de ruído [54]. Para além disso, não necessita de filtros ou monocromadores uma vez que todo o fluxo de fótons emitido é detetado. No entanto, são necessários detetores com elevada sensibilidade [45]. Como desvantagem este tipo de deteção pode ser limitado pela reduzida existência de compostos com características luminescentes.

3.4.3 Absorvência

A absorvência, também designada por técnica colorimétrica apresenta-se como uma técnica capaz de responder eficazmente aos requisitos impostos pelos imunossensores, principalmente no que diz respeito ao fabrico de plataformas fáceis de utilizar, portáteis e que possuam sistemas de deteção baratos. Esta técnica encontra-se bem estabelecida e é muito utilizada à macroescala na química analítica e nos diagnósticos de ELISA [3, 45]. A deteção da absorvência baseia-se na medição da atenuação da luz que atravessa uma amostra, a um determinado comprimento de onda específico para o analito a analisar nessa amostra [45]. O valor da absorvência é utilizado para calcular a concentração do analito, sendo diretamente proporcional a essa concentração. Informação detalhada sobre esta técnica ótica encontra-se publicado por Kuswandi *et al.* (2007) [46]. A sua utilização em imunoensaios implica, normalmente, a utilização de uma enzima que ao degradar um determinado substrato vai originar um produto colorimétrico que é medido por espectrofotometria. A enzima HRP em conjunto com o substrato TMB, referidos em 3.1.2, são os mais utilizados em imunoensaios quando se usa esta técnica de deteção [3, 21], na qual é medido produto colorimétrico resultante da degradação do TMB pela enzima HRP.

A fácil integração desta técnica de absorvência com as técnicas de fabrico dos dispositivos microfluídicos, tornam este método muito promissor para aplicações POC. Os recentes desenvolvimentos na integração nos microcanais de guias de onda óticos têm impulsionado a utilização desta técnica em dispositivos microfluídicos com boa sensibilidade e sem interferências elétricas [55]. Outro exemplo é o desenvolvimento e a miniaturização de

fotodetektres em CMOS bem como da sua eletrônica de leitura, tudo integrado num *chip*. Atualmente, nos telemóveis estão integradas câmaras de elevada resolução que são utilizadas para tirar fotografias aos microcanais após a reação colorimétrica e enviadas para computadores com *software* de processamento e análise das imagens. A utilização destes esquemas já provou ser capaz de detetar concentrações de IgG tão baixas como de 1 ng/mL, como relatado por Lu, *et al.* (2009) [56] demonstrando a sua viabilidade.

A principal limitação que pode afetar a técnica de absorvência quando utilizada em microfluídica é o curto caminho ótico que pode ser insuficiente para a quantificação de analito. Isto pode acontecer se o número de moléculas presentes nesse caminho ótico não for suficiente para absorver uma quantidade de luz detetável [45]. Apesar de esta limitação levar a uma perda de sensibilidade, ou obrigar à utilização de câmaras de reação com maior profundidade ou a esquemas de múltiplas reflexões da luz utilizando materiais refletores [57], tudo isto com vista a aumentar o caminho ótico, esta técnica continua a ser a preferida relativamente aos outros métodos óticos devido às suas inúmeras vantagens. Principalmente porque este método de deteção oferece estratégias de quantificação simples, fáceis de utilizar, portáteis, de baixo custo sendo bastante promissoras para aplicações POC.

3.4.4 SPR

A técnica SPR é uma ferramenta de deteção poderosa para imunoensaio, uma vez que é capaz de detetar interações entre o Ag e o Ac em tempo real e sem necessidade de marcadores biológicos e/ou químicos. Para além disso permite medições simultâneas de vários analitos. Este método de deteção fornece informação acerca da concentração do analito bem como da sua cinética de associação/dissociação e afinidade da reação [3, 45]. Esta técnica baseia-se na medição da variação do índice de refração numa superfície fina metálica (normalmente ouro) previamente funcionalizada com biomoléculas. Esta variação é extremamente sensível às alterações na superfície do filme metálico, alterações estas que variam proporcionalmente com a concentração de moléculas alvo a ele ligadas [3]. Informação detalhada sobre esta técnica ótica encontra-se no trabalho publicado por Guo (2012) [58].

Comercialmente, encontram-se disponíveis dispositivos SPR de baixo custo, compactos e portáteis, como o *Spreeta 2000* desenvolvido pela *Texas Instruments Inc* [59], que permitem combinar plataformas microfluídicas com estes sistemas SPR miniaturizados para o desenvolvimento de aplicações práticas de imunossensores [17]. Apesar de se apresentar como uma técnica promissora, são necessários alguns cuidados principalmente na manutenção da temperatura constante na área de detecção, o que não é cumprido por si só podendo adicionar ruído térmico durante a medição. Esta limitação pode ser superada através da utilização de microaquecedores integrados na área de detecção, no entanto, aumentam a complexidade e custos de fabrico [45].

A técnica SPR apesar de se encontrar bem estabelecida e permitir uma excelente sensibilidade requer, ainda, instrumentação complexa. Para além disso, é necessário que a camada metálica (tipicamente ouro) seja depositada no dispositivo descartável, aumentando assim os seus custos. O principal desafio na tecnologia SPR reside na fraca sensibilidade quando existe a necessidade de detetar analitos com baixo peso molecular (menos do que 1000 Da) uma vez que o aumento do índice de refração produzido por estas moléculas pequenas pode não ser suficiente para ser detetado diretamente [60].

O desenvolvimento do imunossensor microfluídico para quantificação dos níveis de cortisol salivar requer técnicas analíticas sensíveis que possam ser integradas para detecção *on-chip*. A maioria das técnicas apresentadas anteriormente demonstram ter potencial para serem incluídos no dispositivo microfluídico, no entanto, a técnica de absorvência potencia ao mesmo tempo as características de ser bastante sensível, seletiva, fácil de integrar e de utilizar. A miniaturização desta técnica ótica já ofereceu plataformas analíticas integradas em dispositivos microfluídicos, comprovando o seu potencial para aplicações em imunossensores, especialmente quando se pretende obter dispositivos POC. Por essas razões a técnica de detecção ótica por absorvência foi a selecionada para ser utilizada no âmbito deste trabalho.

3.5 Conclusão

Os recentes avanços verificados no desenvolvimento de imunossensores baseados em tecnologias microfluídicas para diagnóstico clínico possibilitaram características notáveis a esses imunossensores quando comparados com os sistemas de detecção convencionais. As principais melhorias obtidas incluem redução do consumo de reagentes e amostra, automação operacional, baixo custo por análise, baixo consumo de energia e tamanho compacto. As tecnologias necessárias para o desenvolvimento de um microsistema que cumpra todos estes requisitos têm de ser combinadas e otimizadas incluindo as técnicas de microfabricação das estruturas, modificação de superfície, integração de técnicas de detecção e a química do imunoensaio.

O pequeno tamanho e a baixa concentração da molécula de cortisol na saliva fizeram com que o formato competitivo fosse o escolhido para ser utilizado no imunossensor apresentado neste trabalho. Neste formato o sinal de saída é inversamente proporcional à concentração do analito, característica esta desejável quando se pretende medir concentrações baixas, como é o caso do cortisol salivar.

De entre os materiais disponíveis para o fabrico do *die* microfluídico do imunossensor, os materiais poliméricos mostraram ser os mais úteis ao permitirem reduzir drasticamente os custos de produção ao ponto de ser possível o fabrico de dispositivos descartáveis. De entre eles, o PDMS é o que apresenta uma série de vantagens quer de fabrico, quer das técnicas de fotolitografia envolvidas no fabrico dos moldes, quer das técnicas de ligação a outros substratos, quer dos métodos de modificação para imobilização de biomoléculas, quer da possibilidade da implementação e integração de métodos de detecção ótica. Estas vantagens fazem deste material um excelente candidato para a aplicação pretendida.

A maioria das técnicas de detecção ótica apresentados neste capítulo são eficazes para a determinação de cortisol salivar apresentando baixo custo, análise rápida, boa sensibilidade e elevada seletividade. No entanto, os métodos convencionais de quantificação de cortisol utilizam a absorvência para a sua quantificação, demonstrando ser bastante sensíveis e seletivos. Para além disso, atualmente, a miniaturização desta técnica ótica em dispositivos

microfluídicos é já uma realidade, o que a torna atrativa para ser incorporada em dispositivos microfluídicos, especialmente quando se pretende obter dispositivos POC. Por este motivo, a absorvência foi a técnica ótica utilizada na aplicação pretendida.

Devido à utilização do sistema de detecção ótico, o formato do imunensaio utiliza o cortisol marcado com a enzima HRP e o substrato TMB para obtenção de uma reação colorimétrica. Esta combinação apresenta uma série de vantagens, incluindo a disponibilidade comercial para a obtenção de cortisol marcado com HRP a um custo relativamente baixo, bem como uma elevada sensibilidade oferecida por este sistema de detecção enzimático.

Neste sentido, e considerando os objetivos do presente trabalho, as vantagens associadas com os dispositivos microfluídicos de PDMS e com as técnicas de detecção ótica, especialmente a absorvência, torna-os excelentes candidatos para o desenvolvimento do imunossensor microfluídico pretendido.

Referências

- [1] P. B. Lippa, L. J. Sokoll, and D. W. Chan, "Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry," *Clinica Chimica Acta*, vol. 314, pp. 1-26, 2001.
- [2] R. Săndulescu, "Cecilia Cristea, Anca Florea, Mihaela Tertiş and," 2015.
- [3] K. N. Han, C. A. Li, and G. H. Seong, "Microfluidic chips for immunoassays," *Annual review of analytical chemistry*, vol. 6, pp. 119-141, 2013.
- [4] J. Horák, "Microfluidic immunosensor for point-of-care diagnostics," University of Freiburg, 2013.
- [5] N. Bojorge Ramírez, A. Salgado, and B. Valdman, "The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives," *Brazilian journal of chemical engineering*, vol. 26, pp. 227-249, 2009.
- [6] Y. Wei, Y. Chen, H. Li, S. Shuang, C. Dong, and G. Wang, "An exonuclease I-based label-free fluorometric aptasensor for adenosine triphosphate (ATP) detection with a wide concentration range," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 63, pp. 311-316, 2015.
- [7] A. Lakhin, V. Tarantul, and L. Gening, "Aptamers: problems, solutions and prospects," *Acta Naturae*, vol. 5, 2013.
- [8] H. Hasegawa, N. Savory, K. Abe, and K. Ikebukuro, "Methods for Improving Aptamer Binding Affinity," *Molecules*, vol. 21, p. 421, 2016.
- [9] S. Kedzierski, M. Khoshnejad, and G. T. Caltagirone, "Synthetic antibodies: the emerging field of aptamers," *Bioprocessing J*, vol. 11, pp. 46-49, 2012.
- [10] A. Beck, E. Wagner-Rousset, D. Ayoub, A. Van Dorsselaer, and S. Sanglier-Cianférani, "Characterization of therapeutic antibodies and related products," *Analytical chemistry*, vol. 85, pp. 715-736, 2012.
- [11] H. W. Schroeder and L. Cavacini, "Structure and function of immunoglobulins," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 125, pp. S41-S52, 2010.
- [12] H. Engström, "Development of Fluorescence-based Immunosensors for Continuous Carbohydrate Monitoring: Applications for Maltose and Glucose," 2007.
- [13] C. F. Woolley, M. A. Hayes, P. Mahanti, S. D. Gilman, and T. Taylor, "Theoretical limitations of quantification for noncompetitive sandwich immunoassays," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 407, pp. 8605-8615, 2015.

-
- [14] A. H. Ng, U. Uddayasankar, and A. R. Wheeler, "Immunoassays in microfluidic systems," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 397, pp. 991-1007, 2010.
- [15] D. Wild, "The immunoassay handbook", Gulf Professional Publishing, 2005.
- [16] K. L. Cox, V. Devanarayan, A. Kriauciunas, J. Manetta, C. Montrose, and S. Sittampalam, "Immunoassay methods," 2014.
- [17] C.-C. Lin, J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, "Microfluidic immunoassays," *Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 15, pp. 253-274, 2010.
- [18] A. Bratov, J. Ramón-Azcón, N. Abramova, A. Merlos, J. Adrian, F. Sánchez-Baeza, *et al.*, "Three-dimensional interdigitated electrode array as a transducer for label-free biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, pp. 729-735, 2008.
- [19] M. González-Martínez, J. Penalva, J. Rodríguez-Urbis, E. Brunet, A. Maquieira, and R. Puchades, "Immunosensors for pollutants working in organic media. Study of performances of different tracers with luminescent detection," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 384, pp. 1540-1547, 2006.
- [20] D. Wild, "The immunoassay handbook: theory and applications of ligand binding", *ELISA and related techniques*: Newnes, 2013.
- [21] A. Frey, B. Meckelein, D. Externest, and M. A. Schmidt, "A stable and highly sensitive 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays," *Journal of immunological methods*, vol. 233, pp. 47-56, 2000.
- [22] M. Heurich, "Development of an affinity sensor for ochratoxin A," 2008.
- [23] "Cortisol Saliva ELISA Assay Kit."
- [24] A. Manz, N. Graber, and H. á. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: a novel concept for chemical sensing," *Sensors and actuators B: Chemical*, vol. 1, pp. 244-248, 1990.
- [25] L. J. Lucas, J. N. Chesler, and J.-Y. Yoon, "Lab-on-a-chip immunoassay for multiple antibodies using microsphere light scattering and quantum dot emission," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 675-681, 2007.
- [26] M. J. M. Mayoorendra'Ravichandiran, "Lab-on-a-chip technology: the future of pointof-care diagnostic ability," *Medicine and Technology*, pp. 24-26, 2011.
- [27] D. Figeys and D. Pinto, "Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences," *Analytical Chemistry*, vol. 72, pp. 330 A-335 A, 2000.

- [28] A. T. Giannitsis, "Microfabrication of biomedical lab-on-chip devices. A review," *Estonian Journal of Engineering*, vol. 17, pp. 109-139, 2011.
- [29] G. M. H. Minas, "Microsistema laboratorial para análise de fluidos biológicos," Universidade do Minho, 2004.
- [30] K. Ren, J. Zhou, and H. Wu, "Materials for microfluidic chip fabrication," *Accounts of chemical research*, vol. 46, pp. 2396-2406, 2013.
- [31] A. Bange, H. B. Halsall, and W. R. Heineman, "Microfluidic immunosensor systems," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 20, pp. 2488-2503, 2005.
- [32] S. K. Mitra and S. Chakraborty, *Microfluidics and nanofluidics handbook: fabrication, implementation, and applications* vol. 2: CRC Press, 2011.
- [33] K. Kawai, F. Yamaguchi, A. Nakahara, and S. Shoji, "Fabrication of vertical and high-aspect-ratio glass microfluidic device by borosilicate glass molding to silicon structure," in *14th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences*, 2010.
- [34] H. Becker and L. E. Locascio, "Polymer microfluidic devices," *Talanta*, vol. 56, pp. 267-287, 2002.
- [35] H. Becker and C. Gärtner, "Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 390, pp. 89-111, 2008.
- [36] P. Dey, B. Pramanick, A. RaviShankar, P. Ganguly, and S. Das, "Microstructuring of SU-8 resist for MEMS and bio-applications," *Int. J. Smart Sens. Intell. Syst*, vol. 3, pp. 118-129, 2010.
- [37] V. C. Pinto, P. J. Sousa, V. F. Cardoso, and G. Minas, "Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities," *Micromachines*, vol. 5, pp. 738-755, 2014.
- [38] A. D. Stroock and G. M. Whitesides, "Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems," *Electrophoresis*, vol. 23, pp. 3461-3473, 2002.
- [39] A. A. S. Bhagat, P. Jothimuthu, and I. Papautsky, "Photodefinable polydimethylsiloxane (PDMS) for rapid lab-on-a-chip prototyping," *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 1192-1197, 2007.
- [40] J. Kuncova-Kallio and P. J. Kallio, "PDMS and its suitability for analytical microfluidic devices," in *Engineering in Medicine and Biology Society, 2006. EMBS'06. 28th Annual International Conference of the IEEE*, 2006, pp. 2486-2489.

-
- [41] X. Li, D. R. Ballerini, and W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: current status and future trends," *Biomicrofluidics*, vol. 6, p. 011301, 2012.
- [42] A. Kakoti, M. F. Siddiqui, and P. Goswami, "A low cost design and fabrication method for developing a leak proof paper based microfluidic device with customized test zone," *Biomicrofluidics*, vol. 9, p. 026502, 2015.
- [43] A. W. Martinez, "Microfluidic paper-based analytical devices: from POCKET to paper-based ELISA," *Bioanalysis*, vol. 3, pp. 2589-2592, 2011.
- [44] Z. Gao, L. Hou, M. Xu, and D. Tang, "Enhanced colorimetric immunoassay accompanying with enzyme cascade amplification strategy for ultrasensitive detection of low-abundance protein," *Scientific reports*, vol. 4, 2014.
- [45] F. B. Myers and L. P. Lee, "Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics," *Lab on a Chip*, vol. 8, pp. 2015-2031, 2008.
- [46] B. Kuswandi, J. Huskens, and W. Verboom, "Optical sensing systems for microfluidic devices: a review," *Analytica chimica acta*, vol. 601, pp. 141-155, 2007.
- [47] F. Yang, X.-c. Li, W. Zhang, J.-b. Pan, and Z.-g. Chen, "A facile light-emitting-diode induced fluorescence detector coupled to an integrated microfluidic device for microchip electrophoresis," *Talanta*, vol. 84, pp. 1099-1106, 2011.
- [48] L. Shen, M. Ratterman, D. Klotzkin, and I. Papautsky, "A CMOS optical detection system for point-of-use luminescent oxygen sensing," *Sensors and actuators B: Chemical*, vol. 155, pp. 430-435, 2011.
- [49] H.-T. Chen and Y.-N. Wang, "Fluorescence detection in a micro flow cytometer without on-chip fibers," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 5, pp. 689-694, 2008.
- [50] E. Destandau, J.-P. Lefèvre, A. C. F. Eddine, S. Desportes, M. C. Jullien, R. Hierle, *et al.*, "A novel microfluidic flow-injection analysis device with fluorescence detection for cation sensing. Application to potassium," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 387, pp. 2627-2632, 2007.
- [51] M. Miyake, H. Nakajima, A. Hemmi, M. Yahiro, C. Adachi, N. Soh, *et al.*, "Performance of an organic photodiode as an optical detector and its application to fluorometric flow-immunoassay for IgA," *Talanta*, vol. 96, pp. 132-139, 2012.
- [52] A. Banerjee, Y. Shuai, R. Dixit, I. Papautsky, and D. Klotzkin, "Concentration dependence of fluorescence signal in a microfluidic fluorescence detector," *Journal of Luminescence*, vol. 130, pp. 1095-1100, 2010.
- [53] C. Dodeigne, L. Thunus, and R. Lejeune, "Chemiluminescence as diagnostic tool. A review," *Talanta*, vol. 51, pp. 415-439, 2000.

- [54] J. Yakovleva, R. Davidsson, A. Lobanova, M. Bengtsson, S. Eremin, T. Laurell, *et al.*, "Microfluidic enzyme immunoassay using silicon microchip with immobilized antibodies and chemiluminescence detection," *Analytical chemistry*, vol. 74, pp. 2994-3004, 2002.
- [55] O. Gustafsson, K. B. Mogensen, P. D. Ohlsson, Y. Liu, S. Jacobson, and J. P. Kutter, "An electrochromatography chip with integrated waveguides for UV absorbance detection," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 18, p. 055021, 2008.
- [56] Y. Lu, W. Shi, J. Qin, and B. Lin, "Low cost, portable detection of gold nanoparticle-labeled microfluidic immunoassay with camera cell phone," *Electrophoresis*, vol. 30, pp. 579-582, 2009.
- [57] A. Llobera, S. Demming, R. Wilke, and S. Büttgenbach, "Multiple internal reflection poly (dimethylsiloxane) systems for optical sensing," *Lab on a Chip*, vol. 7, pp. 1560-1566, 2007.
- [58] X. Guo, "Surface plasmon resonance based biosensor technique: a review," *Journal of biophotonics*, vol. 5, pp. 483-501, 2012.
- [59] T. Chinowsky, J. Quinn, D. Bartholomew, R. Kaiser, and J. Elkind, "Performance of the Spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 91, pp. 266-274, 2003.
- [60] S. Sang, "An approach to the design of surface stress-based PDMS micro-membrane biosensors," Dissertation, 2010.

4 Imobilização de anticorpos na superfície do PDMS: processamento e caracterização

Este capítulo apresenta um estudo comparativo, utilizando técnicas de caracterização, entre três métodos de imobilização de Ac na superfície do PDMS, nomeadamente, imobilização por adsorção física, imobilização orientada via Proteína A e imobilização covalente por funcionalização química. Pretende-se encontrar um revestimento de Ac sobre a superfície do PDMS que seja uniforme e estável, de modo a exibir elevada sensibilidade e precisão no imunoensaio do cortisol salivar.

4.1 Métodos de Imobilização

A seleção de um processo adequado para a imobilização de elementos biológicos numa superfície sólida mostra-se um passo crítico no desenvolvimento de um imunossensor [1]. O processo de imobilização deve garantir um revestimento eficiente do elemento biológico na superfície do transdutor mantendo intacta as suas propriedades (funcionalidade, estrutura biológica, afinidade e especificidade) bem como estabilidade durante o armazenamento [2]. A escolha do método de imobilização mais eficaz é um fator chave para que o dispositivo se torne numa ferramenta analítica válida e aplicável segundo os padrões de qualidade exigidos. Um método de imobilização específico depende de vários de fatores, incluindo a superfície de imobilização, a matriz da amostra, a propriedade da proteína e o desempenho do ensaio (por exemplo, a sensibilidade, a capacidade de reutilização, seletividade e reprodutibilidade) [1, 3]. Um método ideal deve garantir que os locais de ligação ao Ac estejam acessíveis aos seus Ag específicos bem como, após a imobilização, a sua conformação deve estar intacta para que as suas funções sejam mantidas de forma a fornecer um ensaio reprodutível e de elevado desempenho [4]. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos vários métodos de imobilização que são, principalmente, baseados em três mecanismos: adsorção física, imobilização por bioafinidade e ligação covalente (figura 4.1) [3, 5].

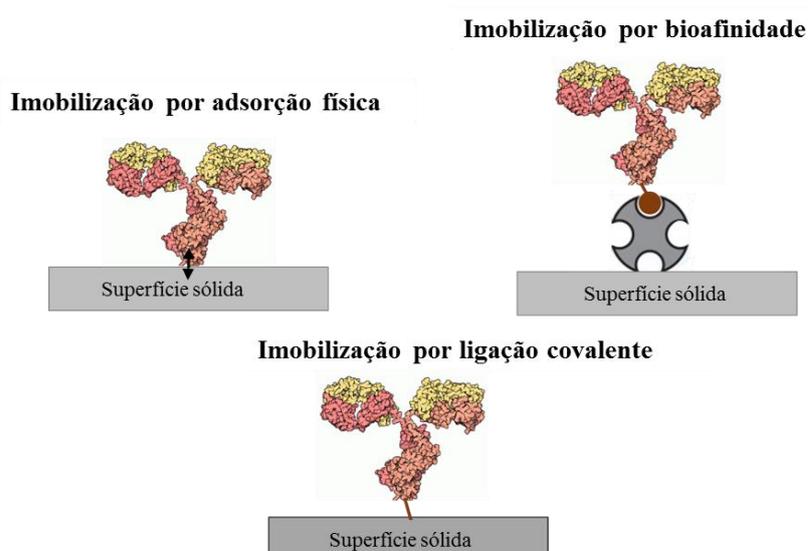


Figura 4.1 Representação esquemática dos mecanismos de imobilização em superfícies sólidas (adaptado de [3]).

4.1.1 Imobilização por adsorção física

A adsorção física é o método mais fácil para a imobilização de Ac ou proteínas sobre uma superfície sólida. Neste método, os Ac ou proteínas são incubados diretamente sobre a superfície sólida sem a necessidade de recorrer a reagentes ou modificações químicas [4]. A adsorção é feita por meio de forças intermoleculares, tais como forças electroestáticas, forças de *Van der Waals*, interações hidrofóbicas, interações por pontes de hidrogénio ou por combinação destas forças [3, 5-7]. No entanto, este método apresenta algumas desvantagens. Devido à fraca ligação, a camada de Ac adsorvidos não é muito estável quando comparada com os restantes métodos. Para além disso, este método conduz a uma baixa atividade dos Ac resultante da diminuição da capacidade de ligação ao Ag devido à orientação aleatória. Apesar destas desvantagens, este método de imobilização é ainda muito utilizado devido à sua simplicidade de execução, à não necessidade de reagentes tóxicos, ao facto de não haver procedimentos químicos sofisticados e por ser de baixo custo. Por estes motivos, é um método muito utilizado também em sistemas microfluídicos [3, 7, 8].

A imobilização por absorção física em superfícies do PDMS nativas (superfície do PDMS sem qualquer tipo de modificação) resulta, principalmente, do seu carácter hidrofóbico. Vários autores utilizaram este método de imobilização para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos em PDMS, como é o caso de Xiang *et al.* (2006) [9]. Estes autores desenvolveram um *chip* microfluídico em PDMS com um canal em forma de “H” para controlo electrocinético. Neste trabalho, um Ag de *Escherichia coli* foi adsorvido na superfície do PDMS para posterior deteção por Ac primários e secundários. Wang *et al.* (2007) [10] utilizando também este método de imobilização desenvolveram uma técnica para tornar a superfície hidrofóbica do PDMS em hidrofílica recorrendo a uma monocamada proteica (hidrofibina) adsorvida na superfície do PDMS. Estes autores utilizaram a hirofibina, que é uma proteína extraída a partir de fungos filamentosos que permite a conversão da superfície hidrofóbica para hidrofílica. De seguida, foram adsorvidos nessa monocamada proteica, IgG de frango para desenvolvimento de um imunoensaio heterogéneo. Para além destes trabalhos, outros estudos demonstraram com sucesso a utilização de adsorção física para o desenvolvimento de imunoensaios em aplicações microfluídicas [3, 11].

4.1.2 Imobilização por bioafinidade

A interação por bioafinidade ou adsorção bioespecífica baseia-se em fenómenos de ligação específicos existentes na natureza. Esta abordagem apresenta algumas vantagens em relação à adsorção física, nomeadamente, uma interação relativamente mais forte, é extremamente específica e a imobilização de Ac ou proteína é orientada [5, 11]. Este método, geralmente, é utilizado em conjunto com outros métodos (adsorção física e ligação covalente) recorrendo a moléculas de ligação entre a superfície e os Ac. Em dispositivos microfluídicos têm sido empregues várias moléculas de ligação para a imobilização de Ac. Estes incluem o complexo avidina-biotina, a proteína A e a hibridização de ADN [3, 6, 12].

A interação avidina-biotina é uma das abordagens mais utilizadas para a imobilização de Ac ou proteínas, uma vez que apresenta uma ligação não-covalente excepcionalmente forte (figura 4.2). A avidina é uma glicoproteína solúvel em soluções aquosas e é estável ao pH e à temperatura. A biotina é uma molécula pequena e a sua conjugação com proteínas não afeta significativamente a conformação ou funcionalidade da proteína. A ligação entre a avidina e biotina é rápida e pouco afetada pelo pH, temperatura, solventes orgânicos, proteólise e outros agentes desnaturantes [5]. Este método baseia-se na elevada afinidade da molécula tetravalente avidina com a molécula biotina. Esta afinidade é muito superior à do Ac com o Ag, sendo por isso muito estável a formação de complexos avidina-biotina. Para além disso, estas moléculas podem ser conjugadas covalentemente com Ac ou com outros marcadores originando uma elevada sensibilidade nos imunoensaios [2]. Normalmente, a molécula conjugada com o Ac é a biotina pois apresenta um tamanho reduzido, sendo possível conjugar diversas moléculas de biotina num único Ac. Na imobilização de Ac através da interação avidina-biotina, tanto a biotina como a avidina podem ser ligadas a uma variedade de superfícies. A avidina liga-se à superfície por adsorção física ou por ligação covalente, para posterior imobilização dos Ac ou proteínas biotiniladas. Em alguns casos, inicialmente, a biotina é adsorvida na superfície, à qual se liga a avidina para posterior imobilização de Ac biotinilados formando, assim, uma multicamada biotina/avidina/biotina. Apesar de ser um método bastante promissor tem como desvantagem o elevado custo dos reagentes [2, 3].

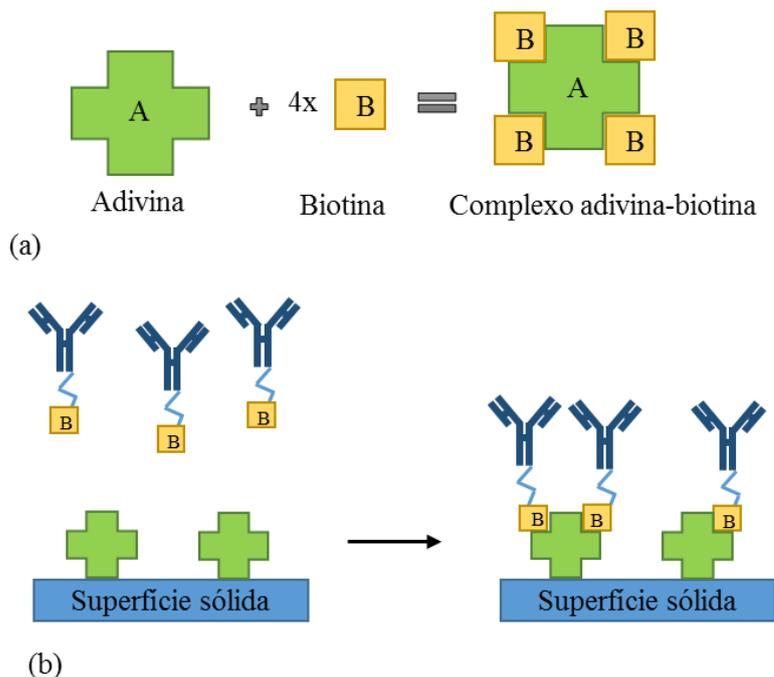


Figura 4.2 Representação esquemática: (a) interação adivina-biotina e (b) imobilização de Ac por bioafinidade utilizando o complexo adivina-biotina (adaptado de [13]).

Outra molécula de ligação muito utilizada é a Proteína A (proteína extraída a partir de bactérias) que é conhecida como reagente imobilizante de IgG (figura 4.3). Esta proteína liga-se especificamente à região Fc de IgG, assegurando que o local de ligação no Ac, localizado na região variável de Fab, permanece bem acessível para a ligação com o Ag [4, 14, 15]. Para além disso, a utilização da proteína A permite a reutilização da superfície pela separação dos Ac da proteína A através de tratamentos com ácido. No entanto, esta proteína apenas se liga a algumas classes de Ac sendo, assim, um método de imobilização limitado ao tipo de molécula a imobilizar [3, 14].

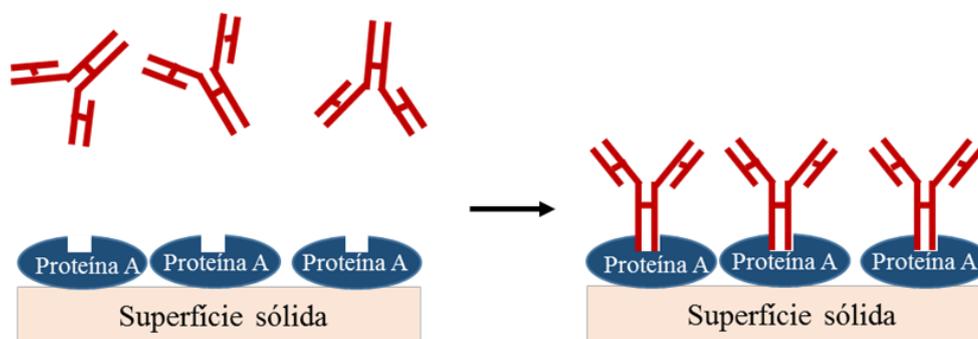


Figura 4.3 Representação esquemática da imobilização de Ac utilizando proteína A (adaptado de [16]).

A hibridização de ADN tem, também, sido utilizada para imobilização de proteínas. Este método baseia-se na hibridação de ADN de cadeia simples (ADNcs) com o ADN complementar. A proteína a ser imobilizada é inicialmente acoplada ao ADNcs que vai hibridizar com o ADNcs complementar previamente funcionalizado na superfície (figura 4.4), permitindo assim a imobilização da proteína [12, 17]. Este método apresenta elevada estabilidade e seletividade, e a imobilização pode ser reversível por controlo da temperatura ou desnaturação alcalina. No entanto, a presença de nucleases nas amostras pode degradar o ADN limitando a sua utilização. Para além disso, é um método complexo e de elevado custo [5].

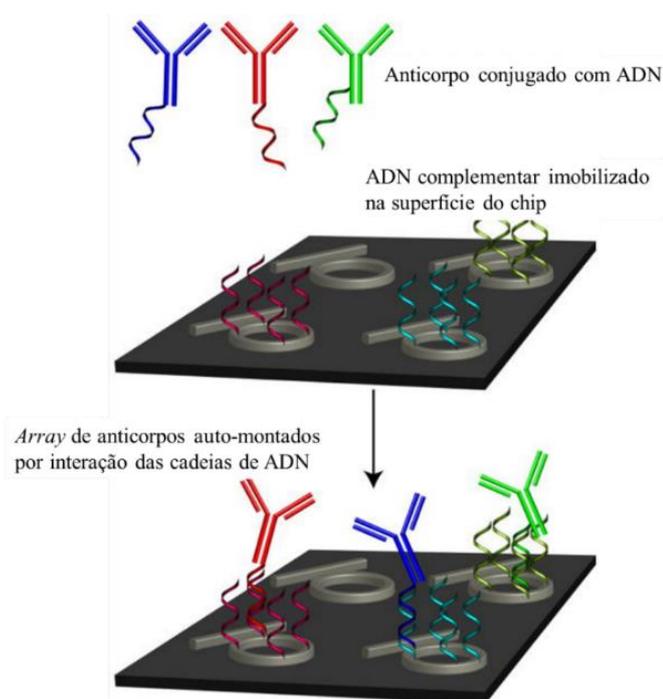


Figura 4.4 Imobilização de Ac na superfície sólida através da utilização de ADN. Os Ac são conjugados covalentemente com ADN para posterior ligação ao ADN complementar funcionalizado na superfície do *chip* (adaptado de [17]).

4.1.3 Imobilização por ligação covalente

A ligação covalente é um mecanismo de imobilização frequentemente utilizado em ensaios microfluídicos. Nesta abordagem, as superfícies são ativadas para formar grupos funcionais que interagem com os grupos funcionais dos Ac ou das proteínas estabelecendo

ligações estáveis e irreversíveis formando uma distribuição uniforme com elevada densidade sobre a superfície. As desvantagens da imobilização por ligação covalente incluem reduzida atividade dos Ac ou das proteínas devido à possibilidade de formação de ligação nos locais ativos dos Ac ou das proteínas e, por vezes, necessita de química complicada. Os grupos funcionais das superfícies são formados recorrendo a tratamentos químicos [2, 3].

Existe uma enorme variedade de abordagens para ligações covalente, contudo, as mais utilizadas requerem a formação de grupos funcionais na superfície, tais como grupos amina ($-NH_2$), grupos tiol ($-SH$), grupos carboxílicos ($-COOH$) ou grupos epóxidos (figura 4.5) [3, 5, 7].

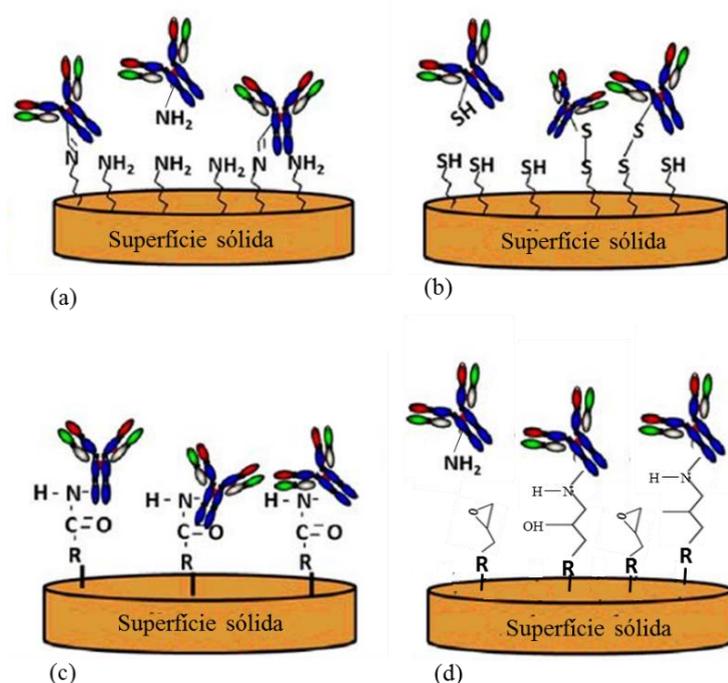


Figura 4.5 Representação esquemática da imobilização covalente por funcionalização da superfície sólida com: (a) grupos amina, (b) grupos tiol, (c) grupos carboxílicos e (d) grupos epóxidos (adaptado de [7]).

A imobilização covalente através de grupos funcionais amina é a abordagem mais utilizada para a imobilização de Ac. Os grupos aminos estão presentes nos resíduos lisina dos Ac com grande abundância no seu exterior. As principais abordagens para a imobilização envolvendo grupos aminos podem ser feitas recorrendo à interação amina-N-

hidroxisucinimida (NHS) ou amina-aldeído [3]. O NHS é um composto habitualmente utilizado para ligações com grupos amina formando ligações de amida estáveis. Nesta abordagem as proteínas têm de ser dissolvidas numa solução tampão de força-iônica e adicionadas sobre a superfície funcionalizada com grupos amina. O éster do NHS reage com os grupos nucleófilos das proteínas criando uma ligação amida forte. A eficiência de imobilização depende de um número de parâmetros, nomeadamente, do pH, da concentração, da força iônica e do tempo de reação. Para além disso, as condições devem ser otimizadas para cada tipo de proteína [2, 5].

Uma alternativa a esta estratégia é a interação amina-aldeído que leva à formação da base de *Schiff*. A interação base de *Schiff* pode ser estabilizada pela redução com NaCNBH_3 ou NaBH_4 criando uma ligação de amina secundária estável. O glutaraldeído (GA) é um composto bis-aldeído que tem duas extremidades reativas. Este composto pode reticular dois grupos funcionais de amina, por exemplo, entre duas proteínas ou entre uma proteína e uma superfície funcionalizada com grupos amina. A reticulação por GA apresenta elevada estabilidade pela formação da base de *Schiff* simples, sem necessidade de redução [3, 18]. Quando é utilizada uma superfície de vidro ou de silício são utilizados compostos aminossilanos, como APTES (3-aminopropiltriétoxissilano). Estes compostos ligam-se aos grupos funcionais hidroxilos do vidro introduzindo grupos funcionais de amina que facilitam a ligação covalente com os Ac [19]. Vários autores têm utilizado esta abordagem para a imobilização de proteínas na superfície do PDMS. Chuah *et al.* (2015) [20] utilizaram este método para imobilizar covalentemente células do colagénio tipo 1 (Col1) em superfícies de PDMS para funcionar como suporte de adesão de células-tronco mesenquimais (MSCs do inglês *mesenchymal stem cells*). O objetivo deste trabalho foi estudar a adesão destas células a longo prazo e a estabilidade durante várias semanas sobre a superfície do PDMS modificada com APTES+GA+proteína para posterior aplicação em engenharia de tecidos. A principal aplicação das MSCs é a diferenciação de células estaminais, para posterior utilização na regeneração óssea. Além disso, as MSCs têm sido recentemente exploradas para desenvolver folhas contínuas de células como uma estratégia alternativa para beneficiar a engenharia de tecidos à base de células estaminais. Este estudo comprovou que a adesão de MSC apresentou uma melhoria significativa em superfícies do PDMS modificadas com APTES + GA + proteína, mostrando ser um método bastante promissor para gerar plataformas biocompatíveis para adesão celular estável. Yu *et al.* (2007) [21] utilizaram

também este método de imobilização covalente em superfícies do PDMS para o desenvolvimento de imunoenaios com formato não-competitivo. Estes investigadores utilizaram uma camada intermediária de álcool polivinílico (PVA do inglês *poly(vinyl alcohol)*) para tornar a superfície do PDMS hidrofílica reduzindo a adsorção não-específica. Para isso, silanizaram com APTES a superfície do PDMS tratada com plasma de O₂ para introduzir os grupos amina. Os grupos amina foram ativados com GA para se ligarem ao PVA (através dos grupos hidroxílicos do PVA). De seguida, utilizaram novamente o GA para ligar covalentemente proteínas, tais como, IgM, albumina sérica bovina (BSA do inglês *bovine serum albumin*) e IgG. Este estudo foi comparado com o PDMS nativo mostrando uma melhoria significativa nas superfícies do PDMS tratado devido à baixa adsorção não-específica e à elevada capacidade de ligação de Ac.

A ligação a partir dos grupos amina nos resíduos de lisina dos Ac é a forma mais utilizada na imobilização covalente. Contudo, em certas circunstâncias, nomeadamente na imobilização covalente a partir de grupos tiol, podem ser preferidas estratégias alternativas. A imobilização de Ac nesta abordagem, baseia-se na ligação destes grupos aos resíduos de cisteínas através de ligações de dissulfeto. Apesar de esta ligação fornecer melhor orientação do que a dos grupos aminas é menos provável que ocorra, uma vez que as cisteínas dos Ac são menos abundantes [2, 4].

A imobilização covalente via grupos carboxílicos é outra técnica de grande interesse que tem sido muito utilizada [3, 22]. Nesta abordagem, é utilizada a carbodiimida para formar ligações amida entre carboxilatos e aminas. O EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) é a carbodiimida mais utilizada. Este composto reage com os grupos carboxílicos formando o intermediário O-acilisourea, o qual vai reagir com aminas primárias para formar uma ligação de amida. O EDC tem a vantagem de ser facilmente solúvel em água e pode ser utilizado diretamente com a proteína em tampão aquoso, ao contrário do NHS que tem de ser dissolvido em solvente orgânico. Se o intermediário O-acilisourea não encontrar uma amina, vai ocorrer a sua hidrolisação e regeneração ao grupo carboxilo. Na presença de N-hidroxisulfosucinimida (Sulfo-NHS), o EDC converte os grupos carboxílicos a éster Sulfo-NHS amina-reativo, aumentando assim a eficiência das reações mediadas pelo EDC. Assim, o EDC é normalmente utilizado em conjunto com o Sulfo-NHS ou NHS para a imobilização covalente de Ac [2, 18].

Outra alternativa para a imobilização covalente é a utilização de epóxios [23]. Uma epóxi pode reagir com vários grupos nucleófilos, tais como aminas primárias, grupos sulfídricos ou grupos hidroxilos criando ligações de amins secundárias, tioéter ou éter, respetivamente (figura 4.6). A epóxi mais utilizada para a imobilização de proteínas é a glicedil [3, 24, 25]. Apesar de ocorrerem reações covalentes entre as proteínas e as epóxios, estas são extremamente lentas [5, 18].

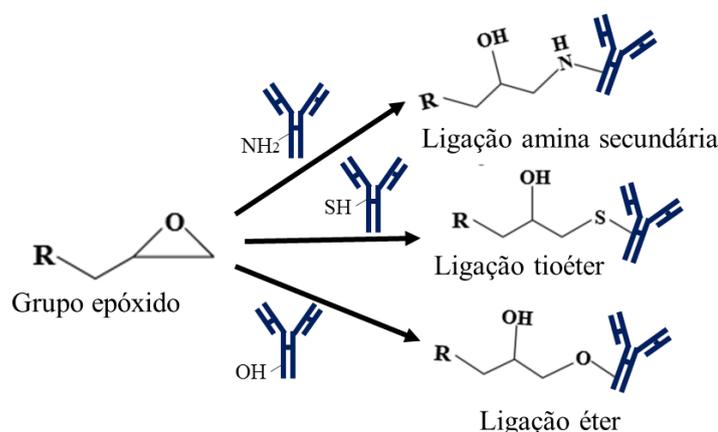


Figura 4.6 Tipo de ligações mediadas por grupos epóxidos (adaptado de [18]).

4.1.4 Considerações práticas

A questão de qual o método considerado como o mais adequado ainda está em aberto, uma vez que está dependente do tipo de superfície a imobilizar e da molécula a ser imobilizada. O material escolhido para o desenvolvimento do imunossensor microfluídico foi o PDMS devido às suas inúmeras vantagens, tal como descrito no capítulo 3 secção 3.3. A quantificação de cortisol foi baseada num imunoensaio competitivo (capítulo 3 secção 3.1.2.). Portanto, o objetivo da presente tarefa é estudar diferentes métodos de imobilização de Ac (IgG) sobre a superfície do PDMS, a fim de desenvolver um imunossensor microfluídico para a deteção e quantificação de cortisol salivar com elevada estabilidade e sensibilidade. A escolha dos métodos de imobilização a serem estudados baseou-se em métodos simples, eficientes e de baixo custo, adequados para serem aplicados em dispositivos microfluídicos [26]. Desta forma, foram comparadas três estratégias de imobilização de Ac

na superfície do PDMS. Estas incluem, imobilização por adsorção física, imobilização utilizando Proteína A e a imobilização covalente por funcionalização química da superfície do PDMS (métodos teoricamente descritos nas secções anteriores). Em resumo, a adsorção física é o método de imobilização mais fácil sendo por esse motivo muito utilizado para o desenvolvimento de sistemas microfluídicos. A Proteína A apresenta elevada especificidade pela classe IgG e, para além disso, liga-se especificamente à região Fc dos Ac permitindo uma orientação correta. A imobilização covalente é o método preferido para ligação de Ac a uma superfície sólida, uma vez que conduz a uma ligação forte e irreversível, e proporciona uma elevada densidade de Ac sobre a superfície. A imobilização covalente entre grupos funcionais de amina é a abordagem mais comum para a imobilização dos Ac devido à existência de amina nos resíduos de lisina na parte exterior dos Ac com grande abundância. Assim, neste trabalho a imobilização covalente estudada baseou-se na silanização do PDMS com APTES para introdução de grupos amina e reativação com grupos aldeídos que permite a ligação covalente entre as aminas dos Ac e da superfície do PDMS. Neste último método utilizaram-se Ac de revestimento (Ac policlonal de cabra anti-IgG de coelho) específicos para a região Fc dos Ac de captura (IgG anti-cortisol) de modo a melhorar a sua orientação.

As três estratégias de imobilização de Ac na superfície do PDMS foram comparadas através de diferentes técnicas de caracterização com o intuito de encontrar o método de imobilização mais eficiente, nomeadamente, no que diz respeito à distribuição uniforme e à orientação correta dos Ac imobilizados, de forma a exibir um aumento da sensibilidade e precisão do imunoensaio. Foi ainda estudada a estabilidade de armazenamento dos métodos de imobilização tendo em vista a sua viabilidade de utilização em dispositivos a longo prazo. Estes estudos encontram-se descritos nas secções seguintes.

4.2 Imobilização dos Ac na superfície do PDMS

A imobilização dos Ac na superfície do PDMS foi estudada através das três abordagens apresentadas anteriormente utilizando Ac policlonal de cabra anti-IgG de coelho (Ac de revestimento) para a imobilização covalente e IgG anti-cortisol (Ac de captura) para imobilização por adsorção física e por bioafinidade. Todos os testes experimentais foram

realizados à temperatura ambiente e em poços de PDMS (figura 4.7). Os poços de PDMS foram obtidos através de um molde em acrílico e preparados pela mistura do pré-polímero e do agente de cura na proporção de 10:1 e curado a 80°C durante 2 h (a descrição pormenorizada do fabrico das estruturas em PDMS encontra-se no capítulo 5, secção 5.4.2.3. e é a mesma para os poços e para o dispositivo microfluídico apresentado no capítulo 5).

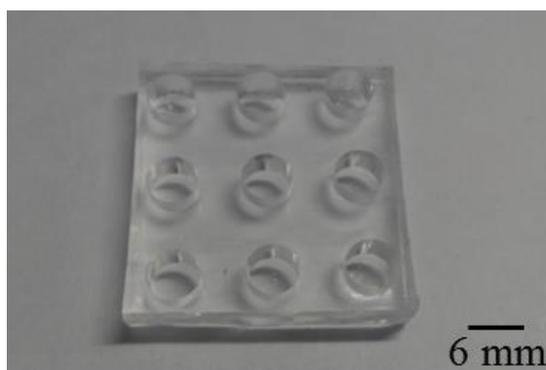


Figura 4.7 Poços em PDMS com 6 mm de diâmetro e 3 mm de espessura.

4.2.1 Ac immobilizados por adsorção física

A adsorção física é o método mais simples para a imobilização de Ac sobre uma superfície sólida em PDMS (figura 4.8). Nesta abordagem, os Ac foram incubados diretamente sobre a superfície do PDMS durante a noite (cerca de 12 h) após o qual esta superfície foi lavada com PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) para remover os Ac em excesso.



Figura 4.8 Representação esquemática do método de imobilização por adsorção física de Ac sobre PDMS nativo.

4.2.2 Ac imobilizados por bioafinidade utilizando Proteína A

Neste método de imobilização, os Ac foram imobilizados na superfície do PDMS utilizando a proteína A como ligante de imobilização de Ac (figura 4.9), como é relatado por Eteshola e Leckband (2001) [27]. A superfície do PDMS (figura 4.9a) foi inicialmente revestida com BSA (1 mg/mL) para bloquear a adsorção não-específica de proteínas (figura 4.9b), uma vez que o PDMS é hidrofóbico. A solução de BSA foi adicionada sobre a superfície do PDMS durante 2 h e posteriormente lavada com PBS para remover a BSA em excesso. Em seguida, a superfície do PDMS foi reativada com 2,5% de GA em PBS (figura 4.9c) durante 1h e lavada com PBS para remover o excesso e posteriormente seca com ar de azoto. A proteína A foi adicionada à superfície do PDMS reativada com GA ligando-se covalentemente (figura 4.9d). Subsequentemente, os Ac foram ligados covalentemente à proteína A por incubação, durante a noite (figura 4.9e), e lavados com PBS para remover o excesso de Ac.

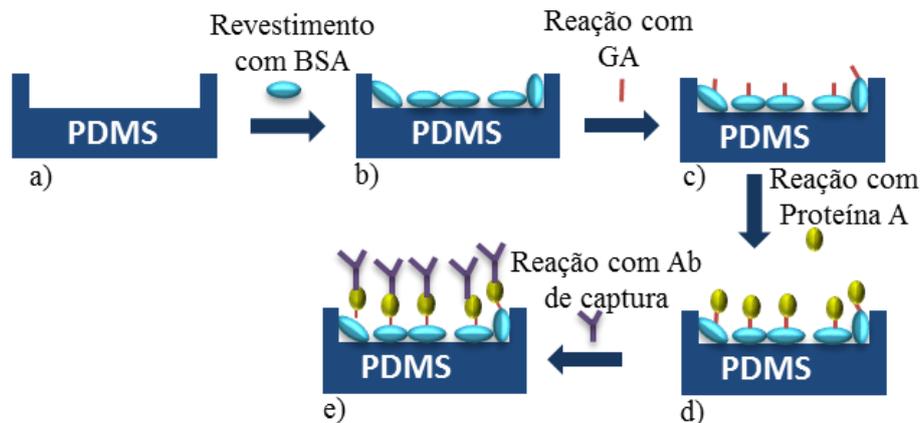


Figura 4.9 Imobilização de Ac utilizando Proteína A.

4.2.3 Ac imobilizados por ligação covalente com funcionalização química

O método proposto para a imobilização covalente de Ac utilizando funcionalização química encontra-se ilustrado na figura 4.10. Em primeiro lugar, o PDMS (Figura 4.10a) foi ativado com plasma de O₂ durante 60 s a 100 W e a uma pressão de 0,6 mbar (sistemas de plasma *ZEPTO*, *Diener electronic*) para modificação da superfície tornando-a hidrofílica

(figura 4.10b). Esta alteração ocorre devido ao aparecimento de grupos $-\text{Si}(\text{OH})_x$ na superfície do PDMS [20]. Em seguida, adicionou-se imediatamente uma solução aquosa de APTES diluída em etanol absoluto que reage com os grupos hidroxilos existentes no PDMS tratado com plasma, produzindo assim grupos amina na sua superfície (Figura 4.10c). As amostras de PDMS foram lavadas com uma solução de etanol de 96% para remover a solução de APTES em excesso e foram secas com um fluxo de azoto. De seguida, o PDMS tratado com APTES foi incubado a 80°C num forno de vácuo (figura 4.11) durante 2 h. É de notar que as condições ótimas, especialmente a concentração APTES e o tempo de incubação da solução de APTES na superfície do PDMS, foram estudados através de um ensaio de fluorescamina e por transmitância (descrito na secção 4.4.1.). Além disso, a superfície do PDMS funcionalizada com os grupos amina foi estudada utilizando FTIR para provar a presença desses grupos amina (descrito na secção 4.4.1.).

A superfície do PDMS funcionalizado com os grupos amina foi reativada com 2,5% de GA em PBS durante 1 h à temperatura ambiente (figura 4.10d) e, de seguida, foi lavada com PBS e seca com fluxo de azoto. O GA atuou como um agente de reticulação homobifuncional entre os grupos amina na superfície do PDMS e os Ac. Finalmente, os Ac de revestimento foram imobilizados na superfície do PDMS por incubação durante a noite (figura 4.10e).

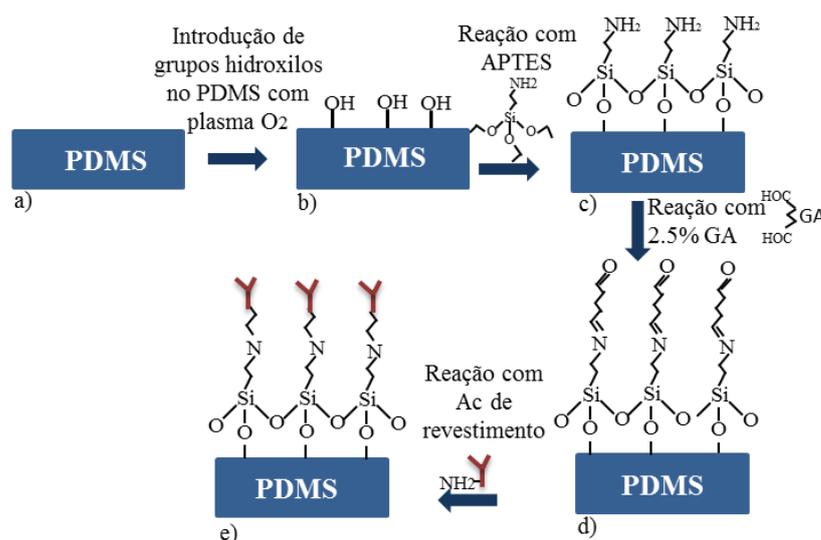


Figura 4.10 Representação esquemática do método de imobilização covalente por funcionalização química da superfície PDMS com grupos amina (adaptado de [28]).



Figura 4.11 Fotografia do forno de vácuo.

4.3 Técnicas utilizadas para caracterização da superfície do PDMS

Nas secções seguintes descrevem-se as várias técnicas utilizadas para caracterizar as superfícies do PDMS (PDMS nativo e PDMS funcionalizado) imobilizadas com os Ac pelos três métodos descritos anteriormente. Este procedimento permitiu encontrar um revestimento de Ac o mais uniforme e estável possível, de forma a exibir um aumento da sensibilidade e precisão do imunoensaio. As amostras caracterizadas não apresentavam qualquer tipo de contaminações, uma vez que foram previamente limpas de forma adequada para não afetar os resultados e foram devidamente armazenadas após o seu fabrico. Durante todas as análises foram escolhidas amostras ou zonas da amostra representativas da situação a ser analisada (pequenas porções de amostra para análise, por exemplo, no AFM), com o intuito de evitar alterações que possam resultar em avaliações equivocadas. Todos os testes de caracterização foram realizados à temperatura ambiente.

4.3.1 Microscopia de força atômica

A microscopia de força atômica (AFM do inglês *atomic force microscopy*) é uma técnica que permite o mapeamento da superfície de um material (polímeros, cerâmicos,

compósitos, vidro e amostras biológicas) em três dimensões, com uma resolução espacial que se aproxima das dimensões atômicas. O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na medição da força (repulsiva ou atrativa) entre a superfície da amostra e uma ponta (ponta fina com altura na ordem dos micrómetros e diâmetros inferiores a 100 Å) integrada num braço de suporte com 100 a 200 µm de comprimento. À medida que a ponta se desloca sobre a superfície da amostra, os átomos da ponta interagem com os átomos da superfície provocando a deflexão do braço. Esta deflexão é detetada por um sistema ótico [29, 30].

Neste trabalho, a análise AFM realizada no equipamento *NanoScope IIIA da Digital Instruments*, permitiu examinar a conformação e a distribuição dos Ac imobilizados sobre a superfície do PDMS tratado com os diferentes métodos de imobilização, bem como caracterizar quantitativamente a imobilização na superfície sólida através da alteração da rugosidade. As topografias de superfícies de todas as amostras de PDMS foram obtidas a partir de um varrimento com uma área de 5 × 5 µm² recorrendo à plataforma *Multimode* controlada por um *Nanoscope III*, ambos da *Veeco*, no modo de contacto intermitente.

4.3.2 Espectroscopia de luz Ultra-Violeta/Visível (UV/Vis)

A espectroscopia é um método de deteção ótico que se baseia na medição de absorção da radiação eletromagnética utilizada para identificar biomoléculas (estrutura e/ou concentração) ou medir a transmitância de uma determinada amostra. O equipamento responsável por esta análise (espectrofotómetro) é composto por uma fonte de luz (normalmente uma lâmpada com um largo espectro electromagnético UV/Vis), um monocromador, que permite separar o feixe de luz nos seus comprimentos de onda constituintes, e um fotodetector que regista a intensidade de luz transmitida através da amostra. O seu princípio de funcionamento baseia-se na emissão de uma luz monocromática que atravessa uma amostra, onde parte da radiação incidente é absorvida e outra parte é transmitida (figura 4.12). Desta forma, a transmitância (T) resulta da razão entre a intensidade de luz transmitida e a intensidade de luz incidente num comprimento de onda específico [31],

$$T = \frac{I_T}{I_0} \quad (4.1)$$

onde I_T e I_0 são a intensidade de luz transmitida e incidente, respetivamente. A intensidade I_0 diminui à medida que atravessa a amostra de espessura d de coeficiente de absorção ótico α , resultando numa I_T representada por,

$$I_T = I_0^{-\alpha d} \quad (4.2)$$

Por sua vez, a absorção da radiação pela amostra (A) é definida por

$$A = -\log T \quad (4.3)$$

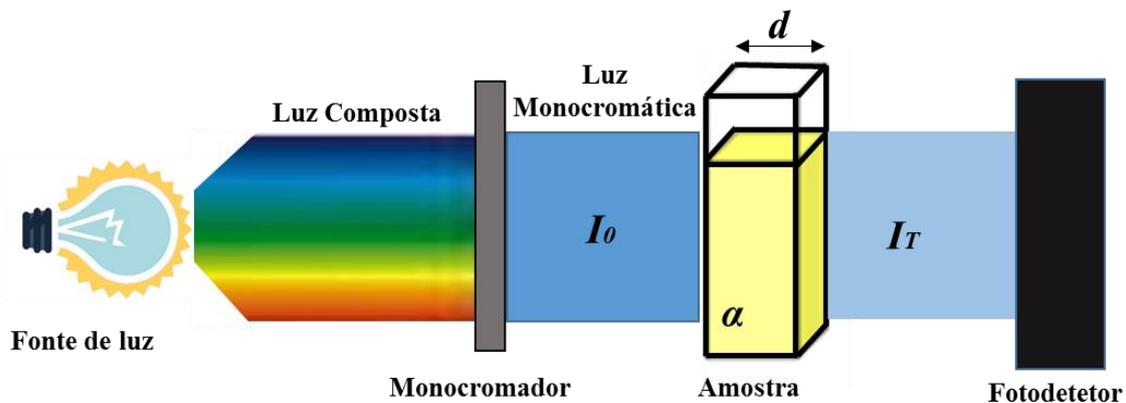


Figura 4.12 Representação esquemática dos principais constituintes de um espectrofotómetro (adaptado de [31]).

No âmbito deste trabalho, as medições de transmitância e absorção ótica das amostras de PDMS foram obtidas utilizando um espectrofotómetro composto por: uma lâmpada de 200 W de quartzo/tungsténio/halogéneo (*Newport NRC-6334NS*), como fonte de luz; um monocromador (*Newport 74125*); uma fibra ótica (*Newport Standard Grade FS Fiber Optic*), utilizada para direcionar a luz para a caixa que contém o fotodetector (fotodíodo comercial da *Hamamatsu* referência S1336-5BQ); e um picoamperímetro (*Keithley 487*) para medir a corrente do fotodíodo (figura 4.13). O monocromador bem como o picoamperímetro foram ligados a um computador através de uma interface GPIB para controlar e recolher os dados. A interface gráfica com o utilizador foi desenvolvida em *LabView* permitindo, assim uma fácil utilização de todo o sistema.

Esta técnica de caracterização permitiu quantificar os Ac imobilizados na superfície do PDMS utilizando os diferentes métodos de imobilização bem como quantificar o cortisol marcado com HRP. Para além disso, foi utilizada para medir a transmitância das amostras de PDMS tratadas com diferentes diluições da solução de APTES.

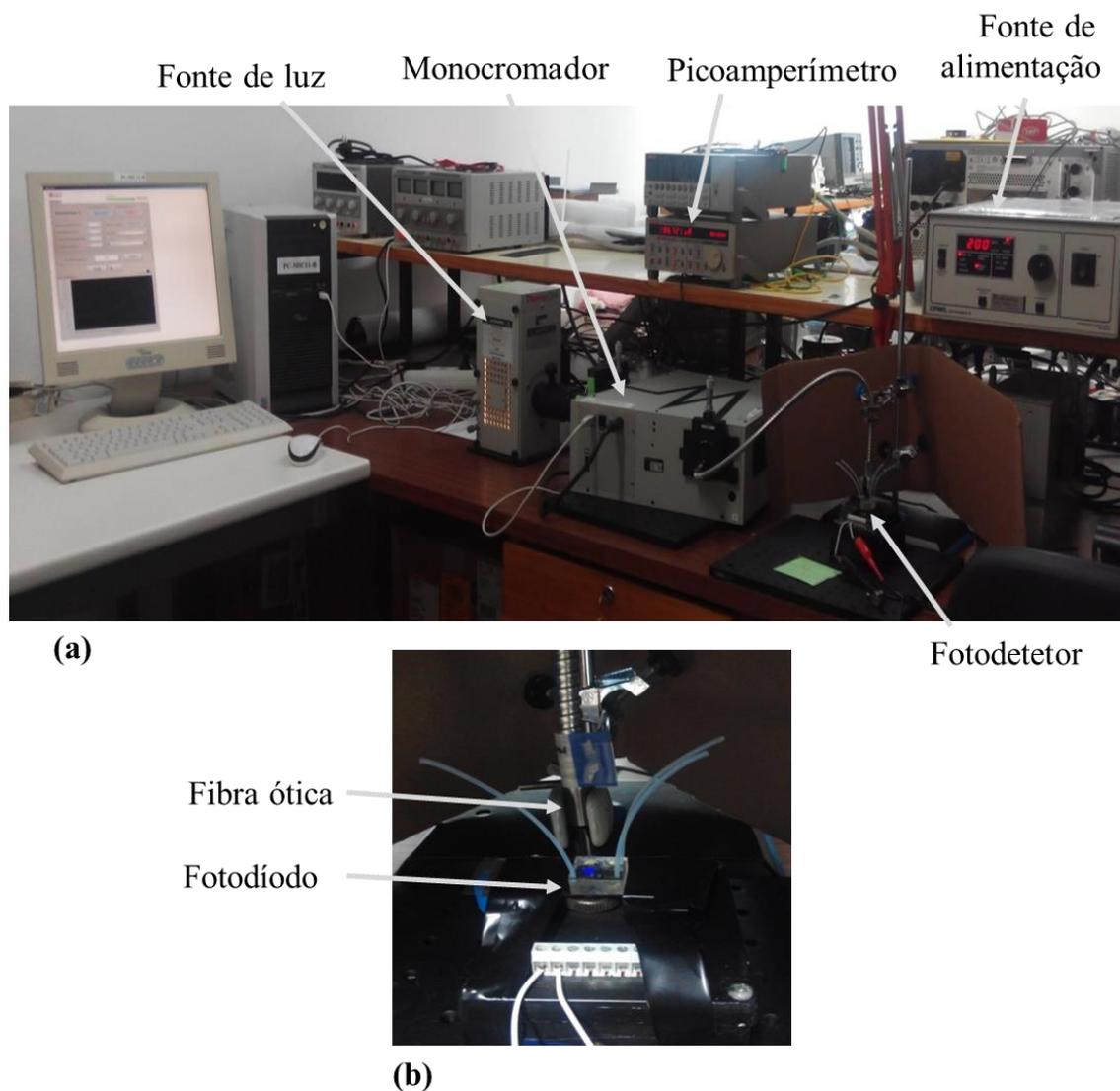


Figura 4.13 Setup utilizado para as análises espectrofotométricas.

4.3.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR do inglês *Fourier transform infrared spectroscopy*) é uma técnica capaz de fornecer informações

particularmente significativas em relação ao estado químico da superfície do um material a ser estudado. Esta técnica identifica estruturas e componentes moleculares específicos através da produção de um espectro de infravermelhos (IV). O espectro IV é obtido pela absorção de vários comprimentos de onda de radiação IV que estão bem correlacionadas com as ligações químicas de grupos funcionais características de uma molécula [32].

No âmbito deste trabalho, o FTIR foi utilizado para verificar a presença de grupos amina na superfície do PDMS tratado com APTES. Os espectros FTIR foram obtidos num intervalo compreendido entre os 600 - 4000 cm^{-1} com uma resolução de 8 cm^{-1} utilizando o equipamento *FT/IR-4100* da *JASCO*. Para cada amostra realizou-se 64 varrimentos apresentando-se a média dos valores obtidos.

4.3.4 Ensaio de fluorescamina

A fluorescamina é um composto sintético que reage com aminas primárias produzindo um fluoróforo que pode ser quantificado a 480 nm quando excitado a 395 nm (figura 4.14). A sua reação com as aminas é quase instantânea à temperatura ambiente, resultando num produto de reação extremamente fluorescente. O reagente e o produto de degradação são não-fluorescentes. Assim, a intensidade do fluoróforo é proporcional à quantidade de grupos amina presentes na amostra a analisar [33, 34].

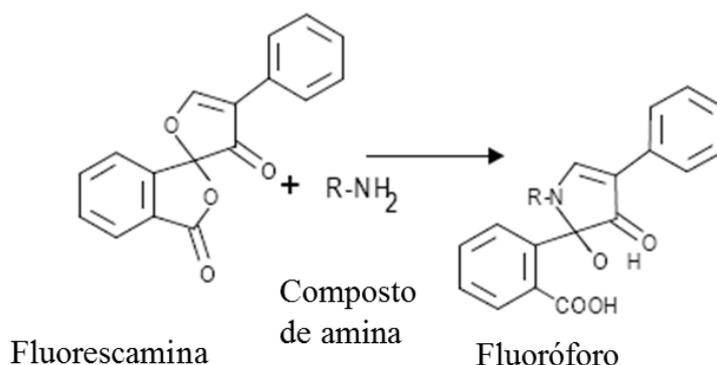


Figura 4.14 Representação esquemática do ensaio de fluorescamina (adaptado de [34]).

Neste trabalho, o ensaio de fluorescamina foi utilizado para quantificar a densidade de grupos de amina presentes na superfície do PDMS tratado com APTES, segundo o protocolo descrito na secção 4.4.1. A intensidade de fluorescência emitida pelas amostras de PDMS tratada com APTES foi medida utilizando a fonte de luz e o monocromador descrito na secção 4.3.2, excitando a amostra a 390 nm, e colocando um filtro ótico passa-banda estreita centrado a 485 nm sobre o fotodíodo posicionado a 90° da excitação.

4.3.5 Medição do ângulo de contacto

O carácter hidrofóbico ou hidrofílico de uma superfície é caracterizado através do método da gota sessil. Neste método, deposita-se uma gota líquida sobre uma superfície perfeitamente nivelada através de uma micro-seringa. O ângulo de contacto, formado entre a linha tangente à interface líquido/vapor e a linha tangente à superfície sólida, é medido por um goniómetro com um subsistema ótico integrado, para captura do perfil da gota. O ângulo de contacto é influenciado pela energia de superfície, dando, assim, informação sobre a hidrofobicidade da superfície sólida. Quanto maior o ângulo de contacto, mais hidrofóbico é o material, material este caracterizado por pouca molhabilidade, por fraca adesão e por baixa energia de superfície. Por outro lado, numa superfície hidrofílica a gota espalha-se pela superfície apresentando um ângulo de contacto pequeno. Uma superfície hidrofílica é caracterizada por uma boa molhabilidade e elevada energia de superfície.

No âmbito deste trabalho, a medição do ângulo de contacto foi utilizada para estudar o carácter hidrofílico do PDMS após tratamento com plasma e com APTES. O carácter hidrofóbico da superfície do PDMS apresenta-se como uma desvantagem que pode levar à adsorção não-específica de proteínas e, conseqüentemente, dificultar a sua aplicação em sistemas de quantificação de analitos. Normalmente, a prevenção da ligação não-específica é feita recorrendo a métodos de adsorção física utilizando proteínas de bloqueio ou através de métodos de modificação da superfície, como plasma de O₂. O plasma de O₂ gera espécies reativas oxidadas na superfície do PDMS (Si-OH), sendo estas muito importantes para a ligação covalente do APTES através da ligação SiO_x-NH₂. Assim, o ângulo de contacto apresentado pela superfície do PDMS é de extrema importância para comprovar a oxidação da superfície e a modificação do carácter hidrofóbico para hidrofílico, sendo desejáveis

baixos ângulos de contacto. Esta modificação da superfície permite uma ligação seletiva de biomoléculas (como Ac ou enzimas).

As medições do ângulo de contacto foram efetuadas recorrendo ao sistema *Data Physics OCA 20* utilizando água ultrapura como líquido. Com auxílio de uma micro-seringa foi depositada uma gota com um volume de 0,3 μL na superfície do PDMS. A imagem da gota foi capturada por um sistema ótico e tratada pelo *software SCA20* que calcula os ângulos de contacto. A medição do ângulo de contacto em cada amostra foi feita em triplicado, sendo que os resultados apresentados são a média em cada amostra.

4.4 Resultados experimentais

4.4.1 Caracterização da superfície do PDMS funcionalizada com grupos amina

Para o método de imobilização retratado na secção 4.2.3. foi necessário estudar a melhor concentração de APTES e o tempo ótimo de incubação da solução de APTES na superfície do PDMS, assim como, seguidamente, comprovar a presença dos grupos amina nessa superfície, antes de concluir algo sobre esse método de imobilização. Para tal, foram inicialmente definidos os tempos de incubação e a concentração de APTES ótimos para a silanização do PDMS (introdução de grupos amina). Para isso, estudou-se diferentes concentrações de APTES diluído em etanol absoluto (75, 50 e 10% v/v). Os tempos de incubação testados foram 10, 20, 30, 60, e 90 min. Depois da reação, o PDMS foi lavado duas vezes com etanol a 96% para remover o APTES em excesso e incubado no forno de vácuo durante 2 h a 80°C. A concentração ótima de APTES foi alcançada utilizando o ensaio de fluorescamina que permitiu quantificar a densidade de grupos amina na superfície do PDMS. Nesta experiência, as superfícies de PDMS tratadas com as diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação de APTES foram incubadas com 100 μL de solução fluorescamina/acetona numa concentração de 1 mg/mL durante 5 min. A intensidade da fluorescência emitida da superfície do PDMS tratada com diferentes concentrações de APTES foi medida (figura 4.15) e os resultados encontram-se na figura 4.16 [28]. O valor dessa intensidade é diretamente proporcional à concentração de grupos amina.

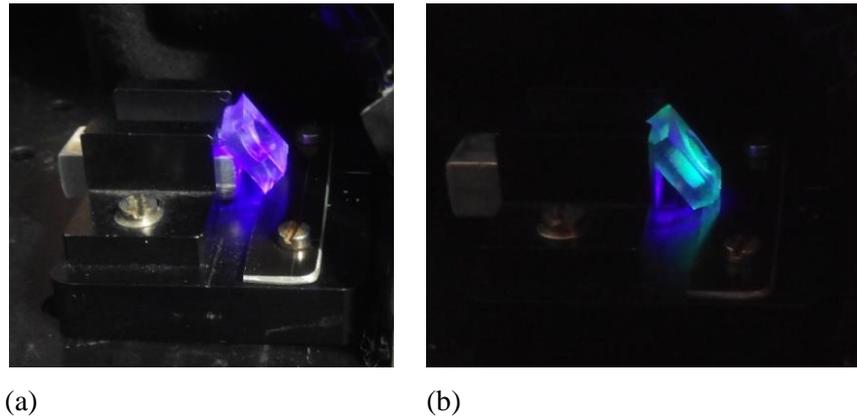


Figura 4.15 Ensaio de fluorescamina em poços de: (a) PDMS não tratado com APTES e (b) PDMS tratado com APTES.

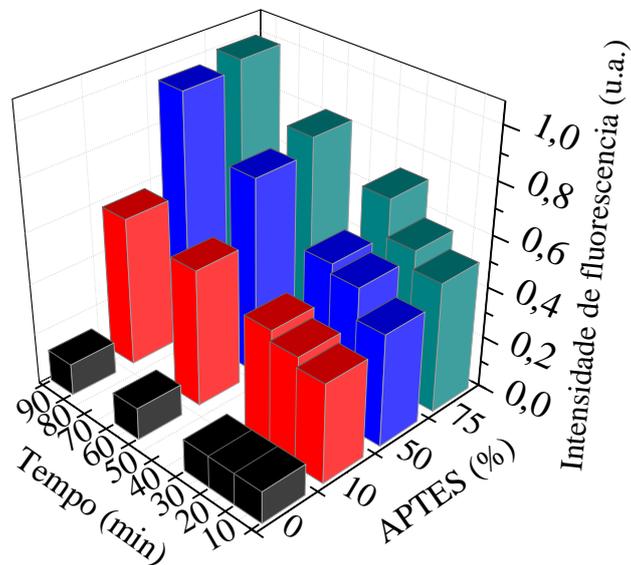


Figura 4.16 Medição da fluorescência para obtenção da concentração de grupos amina na superfície do PDMS com diferentes concentrações de APTES e diferentes tempos de incubação (adaptado de [28]).

Quando são utilizadas concentrações elevadas de APTES e/ou longos tempos de incubação, ocorre o aparecimento de um precipitado branco na superfície do PDMS afetando a sua transparência ótica (figura 4.17). Assim, foi necessário um estudo de transmitância para todas as condições, de modo a encontrar um compromisso entre a densidade do grupo amina (que é desejável ser elevada para que haja mais ligações covalentes entre os Ac e a

superfície do PDMS) e a transparência (que deve ser elevada para que as medições óticas ocorram nas melhores condições).

O ensaio de fluorescamina mostrou que uma elevada concentração de APTES ou um longo tempo de incubação originaram mais grupos amina na superfície do PDMS (figura 4.16), o que é desejável. No entanto, estas condições resultam em menor transmitância devido à precipitação (figura 4.18). Portanto, para a funcionalização do PDMS, foi escolhida uma concentração de 50% de APTES e um tempo de incubação de 20 min, o que corresponde a cerca de metade dos grupos amina, quando comparado com o máximo obtido (figura 4.16) e a cerca de 80% de transmitância (figura 4.18).

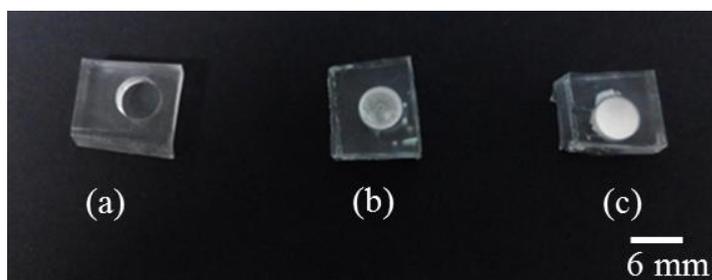
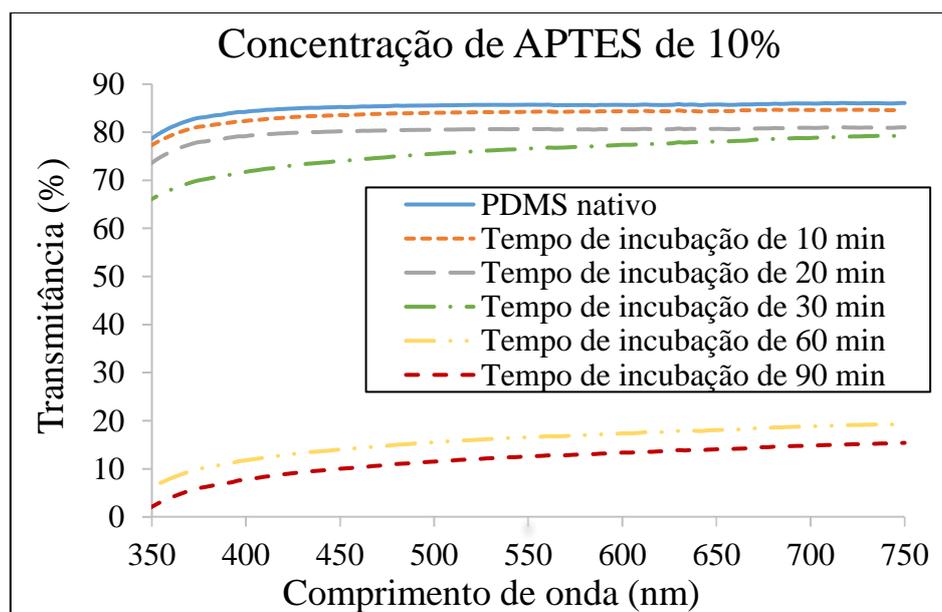
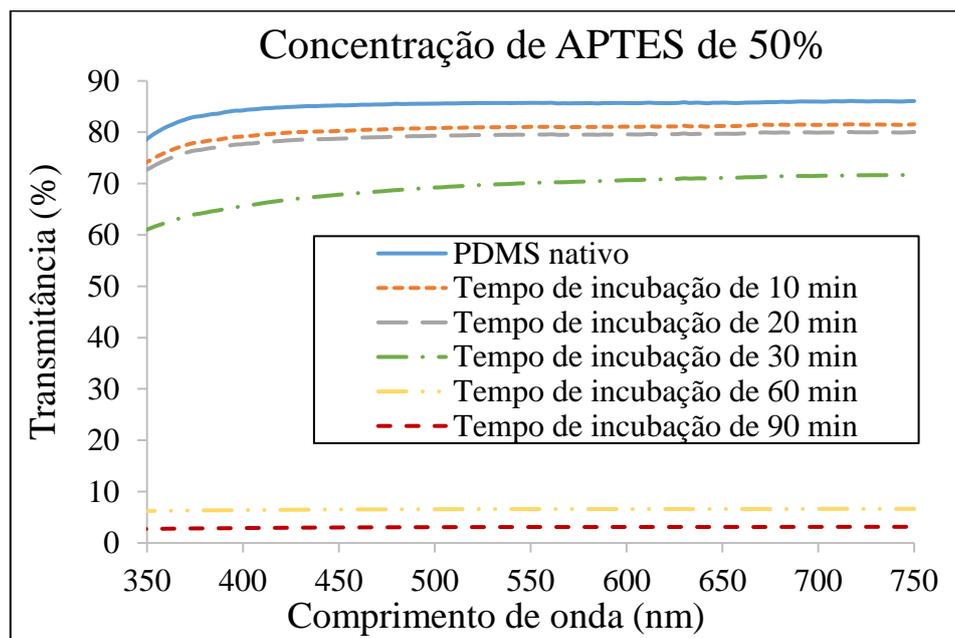


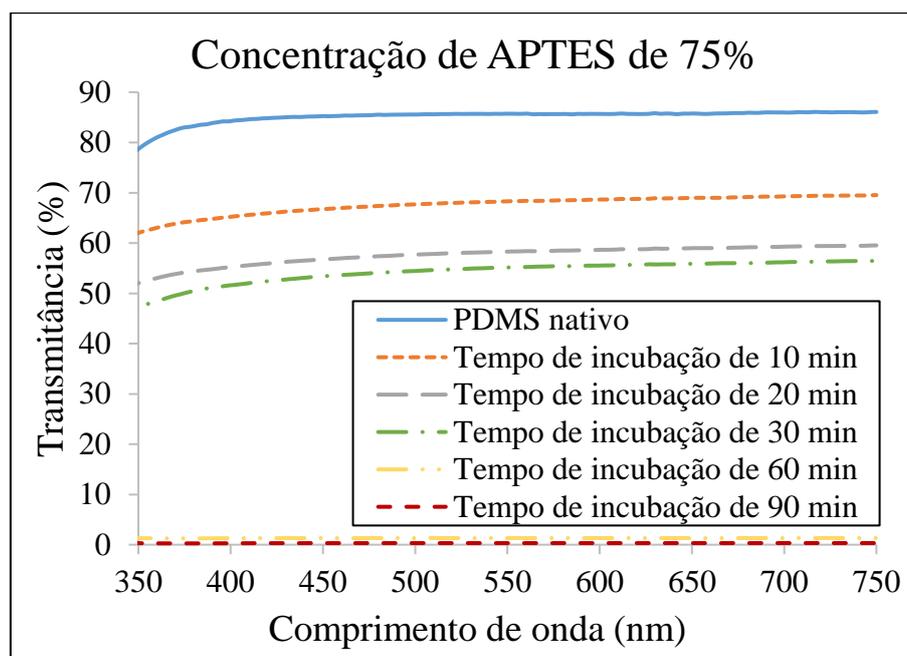
Figura 4.17 Amostras de PDMS tratadas com 50% de APTES incubadas durante: (a) 20 min, (b) 60 min e (c) 90 min.



(a)



(b)



(c)

Figura 4.18 Transmitância do PDMS tratado com diferentes tempos de incubação e diferentes concentrações de APTES: (a) 10% APTES, (b) 50% APTES e (c) 75% APTES (adaptado de [28]).

A superfície do PDMS funcionalizada com os grupos amina com as condições ótimas mencionadas anteriormente foi também estudada por FTIR para comprovar a presença de grupos amina sem a introdução de outros grupos químicos, uma vez que o ensaio de

fluorescamina apenas permite quantificar grupos amina. O espectro do PDMS tratado com APTES foi comparado com o espectro do PDMS nativo (figura 4.19). O espectro característico do PDMS nativo apresenta picos a 2962, 1257 e 1010 cm^{-1} que correspondem aos grupos –metil CH, $-\text{CH}_3$ e Si-O-Si, respetivamente. O espectro do PDMS tratado com APTES apresenta um pico aos 1562 cm^{-1} que corresponde ao grupo $-\text{NH}_2$. Desta forma, estes resultados indicam que a funcionalização da superfície do PDMS por silanização com APTES foi bem-sucedida.

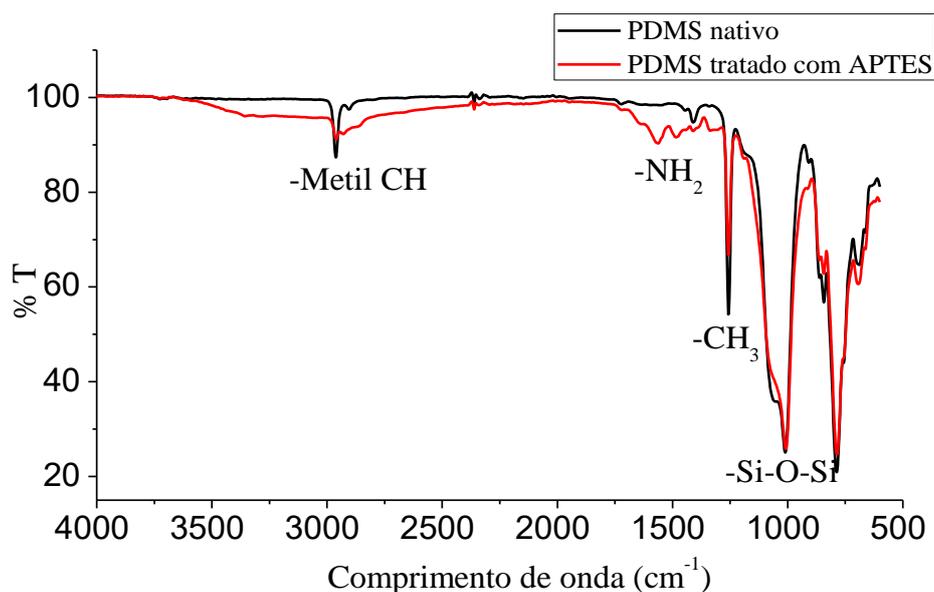


Figura 4.19 Espectro FTIR do PDMS nativo (preto) e PDMS tratado com APTES (vermelho) (adaptado de [28]).

As medições do ângulo contacto foram realizadas em amostras de PDMS nativo, e em amostras de PDMS sujeitas a tratamentos com plasma de O_2 e APTES. As amostras foram analisadas logo após os tratamentos, e após 30, 60 e 300 min, para estudar a estabilidade desses tratamentos. Os resultados experimentais obtidos a partir de amostras em triplicado apresentam-se nas figuras 4.20 e 4.21. Para fins de comparação, as medições das amostras em PDMS nativo foram utilizadas como dados de controlo. Os valores médios dos ângulos de contacto no PDMS nativo foram de $116,7^\circ$, comprovando o seu carácter hidrofóbico. Pela análise dos resultados, logo após o tratamento com plasma de O_2 o ângulo de contacto foi de aproximadamente 0° , uma vez que a gota de água espalhou-se por toda a superfície. No entanto, verificou-se que após 60 min, o ângulo modificou-se para $13,1^\circ$ e após 300 min modificou-se para $46,5^\circ$. Isto evidencia que há uma recuperação da superfície hidrofóbica do

PDMS, apesar de ser muito lenta. Por outro lado, o tratamento do PDMS com plasma de O_2 seguido pela incubação imediata com APTES origina um ângulo de contacto estável de $71,5^\circ$. Apesar de este ângulo ser superior ao inicialmente verificado apenas com o plasma de O_2 , este manteve-se constante ao longo do tempo. Estes resultados comprovaram a eficácia do tratamento da superfície do PDMS com plasma de O_2 para a modificação da superfície hidrofóbica para hidrofílica. Para além disso, demonstraram a importância da incubação com APTES para obter um tratamento estável e duradouro.

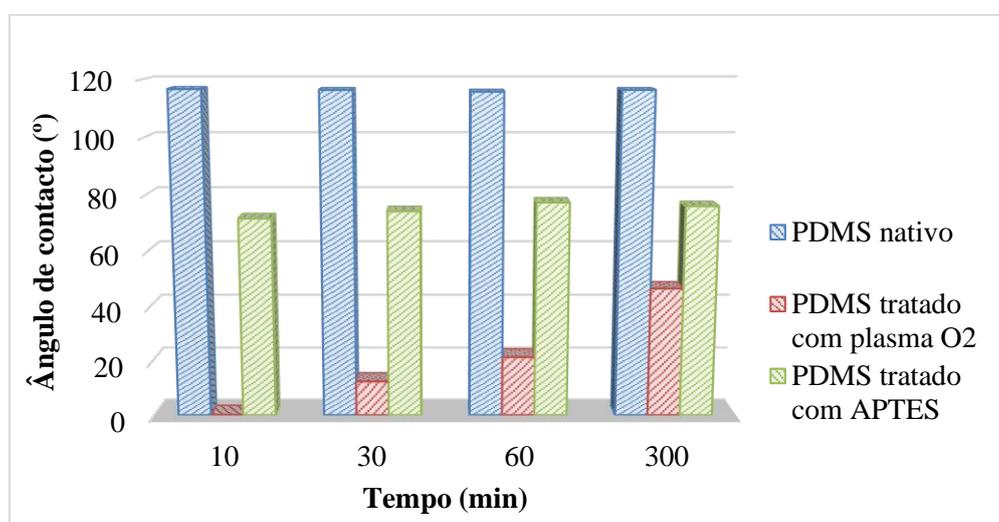
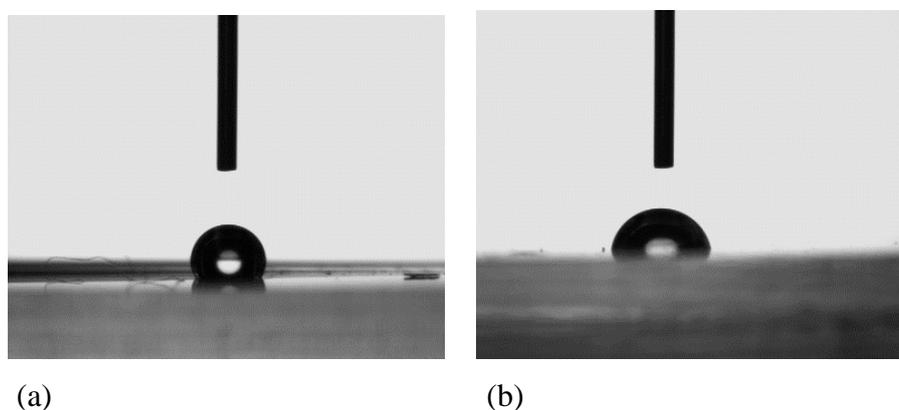


Figura 4.20 Ângulos de contacto de diferentes amostras de PDMS nativo, PDMS tratado com plasma de O_2 e PDMS tratado com APTES.



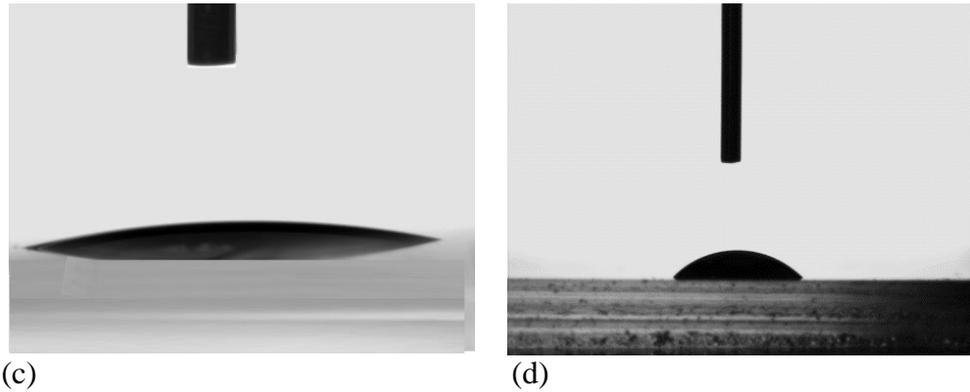


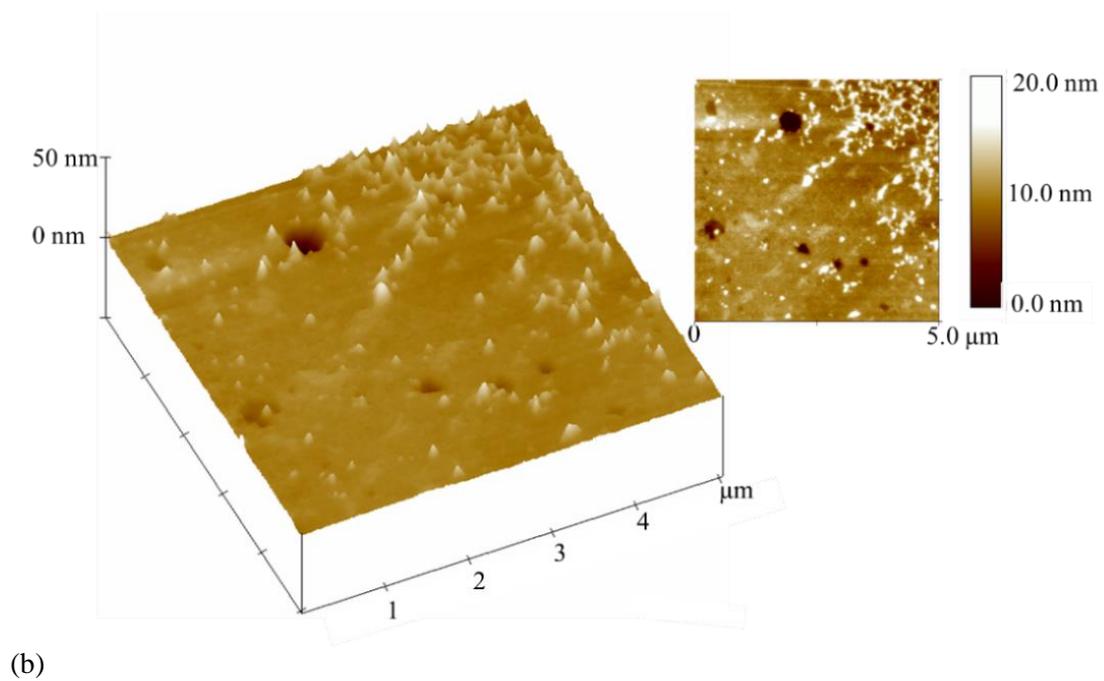
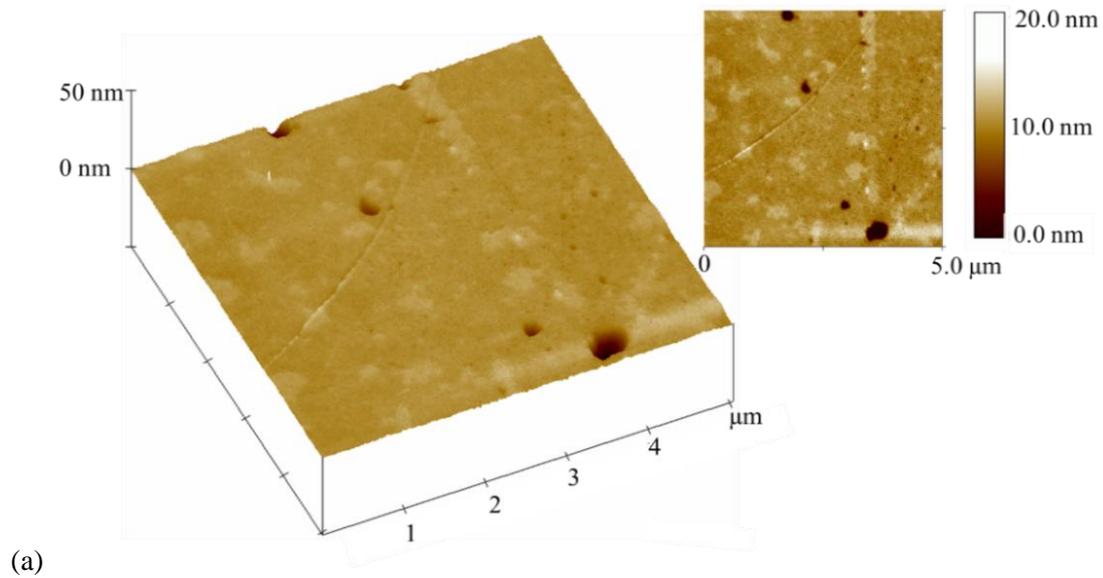
Figura 4.21 Imagem do perfil da gota numa amostra de PDMS (a) nativo, (b) tratada com APTES, (c) tratada com plasma de O₂ e (d) após 300 min do tratamento com plasma de O₂.

4.4.2 Análise comparativa dos métodos de imobilização estudados

A análise AFM permitiu examinar a conformação e distribuição dos Ac imobilizados sobre a superfície do PDMS, bem como caracterizar quantitativamente a imobilização na superfície sólida através da alteração da rugosidade. Em todos os casos, foi utilizada uma solução de Ac de revestimento diluído em PBS, a pH 7,2 e com uma concentração de 20 µg/mL.

As imagens AFM dos diferentes métodos de imobilização de Ac na superfície do PDMS, descritos na seção 4.2, apresentam-se na figura 4.22. As imagens AFM das figuras 4.22a e 4.22b são imagens da superfície do PDMS nativo e da superfície do PDMS com Ac imobilizados por adsorção física, respetivamente. A figura 4.22c é a imagem AFM de Ac imobilizados na superfície do PDMS utilizando a proteína A e a figura 4.22d corresponde à imagem AFM de Ac imobilizados covalentemente à superfície do PDMS tratada com APTES via GA. A figura 4.22a ilustra uma imagem AFM típica de uma superfície do PDMS nativa, a qual é caracterizada por uma superfície plana e lisa. Na figura 4.22b, observou-se uma baixa intensidade de Ac com uma distribuição não uniforme, representada por uma pequena alteração da rugosidade da superfície. Nas figuras 4.22c e 4.22d, observou-se uma elevada intensidade de Ac imobilizados devido a uma alteração significativa da rugosidade da superfície. Nestas duas imagens AFM é possível verificar ainda uma distribuição bastante uniforme dos Ac na superfície do PDMS, no entanto, a superfície tratada com Proteína A (figura 4.22c) apresenta uma rugosidade superior. Esta diferença pode ser explicada pela

presença de um conjunto de proteínas: BSA, Proteína A e Ac. Através da análise AFM, concluiu-se que a imobilização de Ac em superfícies de PDMS nativo por adsorção física apresenta uma menor eficiência de imobilização, quando comparada com a imobilização utilizando a proteína A e a imobilização covalente, levando, possivelmente, à exclusão deste método de imobilização para o imunossensor microfluídico.



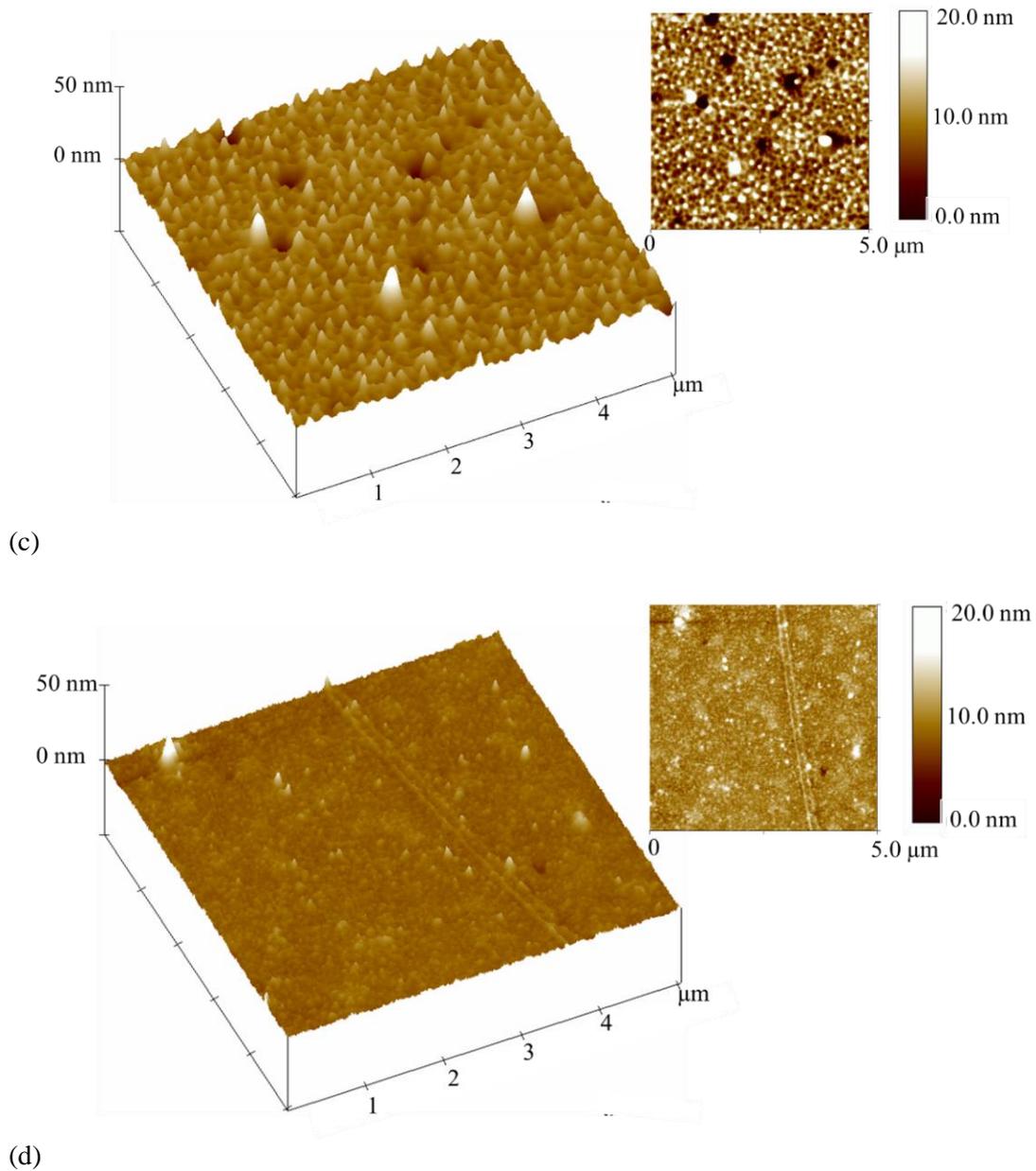


Figura 4.22 Imagem AFM em 2-D (direita) e 3-D (esquerda) das superfícies de PDMS: (a) PDMS nativo, (b) Ac imobilizados na superfície do PDMS por adsorção física, (c) Ac imobilizados na superfície do PDMS utilizando proteína A e (d) Ac imobilizados na superfície do PDMS tratado com APTES via GA.

Com a análise espectrofotométrica foi possível realizar três estudos de caracterização quantitativa nas superfícies do PDMS, nomeadamente, a comparação da quantidade de Ac imobilizados, a eficiência na orientação dos Ac imobilizados e a estabilidade de armazenamento. O primeiro teste baseou-se na análise quantitativa dos Ac imobilizados nas superfícies do PDMS utilizando Ac de revestimento marcados com HRP. Para esta análise, foram fabricados nove poços em PDMS e, de seguida, foram tratados utilizando os três

métodos de imobilização descritos na secção 4.2. Para esses três métodos foram incubadas dentro dos poços três concentrações diferentes de Ac de revestimento marcados com HRP durante a noite. Após este período de incubação, os poços foram lavados com PBS-Tween20 para remoção de excesso de Ac, adicionando-se de seguida, o substrato colorimétrico (TMB). Esta solução apresenta uma cor azul, resultante da degradação provocada pela enzima HRP. A reação foi terminada com a adição de uma solução STOP (ácido sulfúrico) que transforma o TMB numa cor amarela. A solução foi lida por absorção ótica a 450 nm. Os resultados experimentais desta análise apresentam-se na figura 4.23. Os resultados obtidos mostram que os Ac imobilizados nas superfícies do PDMS utilizando a proteína A e a imobilização covalente por funcionalização do PDMS com grupos amina apresentaram um valor de absorvência elevado, o que significa maior concentração de Ac imobilizados. O método de imobilização por adsorção física apresenta um valor baixo de absorvência e, consequentemente, uma baixa concentração de Ac imobilizados. Estes resultados comprovaram os resultados de AFM, isto é, a elevada eficiência dos métodos descritos na secção 4.2.2 e 4.2.3, e a baixa eficiência do método por adsorção física para imobilização de Ac. Contudo, não é ainda possível concluir entre o método utilizando a proteína A e o método utilizando a imobilização covalente, qual deles o mais eficiente para ser aplicado no imunossensor microfluídico para quantificar o cortisol salivar.

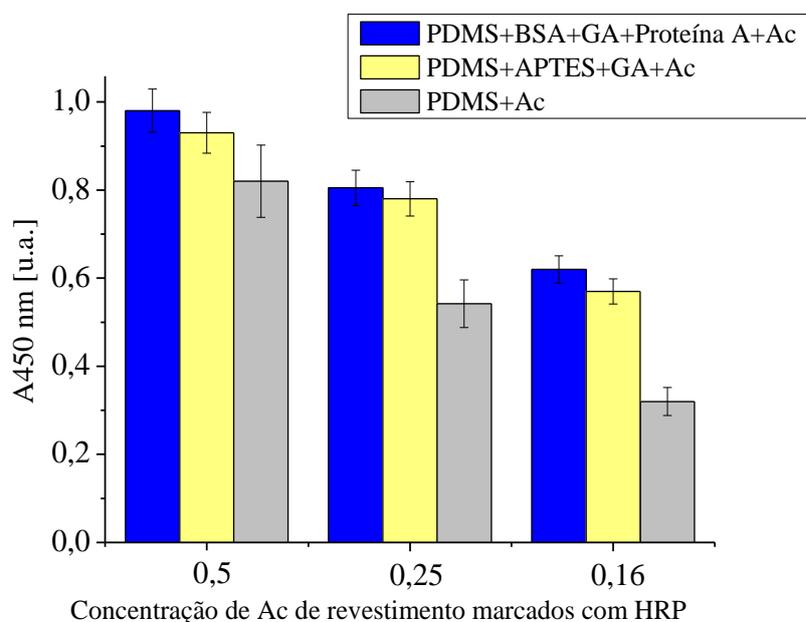


Figura 4.23 Análise espectrofotométrica da concentração de Ac de revestimento marcados com HRP imobilizados na superfície do PDMS utilizando os três métodos de imobilização descritos na secção 4.2.

Face às conclusões anteriores, para completar este estudo, foi necessário realizar o imunoensaio do cortisol salivar utilizando os três métodos de imobilização (incluindo ainda assim o método de adsorção física). Esta análise permitiu verificar qual o método mais eficiente para a aplicação pretendida. Para isso, foram fabricados 4 conjuntos de 9 poços em PDMS para fazer o teste em triplicado. Para o método de imobilização por adsorção física e o método de imobilização utilizando proteína A, foram incubadas diferentes diluições de Ac de captura (1:10; 1:50; 1:100 e 1:500) nos poços durante a noite. Seguidamente, os poços foram lavados com PBS-Tween20 e foi incubada a solução de bloqueio (0,1% BSA + 3% Sacarose) mais uma vez durante a noite seguido por uma lavagem com PBS-Tween20. No método de imobilização covalente, foram incubados Ac de revestimento com uma concentração de 20 µg/mL (concentração recomendada pelo fornecedor) durante a noite e lavados com PBS-Tween20. Seguidamente, os poços foram incubados com a solução de bloqueio (0,1% BSA + 3% Sacarose) mais uma vez durante a noite e lavados, novamente, com a solução de lavagem. Posteriormente, foram adicionados diferentes diluições de Ac de captura (1:10; 1:50; 1:100 e 1:500) que são capturados pelos Ac de revestimento. Para estudar a eficiência de cada método, bem com a orientação dos Ac de captura adicionou-se, em todos os poços, cortisol marcado com HRP na proporção de 1:25000 durante 3 h e lavaram-se com a solução PBS-Tween20. De seguida, introduziu-se o substrato colorimétrico (TMB) durante 10 min, seguido pela adição da solução STOP. Finalmente, a solução dos poços foi medida por absorção ótica a 450 nm.

Como pode ser visto pela figura 4.24, o método de imobilização por adsorção física apresenta um baixo valor de absorvência comprovando mais uma vez a baixa eficiência e estabilidade deste método. O método de imobilização utilizando a Proteína A e o método de imobilização por funcionalização química da superfície do PDMS com grupos amina em conjunto com a utilização de Ac de revestimento apresentam sinais de absorvência bastante semelhantes sendo o primeiro método o que apresenta valores ligeiramente maiores. Para completar este estudo, foram feitos testes em diferentes semanas para comprovar a estabilidade de armazenamento destes dois métodos. Estes testes foram realizados da mesma forma que no estudo anterior diferindo apenas no facto de que, após o passo da incubação da solução bloqueio, as amostras de PDMS foram armazenadas a 4°C até 3 semanas e, de seguida, procedeu-se aos restantes passos do imunoensaio. Este estudo demonstrou que após uma semana o método de imobilização utilizando a proteína A apresentou uma diminuição

acentuada do valor de absorvência (figura 4.25). Desta forma, o método descrito na secção 4.2.3 mostrou ser o método mais eficaz devido à sua estabilidade de armazenamento. Assim, devido à facilidade de execução e à elevada eficiência de imobilização, este método foi o que apresentou um grande potencial para ser utilizado no imunossensor microfluídico em PDMS para quantificação de cortisol salivar. Será, pois, este o método utilizado para o fabrico do imunossensor microfluídico.

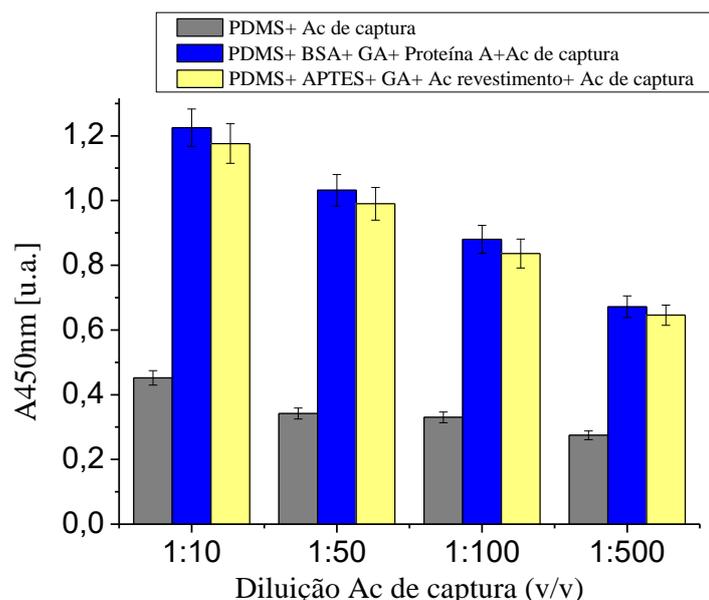


Figura 4.24 Análise espectrofotométrica por absorção ótica da concentração de cortisol marcado com HRP ligado aos Ac de captura imobilizados utilizando os três métodos descritos na secção 4.2.

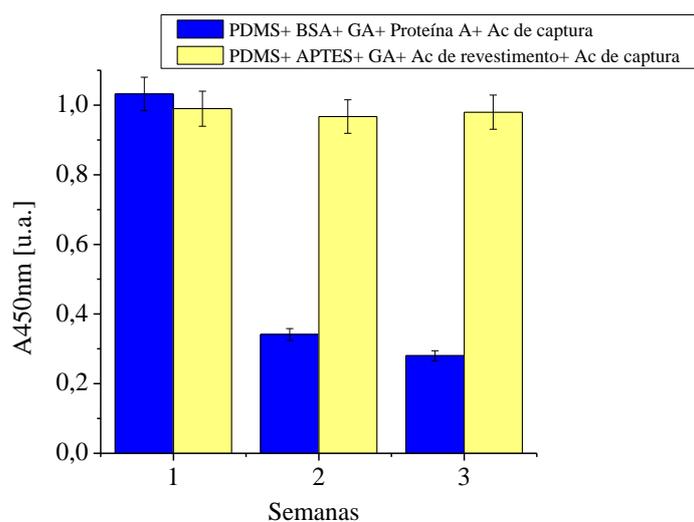


Figura 4.25 Análise espectrofotométrica por absorção ótica da concentração de cortisol marcado com HRP ligados aos Ac de captura imobilizados utilizando os métodos descritos nas secções 4.2.2 e 4.2.3 e medidos ao longo de três semanas.

4.5 Conclusão

Neste capítulo foram comparados diferentes métodos de imobilização de Ac sobre superfícies de PDMS. A escolha dos métodos a serem estudados baseou-se na facilidade de processamento bem como na sua viabilidade de ser aplicada em sistemas microfluídicos com um custo reduzido. A comparação dos métodos de imobilização foi realizada recorrendo a técnicas de caracterização de AFM e de espectrofotometria. Os resultados obtidos mostraram que a imobilização de Ac diretamente em superfícies de PDMS nativas (métodos de imobilização por adsorção física) apresentou baixa rugosidade superficial e baixo valor de absorvência comprovando a baixa eficiência deste método. Por outro lado, o método de imobilização utilizando a proteína A e o método de imobilização covalente por funcionalização química apresentaram melhores resultados quando comparados com o anterior. Os resultados experimentais destes dois métodos foram muito semelhantes, ambos foram caracterizados por um aumento da rugosidade com uma distribuição bastante uniforme dos Ac sobre a superfície do PDMS. Para além disso, apresentaram um elevado valor de absorvência e, consequentemente, uma maior concentração de Ac imobilizados. No entanto, o método de imobilização utilizando a proteína A apresentou baixa estabilidade de armazenamento. Isto pode ser provocado pela desnaturação ou instabilidade da proteína A durante o armazenamento. Desta forma, o método de imobilização covalente por funcionalização da superfície do PDMS com grupos amina apresentou um grande potencial para ser utilizado no imunossensor microfluídico fabricado em PDMS, devido à elevada estabilidade a longo prazo, à simplicidade de processamento bem como à elevada eficiência de imobilização.

A estabilidade de armazenamento a longo prazo (mais de 3 semanas) poderá ser aumentada, ainda, utilizando várias abordagens, tais como soluções tampão dentro dos canais (como PBS e Tris/BSA/proclin/glicerol) que permitem manter a bioestabilidade até dois meses e meio, se armazenados a 4°C [35, 36]. Para além destas soluções, também podem ser utilizados agentes estabilizadores, como trealose, para armazenamentos até 6 meses à temperatura ambiente, sendo muito apropriado para aplicações POC [37]. Assim, se for necessário para a aplicação, podem ser utilizadas várias abordagens para melhorar a estabilidade a longo termo, as quais incluem métodos secos, como armazenamento a baixas

temperaturas, ou métodos húmidos utilizando soluções tampão ou outros agentes de estabilização. Note-se que este procedimento aumenta o custo do dispositivo e consequentemente o custo por teste.

Referências

- [1] E. Juan-Franco, A. Caruz, J. Pedrajas, and L. M. Lechuga, “Site-directed antibody immobilization using a protein A–gold binding domain fusion protein for enhanced SPR immunosensing,” *Analyst*, vol. 138, no. 7, pp. 2023-2031, 2013.
- [2] Q. Yu, Q. Wang, B. Li, Q. Lin, and Y. Duan, “Technological development of antibody immobilization for optical immunoassays: progress and prospects,” *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 62-75, 2015.
- [3] D. Kim, and A. E. Herr, “Protein immobilization techniques for microfluidic assays,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 4, pp. 041501, 2013.
- [4] J. E. Lee, J. H. Seo, C. S. Kim, Y. Kwon, J. H. Ha, S. S. Choi, and H. J. Cha, “A comparative study on antibody immobilization strategies onto solid surface,” *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 30, no. 10, pp. 1934-1938, 2013.
- [5] F. Rusmini, Z. Zhong, and J. Feijen, “Protein immobilization strategies for protein biochips,” *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 6, pp. 1775-1789, 2007.
- [6] J. Křenková, and F. Foret, “Immobilized microfluidic enzymatic reactors,” *Electrophoresis*, vol. 25, no. 21-22, pp. 3550-3563, 2004.
- [7] S. Sharma, H. Byrne, and R. J. O’Kennedy, “Antibodies and antibody-derived analytical biosensors,” *Essays In Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 9-18, 2016.
- [8] N. S. Ferreira, and M. G. F. Sales, “Disposable immunosensor using a simple method for oriented antibody immobilization for label-free real-time detection of an oxidative stress biomarker implicated in cancer diseases,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 53, pp. 193-199, 2014.
- [9] Q. Xiang, G. Hu, Y. Gao, and D. Li, “Miniaturized immunoassay microfluidic system with electrokinetic control,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 21, no. 10, 2006.
- [10] R. Wang, Y.-L. Yang, M. Qin, L.-K. Wang, L. Yu, B. Shao, M.-Q. Qiao, C. Wang, and X. Z. Feng, “Biocompatible hydrophilic modifications of poly (dimethylsiloxane) using self-assembled hydrophobins,” *Chemistry of materials*, vol. 19, no. 13, pp. 3227-3231, 2007.
- [11] R. Khnouf, D. Karasneh, and B. A. Albiss, “Protein immobilization on the surface of polydimethylsiloxane and polymethyl methacrylate microfluidic devices,” *Electrophoresis*, vol. 37, no. 3, pp. 529-535, 2016.

- [12] S. Laib, and B. D. MacCraith, “Immobilization of biomolecules on cycloolefin polymer supports,” *Analytical chemistry*, vol. 79, no. 16, pp. 6264-6270, 2007.
- [13] A. Santos, J. J. Davis, and P. R. Bueno, “Fundamentals and Applications of Impedimetric and Redox Capacitive Biosensors,” *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, vol. 2015, 2014.
- [14] J. Turkova, “Oriented immobilization of biologically active proteins as a tool for revealing protein interactions and function,” *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 722, no. 1, pp. 11-31, 1999.
- [15] J. Yakovleva, R. Davidsson, M. Bengtsson, T. Laurell, and J. Emnéus, “Microfluidic enzyme immunosensors with immobilised protein A and G using chemiluminescence detection,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 19, no. 1, pp. 21-34, 2003.
- [16] E. B. Tatlybaeva, H. N. Nikiyan, A. S. Vasilchenko, and D. G. Deryabin, “Atomic force microscopy recognition of protein A on Staphylococcus aureus cell surfaces by labelling with IgG–Au conjugates,” *Beilstein journal of nanotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 743-749, 2013.
- [17] A. L. Washburn, J. Gomez, and R. C. Bailey, “DNA-encoding to improve performance and allow parallel evaluation of the binding characteristics of multiple antibodies in a surface-bound immunoassay format,” *Analytical chemistry*, vol. 83, no. 9, pp. 3572-3580, 2011.
- [18] Y. Ling, “Modified plastic surfaces for high performance microfluidic immunoassay devices,” 2009.
- [19] N. R. Glass, R. Tjeung, P. Chan, L. Y. Yeo, and J. R. Friend, “Organosilane deposition for microfluidic applications,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, 036501, 2011.
- [20] Y. J. Chuah, S. Kuddannaya, M. H. A. Lee, Y. Zhang, and Y. Kang, “The effects of poly (dimethylsiloxane) surface silanization on the mesenchymal stem cell fate,” *Biomaterials science*, vol. 3, no. 2, pp. 383-390, 2015.
- [21] L. Yu, C. M. Li, Q. Zhou, and J. H. Luong, “Poly (vinyl alcohol) functionalized poly (dimethylsiloxane) solid surface for immunoassay,” *Bioconjugate chemistry*, vol. 18, no. 2, pp. 281-284, 2007.
- [22] T. Kamra, S. Chaudhary, C. Xu, L. Montelius, J. Schnadt, and L. Ye, “Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles on a gold surface using carbodiimide coupling for chemical sensing,” *Journal of colloid and interface science*, vol. 461, pp. 1-8, 2016.

- [23] L.-Q. Chu, W. Knoll, and R. Förch, “Plasma polymerized epoxide functional surfaces for DNA probe immobilization,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 24, no. 1, pp. 118-122, 2008.
- [24] B. Thierry, M. Kurkuri, J. Y. Shi, L. E. M. P. Lwin, and D. Palms, “Herceptin functionalized microfluidic polydimethylsiloxane devices for the capture of human epidermal growth factor receptor 2 positive circulating breast cancer cells,” *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 3, 032205, 2010.
- [25] K. H. Park, H. G. Park, J.-H. Kim, and K. H. Seong, “Poly (dimethyl siloxane)-based protein chip for simultaneous detection of multiple samples: Use of glycidyl methacrylate photopolymer for site-specific protein immobilization,” *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no. 5, pp. 613-620, 2006.
- [26] V. Pinto, G. Minas, and M. Correia-Neves, "PDMS biofunctionalization study for the development of a microfluidic device: Application to salivary cortisol." pp. 1-5.
- [27] E. Eteshola, and D. Leckband, “Development and characterization of an ELISA assay in PDMS microfluidic channels,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 72, no. 2, pp. 129-133, 2001.
- [28] V. Pinto, P. Sousa, S. Catarino, M. Correia-Neves, and G. Minas, “Microfluidic immunosensor for rapid and highly-sensitive salivary cortisol quantification,” *Biosensors and Bioelectronics*, 2016.
- [29] G. Binnig, C. F. Quate, and C. Gerber, “Atomic force microscope,” *Physical review letters*, vol. 56, no. 9, pp. 930, 1986.
- [30] F. J. Giessibl, “Advances in atomic force microscopy,” *Reviews of modern physics*, vol. 75, no. 3, pp. 949, 2003.
- [31] G. M. H. Minas, “Microsistema laboratorial para análise de fluidos biológicos,” Universidade do Minho, 2004.
- [32] C. Berthomieu, and R. Hienerwadel, “Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy,” *Photosynthesis research*, vol. 101, no. 2-3, pp. 157-170, 2009.
- [33] S. Udenfriend, S. Stein, P. Boehlen, W. Dairman, W. Leimgruber, and M. Weigele, “Fluorescamine: a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range,” *Science*, vol. 178, no. 4063, pp. 871-872, 1972.
- [34] P. Held, “Fluorimetric quantitation of protein using the reactive compound fluorescamine,” *Nature Methods/ Application Notes*, 2006.
- [35] V. Linder, and N. de Rooij, “Polymeric Microfluidic Platforms for Immunodetection”, Université de Neuchâtel, 2001.

- [36] P. Li, A. Abolmaaty, C. D'Amore, S. Demming, C. Anagnostopoulos, and M. Faghri, "Development of an ultrafast quantitative heterogeneous immunoassay on pre-functionalized poly (dimethylsiloxane) microfluidic chips for the next-generation immunosensors," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 7, no. 4, pp. 593-598, 2009.
- [37] W. Asghar, M. Yuksekkaya, H. Shafiee, M. Zhang, M. O. Ozen, F. Inci, M. Kocakulak, and U. Demirci, "Engineering long shelf life multi-layer biologically active surfaces on microfluidic devices for point of care applications," *Scientific reports*, vol. 6, 2016.

5 Projeto, fabrico e resultados do imunossensor microfluídico

Neste capítulo apresentam-se as condições ótimas de todo o imunoensaio competitivo para o cortisol salivar, bem como o fabrico do dispositivo microfluídico em PDMS. Para a obtenção dessas condições ótimas foi necessário otimizar a geometria dos microcanais, o método de imobilização e as condições do imunoensaio. São ainda apresentados os resultados obtidos da quantificação de cortisol salivar por absorção ótica.

5.1 Introdução

O imunoensaio é uma técnica analítica que se baseia na ligação específica de um Ac com o respetivo Ag, permitindo assim, com elevada sensibilidade e seletividade, a quantificação de biomoléculas em amostras complexas. Esta técnica tem sido empregue em várias aplicações, tais como diagnósticos clínicos, proteómica, investigação farmacêutica e investigação biológica [1, 2]. No entanto, os imunoensaios convencionais são processos bastante complexos, caros e demorados uma vez envolvem várias etapas [2, 3]. Desta forma, existe um grande interesse no desenvolvimento de plataformas automatizadas e miniaturizadas para esses imunoensaios. Estas plataformas devem ser capazes de simplificar os procedimentos, reduzir o tempo do ensaio e o consumo das amostras/reagentes, e melhorar a eficiência da reação. As vantagens dos sistemas microfluídicos descritos no capítulo 3 preenchem estes critérios, pelo que a sua utilização em imunoensaios tem ganho especial atenção. Estas plataformas, designadas de imunossensores, combinam o poder analítico dos sistemas microfluídicos com a elevada especificidade da interação Ac-Ag, resultando num aumento da fiabilidade e sensibilidade do ensaio, tudo isto através da automação e da integração de vários processos num único dispositivo [1, 4].

5.2 Princípio de funcionamento do imunossensor microfluídico

O imunoensaio para a análise quantitativa do cortisol salivar por deteção ótica baseou-se num ensaio competitivo. Neste imunoensaio foram imobilizados Ac de revestimento nas superfícies da câmara de reação para ligação dos Ac de captura, utilizando a técnica descrita na secção 4.2.3. Este revestimento permite a correta orientação dos Ac de captura, dando assim maior sensibilidade ao imunoensaio. O cortisol marcado com HRP compete com o cortisol da amostra pelo local de ligação ao Ac de captura na câmara de reação (ver figura 1.1). Depois disso, os componentes não ligados são removidos utilizando um passo de lavagem. Posteriormente, introduz-se o substrato TMB que reage com a enzima HRP, produzindo uma cor azul. Esta reação é parada pela adição de uma solução de ácido sulfúrico com uma concentração de 2M (solução STOP) que transforma a cor azul da mistura numa cor amarela, a qual é medida por absorção ótica a 450 nm. A concentração de cortisol

marcado com HRP é inversamente proporcional à concentração de cortisol na amostra: quanto maior o valor de absorvência medido, menor é a concentração de cortisol na amostra. A obtenção de elevada sensibilidade com baixos volumes de amostras e reagentes, requer a correta otimização das condições do imunoensaio, tais como da quantidade de reagente (concentração de reagentes para os Ac de revestimento, Ac de captura, cortisol marcado com HRP, etc.) e do tempo de reação. De forma a simplificar este estudo, estas condições foram estudadas utilizando, inicialmente, poços em PDMS (4 mm de comprimento x 3 mm de largura x 3 mm de altura) e pipetando manualmente os respetivos reagentes do imunoensaio (figura 5.1). Esta abordagem, da utilização de poços em vez de dispositivos microfluídicos completos, permitiu a otimização do imunoensaio de uma forma mais fácil, mais rápida e mais económica, uma vez que foi necessário realizar vários testes em paralelo nestes poços descartáveis.

Posteriormente, estas condições foram transferidas para o dispositivo microfluídico. Os poços de PDMS foram fabricados recorrendo a moldes em acrílico segundo o procedimento apresentado na seção 5.4.2.3.

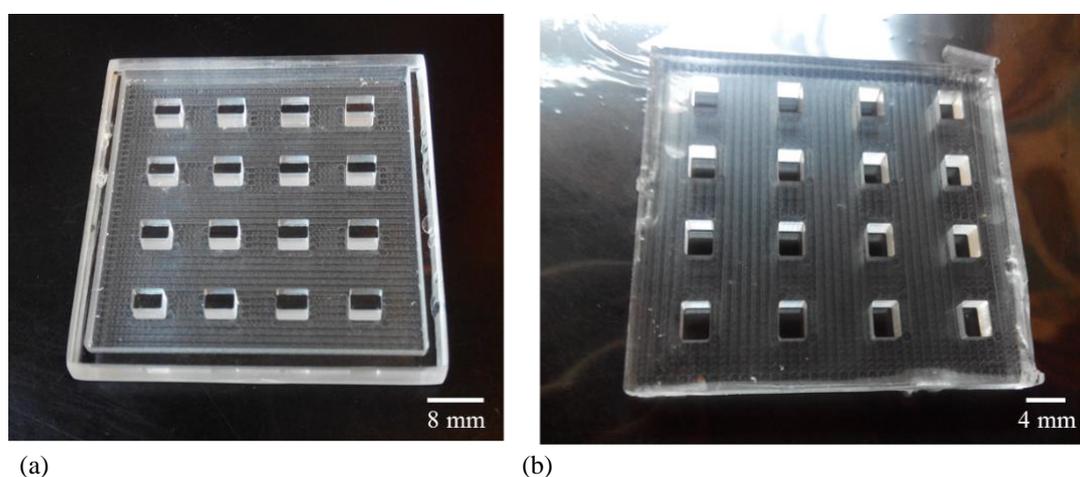


Figura 5.1 Fotografia do (a) molde em acrílico e dos (b) poços em PDMS utilizados para a otimização do imunoensaio competitivo para o cortisol salivar.

5.3 Desenvolvimento do imunoensaio do cortisol salivar em poços de PDMS

5.3.1 Eficiência da solução de bloqueio para adsorção não-específica em poços de PDMS

Apesar de ter sido demonstrado com sucesso a imobilização de Ac na superfície do PDMS (ver secção 4.4.2.), pode ocorrer, também, adsorção não-específica de proteínas conduzindo a falsos positivos. Por este motivo, e antes de serem estudadas as quantidades dos reagentes e o tempo de reação do imunoensaio, foram estudadas, experimentalmente, várias soluções de bloqueio para encontrar a solução com melhor eficiência [5]. As soluções de bloqueio foram: 1% BSA; 1% Caseína; 3% BSA; 0,5% BSA + 0,5% Caseína; 0,1% BSA + 3% Sacarose. Todas as soluções foram preparadas em tampão borato a pH 7,8 e testadas para tempos de incubação de 2 h, 4 h e durante a noite à temperatura ambiente. Após a incubação, os poços de PDMS foram lavados com PBS-Tween20 e, de seguida, foi adicionado 30 µL de cortisol marcado com HRP (em excesso para confirmar a eficiência da solução de bloqueio) diluído em tampão borato numa proporção de 1: 25000. A utilização de uma quantidade elevada de cortisol marcado com HRP aumenta a sua disponibilidade para se ligar a áreas não bloqueadas e assim aferir mais adequadamente a eficiência da solução de bloqueio. Seguidamente, os poços de PDMS foram novamente lavados com PBS-Tween20 e posteriormente adicionou-se 20 µl de TMB. Após 10 min, adicionou-se 10 µl de solução STOP e mediu-se a absorvência da mistura final a 450 nm. Quanto menor a absorvência medida, maior será a eficiência de bloqueio, uma vez que a área disponível para a adsorção não-específica do cortisol marcado com HRP é reduzida devido ao preenchimento com a solução de bloqueio. Os resultados experimentais mostraram que a solução com uma maior eficiência de bloqueio sobre a superfície do PDMS foi a solução de 0,1% de BSA + 3% de Sacarose incubada durante 4 h e durante a noite (tabela 5.1), uma vez que mostrou o menor valor de absorvência. Visto que ambos os tempos de incubação apresentaram um desempenho de bloqueio semelhante, para reduzir o tempo de ensaio, utilizou-se nas experiências subsequentes o tempo de incubação de 4 h.

Tabela 5.1 A_{450nm} das diferentes soluções de bloqueio (unidades arbitrárias) (adaptado de [5]).

Solução de bloqueio Tempo	1% Caseína	1% BSA	3% BSA	0,5% BSA + 0,5% Caseína	0,1% BSA + 3% Sacarose
2 h	0,189 ±0,01	0,137 ±0,009	0,122 ± 0,008	0,135 ± 0,009	0,110 ± 0,008
4 h	0,179 ±0,01	0,132 ±0,009	0,118 ±0,008	0,131 ± 0,009	0,087 ±0,008
Durante a noite	0,167 ±0,01	0,121 ±0,009	0,113 ±0,008	0,113 ±0,009	0,081 ±0,008

5.3.2 Otimização do imunoenensaio para o cortisol salivar em poços de PDMS

A fim de encontrar as condições ótimas do ensaio, a otimização do imunoenensaio completo foi realizada recorrendo a diferentes concentrações de reagentes (Ac de revestimento, Ac de captura e cortisol marcado com HRP), bem como a diferentes períodos de incubação. Esta otimização foi realizada, inicialmente, nos poços de PDMS retangulares (com as mesmas dimensões da figura 5.1) e à temperatura ambiente. Em primeiro lugar, as medições foram efetuadas sem cortisol padrão (0 ng/mL) para se obter o valor máximo de absorvência. Neste passo, foram estudadas três concentrações de Ac de revestimento (2 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL) e oito de Ac de captura (1: 10 000, 1: 25 000, 1: 50 000, 1: 100 000, 1: 200 000; 1: 500 000, 1: 1 000 000 e 1: 2 000 000), utilizando uma concentração fixa de cortisol marcado com HRP (1: 25 000). Para determinar a concentração ótima de cortisol marcado com HRP, foi feito em simultâneo um estudo utilizando várias diluições de cortisol marcado com HRP (1: 10 000, 1: 25 000, 1: 50 000, 1: 100 000), fixando a concentração de Ac de revestimento (10 µg/mL) e de Ac de captura (1: 50 000), ditadas pela etapa anterior deste trabalho.

A concentração ótima de Ac de revestimento extrapolada a partir dos resultados foi de 10 µg/mL (ver figura 5.2). Apesar do valor de absorvência para a concentração de 20 µg/mL ser ligeiramente superior ao da concentração de 10 µg/mL, escolheu-se este último valor para concentração ótima de Ac de revestimento, uma vez que permite reduzir a quantidade de reagente. A concentração de 2 µg/mL, ao apresentar uma atenuação significativa do valor de absorção, leva a concluir que há baixa densidade de Ac de revestimento disponíveis para ligar

os Ac de captura e, conseqüentemente, do cortisol marcado com HRP/cortisol padrão. Neste estudo encontrou-se ainda, para a concentração de Ac de revestimento escolhida (10 µg/mL), a diluição ótima do Ac de captura, que como se observa pelo pormenor da figura 5.2 foi de (1: 50 000), e do cortisol marcado com HRP, que pela figura 5.3 foi de (1: 25 000), ambos para o valor de absorvência de 1,0. Escolheu-se este valor pelo facto de ter sido o máximo valor de absorvência para o qual se verificou uma maior estabilidade do sinal ótico medido entre os diferentes ensaios.

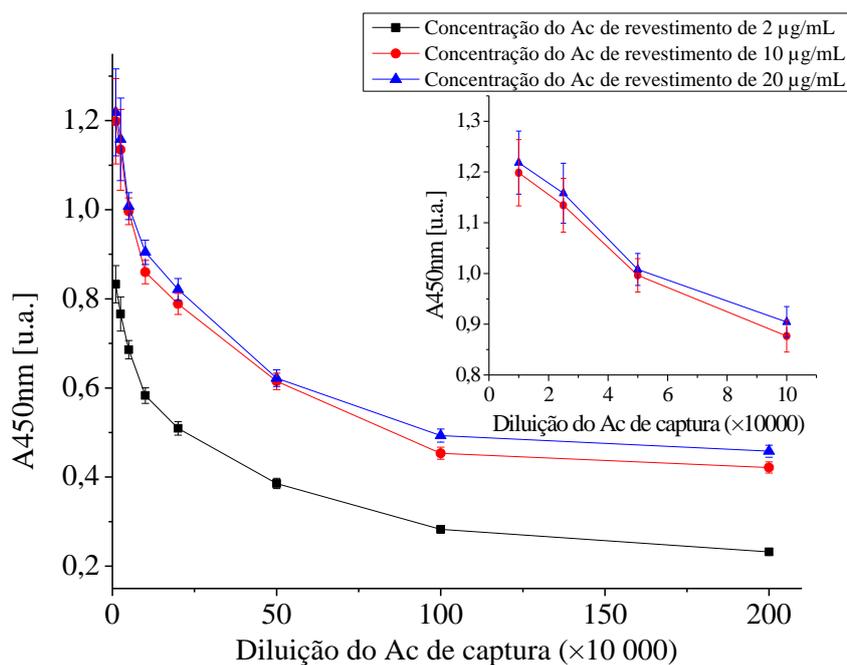


Figura 5.2 Otimização da concentração dos Ac de revestimento e de captura utilizando uma diluição de cortisol marcado com HRP de 25000 (v/v) (adaptado de [5]).

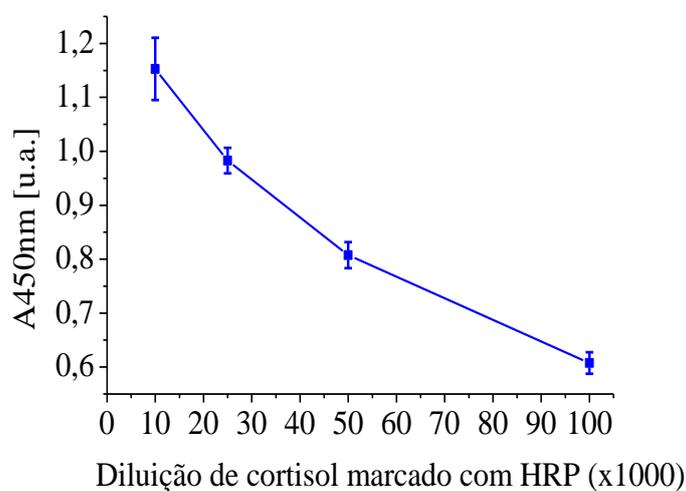


Figura 5.3 Otimização da diluição de cortisol marcado com HRP (adaptado de [5]).

Para determinar o tempo mais adequado para a reação dos Ac de captura com o cortisol marcado com HRP e cortisol padrão, foram adicionados e incubados 10 μL de cada um destes reagentes nos poços de PDMS pré-funcionalizados durante 30 min, 1, 2 e 3 h. Posteriormente, os poços de PDMS foram lavados com PBS-Tween20 e adicionou-se, de seguida, 20 μL de TMB. Após 10 min, adicionou-se os 10 μL de solução STOP e mediu-se o valor da absorvência da mistura a 450 nm. Os resultados experimentais mostraram que após 1 h, o valor máximo de absorvência encontra-se praticamente estabilizado (figura 5.4). Foi, portanto, esse o tempo de reação selecionado para o imunoensaio, uma vez que não se ganhava grande sensibilidade no aumento desse tempo para 2 h ou 3 h.

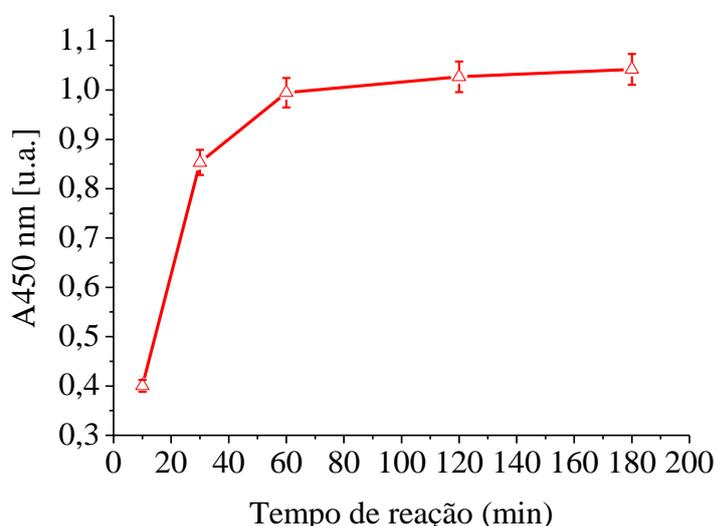


Figura 5.4 Absorção ótica do cortisol marcado com HRP para diferentes tempos de reação do Ac de captura com o cortisol marcado com HRP e cortisol padrão (adaptado de [5]).

5.3.3 Sensibilidade da análise do cortisol salivar em poços de PDMS

A curva de calibração representativa dos imunoensaios competitivos apresenta uma forma sigmoide com uma região central linear, como o representado na figura 5.5 [6]. Neste tipo de curva a sensibilidade do imunoensaio é, normalmente, representada pelo LD e pela gama de trabalho. O LD é definido como a concentração mais baixa de analito que produz um valor que pode ser significativamente discriminado do valor obtido na ausência de analito [7]. A gama de trabalho é delimitada pelo limite superior (concentração muito baixa de analito) e inferior (concentração muito elevada de analito). Dentro desta gama, a variação

do valor de absorvência está relacionada com a concentração do analito. Neste tipo de curva a gama de trabalho é um fator importante dando uma primeira ideia da sensibilidade do ensaio [4]. Desta forma, neste trabalho todos os imunoenaios foram caracterizados pela sua gama de trabalho e pelo seu LD.

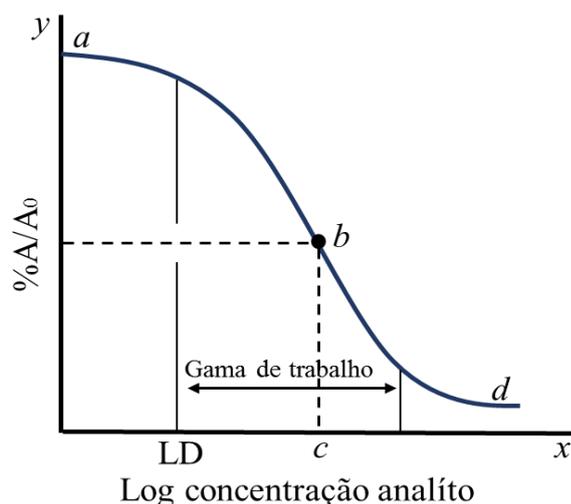


Figura 5.5 Curva de calibração representativa dos imunoenaios competitivos (adaptado de [6]).

As curvas de calibração do imunoenasiao (dependência da absorvência a 450 nm da concentração do cortisol marcado com HRP) foram obtidas através da representação gráfica do valor de absorvência em função do logaritmo das concentrações de cortisol normalizadas (0-1000 ng/mL), utilizando o *software* Origin 8.0. A curva de calibração foi ajustada através da transformação matemática dos quatro parâmetros logarítmicos, obtida mediante um regressão não linear, e definidos por [8]:

$$y = \frac{(1-a)}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d \quad (5.1)$$

onde a e d são os valores da assíntota máxima e mínima, respectivamente; c é o valor no ponto de inflexão; b é o declive; y é o valor da absorvência e x é o logaritmo da concentração do cortisol. Para fazer uma comparação direta entre as várias curvas de calibração, os dados de absorção foram normalizados. Esta transformação foi realizada através dos valores de $\%A/A_0$, onde A é o valor da absorvência da amostra e A_0 representa o valor da absorvência para a concentração zero.

Os ensaios para a obtenção da curva de calibração foram realizados em poços de PDMS, pré-funcionalizados com o Ac de revestimento à concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ de acordo com as condições descritas na secção 4.2.3. Nestes poços foram adicionadas as quantidades dos reagentes otimizadas anteriormente, ou seja: 10 μL de Ac de captura diluídos em tampão de borato na razão de 1: 50 000; 10 μL de cortisol marcado com HRP diluído em tampão de borato na razão de 1: 25 000 e 10 μL de cortisol padrão com onze concentrações diferentes. Estas concentrações variam de 0,1 pg/mL ; 1 pg/mL ; 10 pg/mL ; 0,1 ng/mL ; 0,5 ng/mL ; 1 ng/mL ; 5 ng/mL ; 10 ng/mL ; 100 ng/mL ; 200 ng/mL e 1000 ng/mL , e compreendem as gamas normais e extremamente anormais que podem ser encontradas no corpo humano [6, 9]. De seguida, os poços de PDMS foram agitados manualmente durante cerca de 4 min para promover a mistura dos três reagentes e incubados durante 1 h. Após este tempo, eles foram lavados três vezes com 30 μL de PBS-Tween20. De seguida, adicionou-se 20 μL de solução de TMB e incubou-se durante 10 min à temperatura ambiente. Finalmente, adicionou-se 10 μL de ácido sulfúrico para parar a reação e foram medidos os espectros de absorção ótica em função do comprimento de onda (430-490 nm) para as onze concentrações de cortisol padrão (figura 5.6), utilizando o mesmo *setup* descrito na secção 4.3.2. A curva de calibração obtida a partir do imunoensaio otimizado mostrou um LD de 10 pg/mL e uma gama de trabalho de 0,01-20 ng/mL (figura 5.7). Na gama de trabalho, a intensidade da cor amarela diminui com o aumento de concentração da amostra de cortisol (figura 5.8).

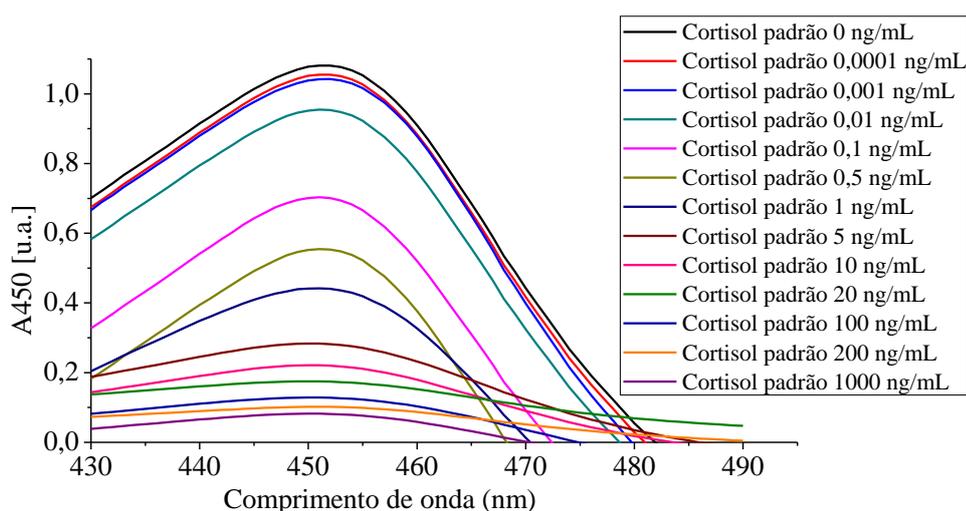


Figura 5.6 Espectro de absorvência em função do comprimento de onda (430-490 nm) para várias concentrações de cortisol padrão obtido em poços de PDMS.

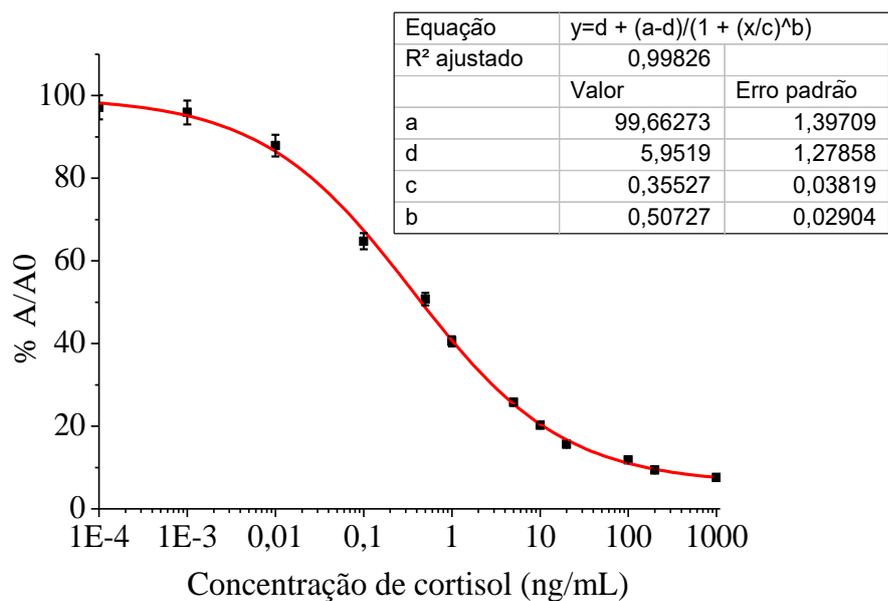


Figura 5.7 Curva de calibração obtida com o imunoenensaio otimizado em poços de PDMS (adaptado de [5]).

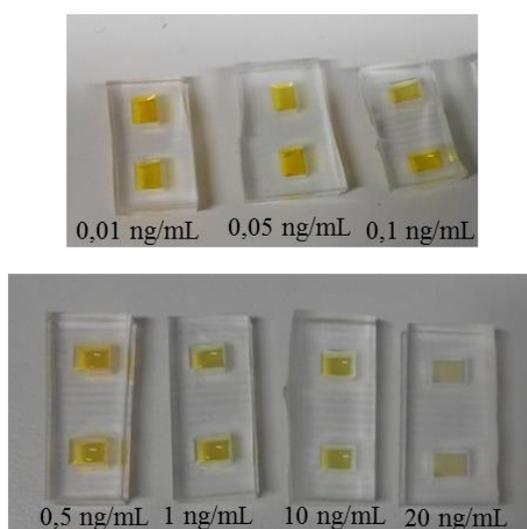


Figura 5.8 Poços de PDMS com o imunoenensaio final, testado em duplicado, no qual se verifica as diferentes intensidades da cor amarela em função da concentração do cortisol.

5.3.4 Seletividade da análise do cortisol salivar em poços de PDMS

A especificidade do imunoenensaio ao cortisol salivar, ou seja, se os reagentes: tampão; solução de bloqueio; e Ac de revestimento e de captura; interferiram nas medições de

absorvência anteriores produzindo resultados errados da concentração de cortisol, foi verificada através de medições de absorvência a 450 nm, considerando estes reagentes sozinhos. Os resultados experimentais ilustrados na figura 5.9 mostram que não houve interferência significativa, uma vez que o valor de absorvência desses reagentes é extremamente baixo quando comparado com o teste que inclui o imunoensaio completo, onde é observada a absorvência máxima.

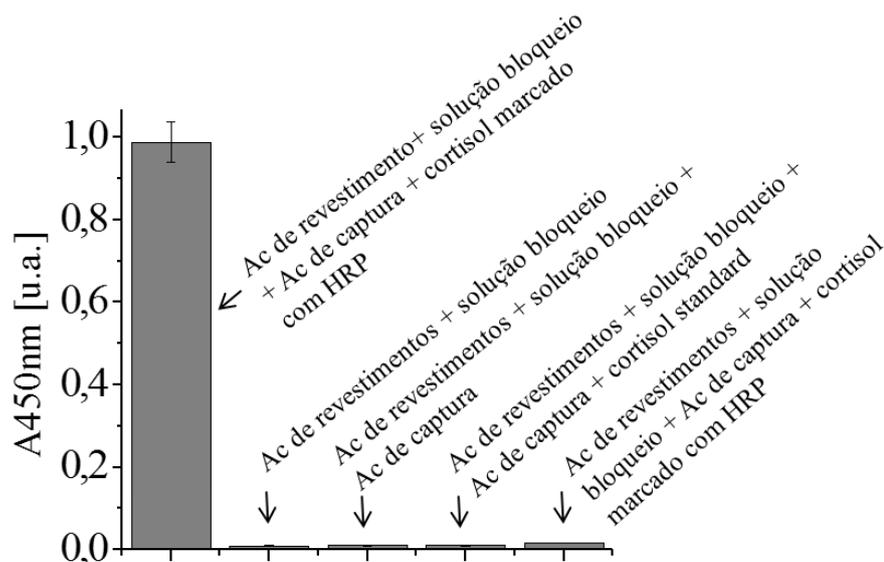


Figura 5.9 Controlos experimentais do imunoensaio competitivo desenvolvido para cortisol salivar em poços de PDMS (adaptado de [5]).

5.4 Desenvolvimento do dispositivo microfluídico em PDMS

5.4.1 Geometria dos microcanais

Após a otimização do imunoensaio em poços de PDMS o passo seguinte prende-se com o projeto e fabrico do dispositivo microfluídico. Este dispositivo deve incluir duas entradas e um canal para mistura dos fluidos até à câmara de reação (a explicação para a utilização de duas entradas é apresentada mais à frente nesta secção). A melhor geometria, comprimento e largura dos microcanais foram avaliados através de simulações numéricas de elementos finitos utilizando o *software COMSOL Multiphysics*, versão 5.2. Este estudo teve como objetivo determinar a geometria que permite a mistura completa dos fluidos no

microcanal antes de estes chegarem à câmara de reação. Assim, várias geometrias de canais com formato linear ou com formato em serpentina (ambos com entrada em forma de Y) foram desenhadas e simuladas, com as dimensões apresentadas na tabela 5.2.

Tabela 5.2 Formato e dimensões dos canais microfluídicos para a simulação (adaptado de [5]).

Tipo de canal	Comprimento (mm)	Largura (μm)
Y linear	20	200
		400
Serpentina	20	200
		400
	40	200

O problema de mistura foi simulado para um modelo 2D, uma vez que este, quando transporte ao longo de uma direção z , é representativo do comportamento tridimensional do escoamento e mistura no microcanal, devido ao facto de a difusão molecular entre as espécies ser isotrópica, assegurando a poupança de recursos computacionais (tempo de simulação e memória) durante a simulação.

Considerou-se, para simplificação do modelo em termos de geometria, número de equações a resolver e condições necessárias (tanto condições fronteira como iniciais), a utilização de apenas duas entradas nos microcanais. Assim, procedeu-se à introdução do cortisol marcado com HRP e do cortisol padrão na mesma entrada, com um caudal duplicado relativamente à entrada para o Ac de captura, de modo a cumprir a necessidade do mesmo volume de cada reagente no microcanal, quando totalmente cheio com fluidos. A resolução do problema no *software COMSOL Multiphysics* foi efetuada recorrendo a dois módulos pré-definidos: escoamento laminar e transporte de espécies diluídas, uma vez que estes módulos permitem a simulação de escoamentos laminares e transporte de massa por convecção-difusão. Assumiu-se para todas as simulações um coeficiente de difusão de $1 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. As condições de fronteira para as entradas e para a saída dos microcanais (para ambos os formatos de canais: lineares e em serpentina) são apresentadas na figura 5.10. As condições de fronteira das paredes dos microcanais (não representadas na figura), podem

ser descritas como velocidade zero, gradiente de pressão zero e ausência de transporte de massa, assegurando assim que não há escoamento no limiar das paredes, e estas são impermeáveis a soluto. As condições iniciais para as simulações foram consideradas como velocidade, pressão e concentração zero no interior dos microcanais. Para cada geometria, a malha foi definida por defeito pelo *software* e consistiu numa combinação de elementos triangulares e quadrilaterais. A malha dos microcanais lineares em forma de Y compreende 1156 elementos, enquanto a malha do microcanal em forma de serpentina com comprimento de 20 mm é formada por 4375 elementos, e a malha do microcanal em forma de serpentina com comprimento de 40 mm é composta por 6025 elementos. O modelo considerou a água como fluido base do escoamento e as suas propriedades (a densidade e a viscosidade) foram definidas à temperatura ambiente. O modelo foi resolvido utilizando o algoritmo de resolução PARDISO (*Parallel Direct Sparse Solver*) disponibilizado por defeito pelo *COMSOL*.

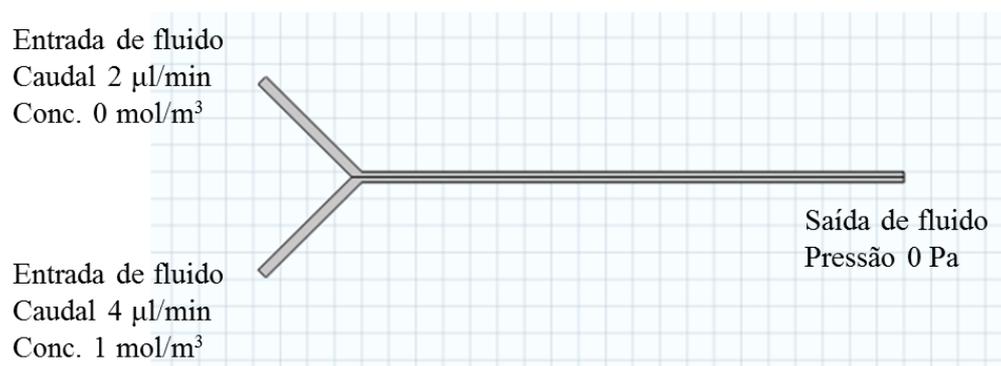


Figura 5.10 Condições de fronteira nas entradas e na saída, utilizadas na simulação.

Considerando, para simplificar o modelo, que numa das entradas do microcanal é introduzido um fluido com uma concentração 0 e que na outra entrada a concentração é de 1 mol/m^3 , os resultados poderão ser analisados com base nos valores de concentração encontrados ao longo do comprimento do canal. À medida que os fluidos vão avançando no microcanal, a mistura vai ocorrendo e os valores de concentração das espécies vão-se aproximando de um valor intermédio. Se a concentração ao longo da largura do microcanal atingir um valor constante, significa que a mistura dos fluidos provenientes das duas entradas está completa. À saída do microcanal, se não for obtida mistura completa no microcanal, então será necessário aumentar o seu comprimento para que a mistura se possa completar.

No caso de ser injetado um caudal semelhante nas duas entradas, a mistura estará completa quando, em toda a largura do microcanal, estiver presente uma concentração de $0,5 \text{ mol/m}^3$. No entanto, neste estudo, como numa das entradas do microcanal o caudal é duas vezes superior ao injetado na outra entrada, a concentração correspondente à mistura completa no microcanal será de $0,66 \text{ mol/m}^3$.

Os resultados das simulações apresentam-se nas figuras 5.11 e 5.12. Na figura 5.11, verificou-se que em ambos os microcanais lineares em forma de Y (largura de $200 \mu\text{m}$ e $400 \mu\text{m}$), a mistura fica muito longe de estar completa. Segundo a escala apresentada na figura 5.11, a cor que representa uma mistura completa, com uma concentração final de $0,66 \text{ mol/m}^3$ (concentração intermédia entre o verde e o amarelo), apenas é observada numa região muito pequena da largura do microcanal e não na largura completa, como se pode ver no pormenor apresentado nas figuras 5.11(a) e (b). Verificou-se ainda que a mistura não ocorre a meia largura do microcanal mas mais próximo dos $2/3$ da largura, uma vez que numa das metades do microcanal foi injetado o dobro do caudal e, portanto, existe também mais volume desse fluido. De acordo com os resultados apresentados, esta geometria não mostrou ser adequada para a aplicação pretendida.

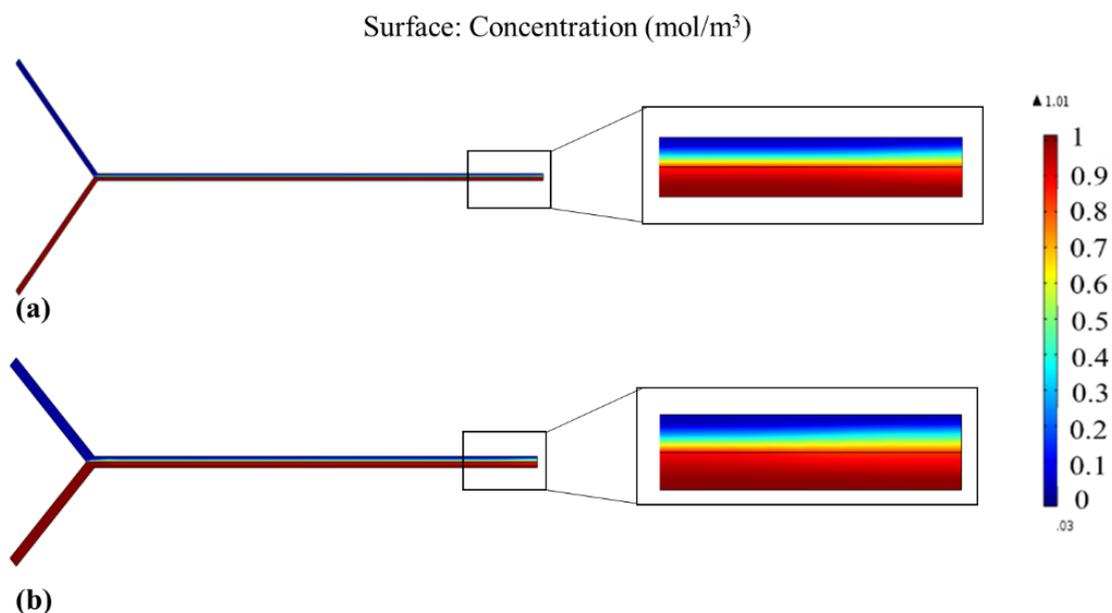


Figura 5.11 Simulação da mistura de fluidos em microcanais em forma de Y lineares com comprimento de 20 mm: (a) microcanal com largura $200 \mu\text{m}$; (b) microcanal com largura $400 \mu\text{m}$. Em ambos encontra-se um detalhe do final do microcanal (direita).

Em alternativa, os microcanais em serpentina com comprimento de 20 mm mostraram uma melhoria significativa em relação aos microcanais lineares em forma de Y (figura 5.12(a) e (b)). Apesar de a cor não ser a mesma em toda a largura do microcanal, verificou-se que a mistura foi quase completa. Pelas cores obtidas, a concentração na extremidade do microcanal encontra-se entre 0,5 e 0,66 mol/m³, estando muito perto de uma mistura completa. Com estes resultados constatou-se que o formato em serpentina é o mais indicado para a aplicação pretendida. Verificou-se ainda que a largura do microcanal não influenciou a mistura e, por esse motivo, seleccionou-se a largura de 200 µm, de modo a reduzir o volume de reagentes. No entanto, como o comprimento do microcanal ainda não foi o suficiente para obter uma mistura completa na zona da saída, foi ainda simulada a mistura dos fluidos num microcanal em forma de serpentina de maior comprimento (40 mm) com 200 µm de largura (figura 5.12(c)). Os resultados desta simulação demonstram uma mistura completa no final do canal, evidenciada pela cor amarelada que representa a concentração final próxima de 0,66 mol/m³.

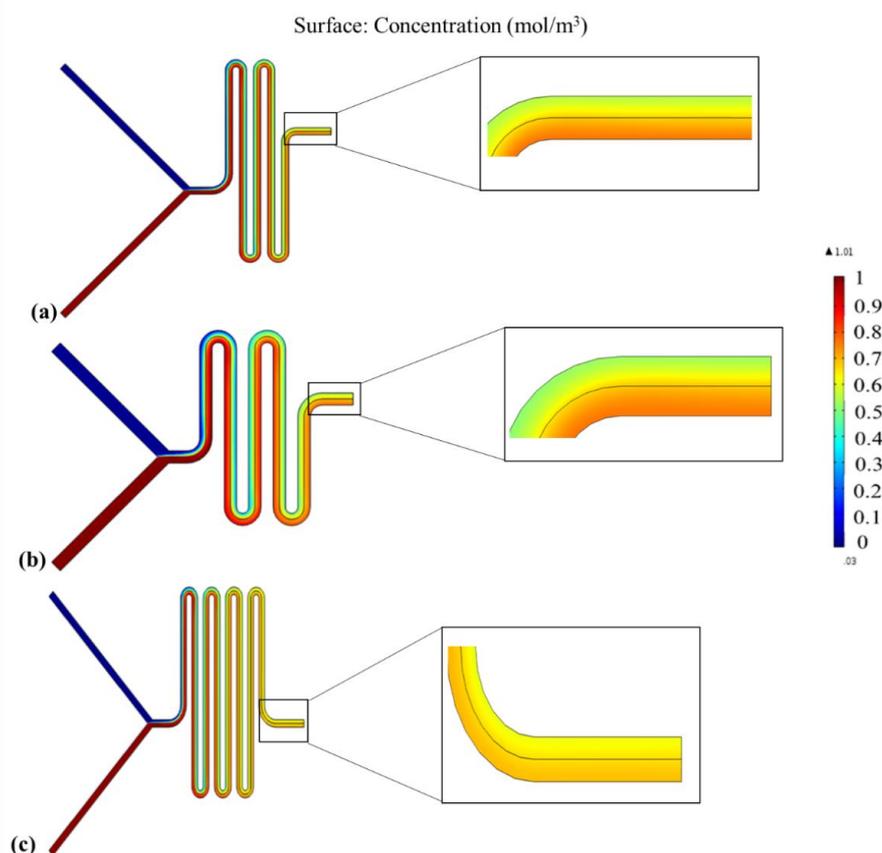


Figura 5.12 Simulação da mistura de fluidos em microcanais em forma de serpentina: (a) microcanal com comprimento de 20 mm e largura 200 µm; (b) microcanal com comprimento de 20 mm e largura 400 µm; (c) microcanal com comprimento de 40 mm e largura 200 µm. Em todos encontra-se um detalhe do final do microcanal (direita) (adaptado de [5]).

Este estudo permitiu concluir que os microcanais em serpentina com comprimento de 40 mm são a opção mais apropriada para a aplicação desejada. Esta geometria permite um comprimento de escoamento longo, essencial para assegurar a mistura completa dos fluidos por fenômenos de convecção-difusão, mantendo ainda as dimensões reduzidas do dispositivo microfluídico.

Para além da geometria e dimensões dos microcanais foi também simulada a influência do caudal na mistura dos fluidos. Assim, além dos caudais apresentados na figura 5.10 (2 $\mu\text{L}/\text{min}$ numa das entradas do microcanal e 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ na outra), foi estudada uma combinação de caudais alternativa: 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$ numa das entradas do microcanal e 2,4 $\mu\text{L}/\text{min}$ na outra, tendo sido obtido um perfil de mistura semelhante ao observado nas figuras 5.11 e 5.12. Deste modo, os resultados demonstraram que microcanais em serpentina de comprimento longo asseguram a mistura completa dos fluidos, independentemente do caudal.

5.4.2 Fabrico do dispositivo microfluídico

Os resultados das simulações permitiram obter a melhor geometria e dimensão dos microcanais para posterior fabrico do dispositivo em PDMS. Para o seu fabrico utilizaram-se técnicas de litografia suave, nomeadamente, moldagem por réplica. Esta técnica começa pela criação de uma réplica através de um molde a partir do qual é possível replicar estruturas, pelo que, por vezes, ela é limitada pela disponibilidade de moldes apropriados [9]. Em geral, os moldes utilizados para a obtenção de estruturas em PDMS são fabricados por técnicas fotolitográficas ou por micromaquinagem. A fotolitografia é o método mais conveniente para o fabrico de padrões complexos e de pequenas dimensões (espessuras abaixo de 600 μm) enquanto a micromaquinagem é utilizada para padrões mais simples e de dimensões maiores. Neste trabalho, o sistema microfluídico em PDMS foi obtido recorrendo a dois tipos de moldes: um molde em SU-8 obtido por fotolitografia e um molde em acrílico obtido por microfresagem. O molde em SU-8 apresenta o padrão que dará origem à parte superior do sistema microfluídico com o microcanal, exibindo as dimensões similares às apresentadas na figura 5.12c e uma espessura de 100 μm . Por sua vez, o molde em acrílico apresenta o padrão da câmara de reação que estará na parte inferior do sistema. O processo de fabrico proposto

para o dispositivo microfluídico inicia-se com o fabrico dos moldes que deve conter o padrão inverso da estrutura desejada.

5.4.2.1 Fabrico do molde em SU-8

O SU-8 (éter glicídico de bisfenol A) é uma resina fotossensível que tem surgido como material preferencial para o fabrico de várias microestruturas, nomeadamente, de moldes para microcanais, para microbombas, para microválvulas, para micromisturadores, entre outras [10, 11]. Este material permite a padronização de estruturas com dimensões sub-micrométricas e de elevada razão de aspeto (mais de 20) utilizando processos fotolitográficos de baixo custo [10, 12]. Uma publicação do grupo de investigação no qual se insere este trabalho [11] relata o processo fotolitográfico de baixo custo, para o fabrico de microestruturas em SU-8, com resolução de 10 μm (valor limitado pela resolução da fotomáscara). Esta resina fotossensível, está comercialmente disponível em várias formulações cobrindo espessuras de 1 a 600 μm . Apresenta boas propriedades mecânicas e químicas e é biocompatível. Para além disso, os moldes em SU-8 podem ser utilizados em processos repetidos (cerca de 50 vezes) sem degradação do molde.

O molde em SU-8 para o fabrico da parte microfluídica do imunossensor apresentado neste trabalho foi implementado utilizando a fotolitografia UV. As várias etapas envolvidas neste processo encontram-se ilustradas na figura 5.13. Esta técnica requer o fabrico de uma fotomáscara, cujo padrão desejado é, normalmente, criado com o auxílio de um programa de desenho auxiliado por computador (CAD do inglês *computer aided design*), por exemplo CorelDraw ou AutoCAD, e impresso diretamente em folhas poliméricas transparentes, obtendo-se assim o chamado “fotolito” (figura 5.14). O padrão da máscara é, posteriormente, transferido para o SU-8 quando exposto à luz UV.

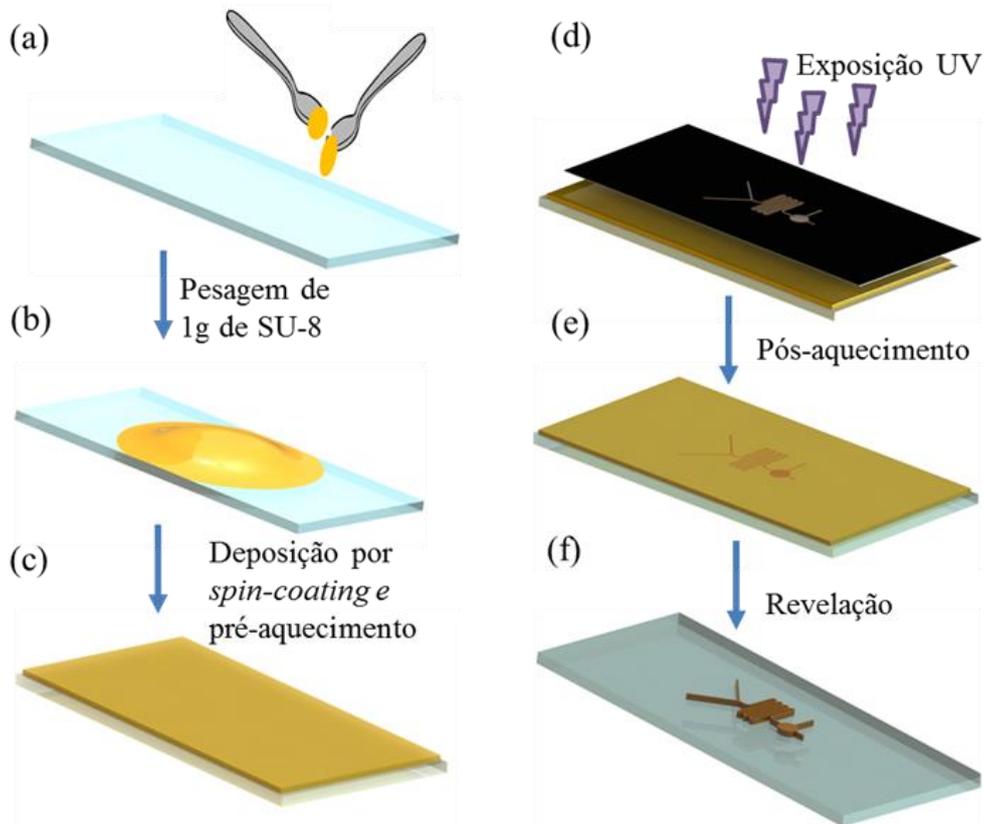


Figura 5.13 Representação esquemática das várias etapas do processo de fabrico do molde em SU-8.

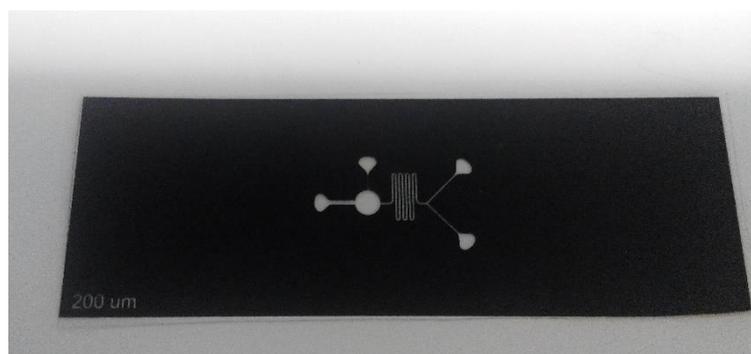


Figura 5.14 Fotomáscara utilizada na etapa de exposição UV no fabrico do molde em SU-8.

O SU-8 escolhido para o fabrico do molde foi o SU-8 100 uma vez que a espessura pretendida dos microcanais é de aproximadamente 100 µm. A escolha do substrato utilizado para o fabrico do molde recaiu em lâminas de vidro (76 × 26 mm), principalmente pelo seu

baixo custo quando comparado com *wafers* de vidro. Antes da utilização, as lâminas de vidro foram limpas com solventes (tais como o álcool isopropílico-IPA), secas com um fluxo de azoto e tratadas termicamente a 200°C durante 5 min, a fim de desidratar a superfície. De seguida, depositou-se 1g de SU-8 sobre a lamina de vidro (figura 5.13 b) utilizando um *spin-coater* (*Polos 200, ATP GmbH, Bienenbüttel, Alemanha*). A deposição foi feita em dois ciclos: o primeiro ciclo é o ciclo de dispersão, que utiliza velocidades baixas para espalhar a gota de SU-8, seguido por um ciclo de rotação que permite definir a espessura da estrutura final através da velocidade de rotação utilizada. No primeiro ciclo, foi definida uma velocidade de rotação de 500 rpm, com um tempo de duração de 7 s e com uma aceleração de 300 rpm/s. Para o segundo ciclo foi definida uma velocidade de 3000 rpm com uma aceleração de 300 rpm/s durante 30 s, de modo obter a espessura de ~100 µm. Posteriormente, pré-aqueceu-se a lâmina com o SU-8, na *hot plate* (*Präzitherm type PZ28-2, 1100 W, Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf, Alemanha*), para evaporação do solvente (figura 5.13 c). Este aquecimento foi feito a duas temperaturas: a 65°C durante 25 min seguido por um aumento gradual para 95°C durante 45 min. O primeiro ciclo de 65°C garante que a evaporação do solvente é efetuada de uma forma lenta, para criar um melhor revestimento e uma boa adesão ao substrato enquanto que o segundo ciclo é responsável por densificar o SU-8. A transição de 65°C para 95°C tem de ser efetuada de uma forma gradual (a uma taxa de 2.5°C/min, por exemplo) para diminuir a tensão induzida no filme de SU-8 e garantir a evaporação total do solvente evitando a ocorrência de encolhimento e fissuras após o passo de exposição UV. A utilização de um aquecimento rápido pode levar a uma evaporação incompleta do solvente devido à formação de um filme na superfície da camada de SU-8 e, conseqüentemente, originar os problemas mencionados anteriormente.

Em todos os passos, colocou-se um recipiente escuro por cima da lâmina de vidro com SU-8 de forma a evitar que qualquer tipo de luz atinja a lâmina. Depois do pré-aquecimento deixou-se arrefecer a lâmina de vidro com o SU-8 à temperatura ambiente, durante cerca de 5 min. De seguida, o SU-8 foi exposto à radiação UV (figura 5.13 d) durante 6 min, utilizando a máscara de fotolito com o padrão do microcanal (figura 5.14). A exposição foi feita recorrendo a um equipamento normalmente utilizado para a indústria de PCB (do inglês *printed circuit board*) que é constituído por 10 lâmpadas UV de 20W, com uma gama de emissão entre 347 e 377 nm, ou seja, dentro da gama de emissão adequada para exposição do SU-8 (365nm). A energia de exposição que atinge o SU-8 é de 432 mJ/cm².

Após a etapa de exposição, o SU-8 foi colocado novamente na *hot plate* para promover a reticulação do SU-8 nas zonas expostas aos UV (figura 5.13 e). Este aquecimento, designado de pós-exposição, foi também efetuado a 65°C durante 5 min, seguido pelo aumento para 95°C durante 10 min pelo mesmo motivo apresentado para o pré-aquecimento. De seguida, a estrutura foi revelada (figura 5.13 f), utilizando o *Developer* SU-8 da *MicroChem* durante 10 min para remover o SU-8 não exposto. Finalmente o molde foi lavado com IPA e seco com azoto (figura 5.15).

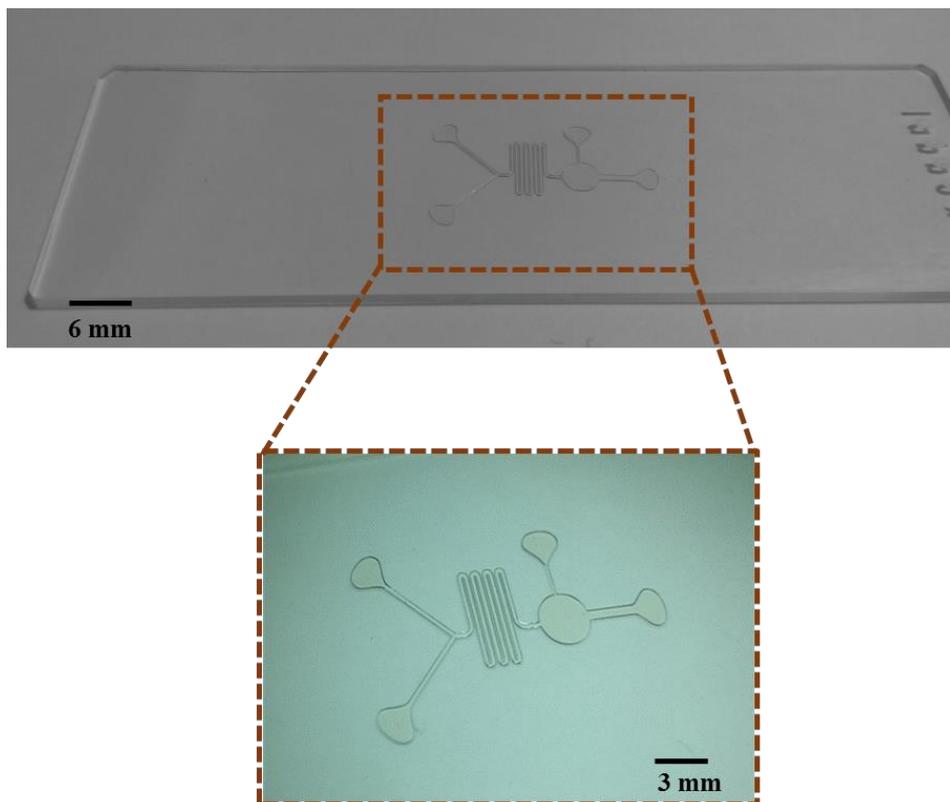


Figura 5.15 Molde em SU-8 dos microcanais com as seguintes dimensões: 5 mm de comprimento da entrada em forma de Y e 40 mm de comprimento do canal de serpentina; todo o microcanal tem uma largura de 200 μm e uma espessura de 100 μm ; a saída do microcanal tem 500 μm de largura e 3 mm de comprimento.

5.4.2.2 Fabrico do molde em acrílico

O molde em acrílico para o fabrico da câmara de reação foi obtido através de microfresagem. A microfresagem é um processo de fabrico relativamente rápido e simples. Este processo começa pelo desenho em 3-D da estrutura pretendida recorrendo a um

programa CAD que é convertido para um formato MAC (manufatura auxiliada por computador) perceptível à micromaquinação para posterior fabrico do molde. No caso do molde em acrílico, o desenho 3-D foi projetado no *software SolidWorks* (figura 5.16). O molde obtido tem a forma de um cilindro com diâmetro e altura de 3 mm. A parte superior do cilindro manteve-se intacta para não se alterar a rugosidade do acrílico ficando assim o fundo da câmara de reação com elevada transparência ótica.

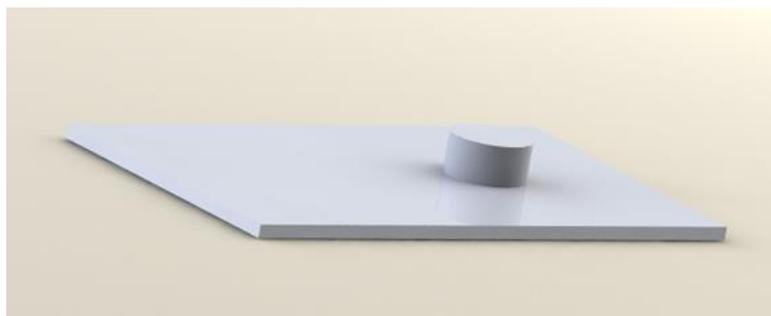


Figura 5.16 Desenho 3-D do molde em acrílico com dimensões da câmara cilíndrica de reação de 3 mm de diâmetro e de altura.

5.4.2.3 Fabrico do dispositivo em PDMS

O processo de fabrico do sistema microfluídico em PDMS foi obtido por litografia suave, tal como mencionado anteriormente, e está representado na figura 5.17. O PDMS foi preparado pela mistura do pré-polímero e do agente cura, na proporção de 10:1 em peso, do kit *Sylgard® Elastomer 184* da *Dow Corning Corporation* (nome comercial referente ao PDMS). Durante a mistura é formada uma quantidade elevada de bolhas de ar necessitando de um passo de desgaseificação. Assim, a mistura de PDMS foi colocada num sistema de vácuo, ilustrado na figura 5.18, durante 20 min. Posteriormente, derramou-se a mistura sobre os dois moldes (figura 5.17a1 e b1) e foram colocados numa placa de aquecimento a 80°C durante 2 h para a cura total do PDMS. Após este passo, deixaram-se arrefecer os moldes com PDMS curado e cortou-se o PDMS em torno da estrutura com o tamanho desejado (figura 5.17a2 e b2). Finalmente, as estruturas em PDMS foram destacadas do molde (figura 5.17a3 e b2), obtendo-se o resultado final (figura 5.17a4 e b3 e 5.19). As entradas e saídas dos microcanais foram perfurados com auxílio de uma agulha de seringa. Alguns resíduos de PDMS foram removidos da sua superfície utilizando uma fita adesiva.

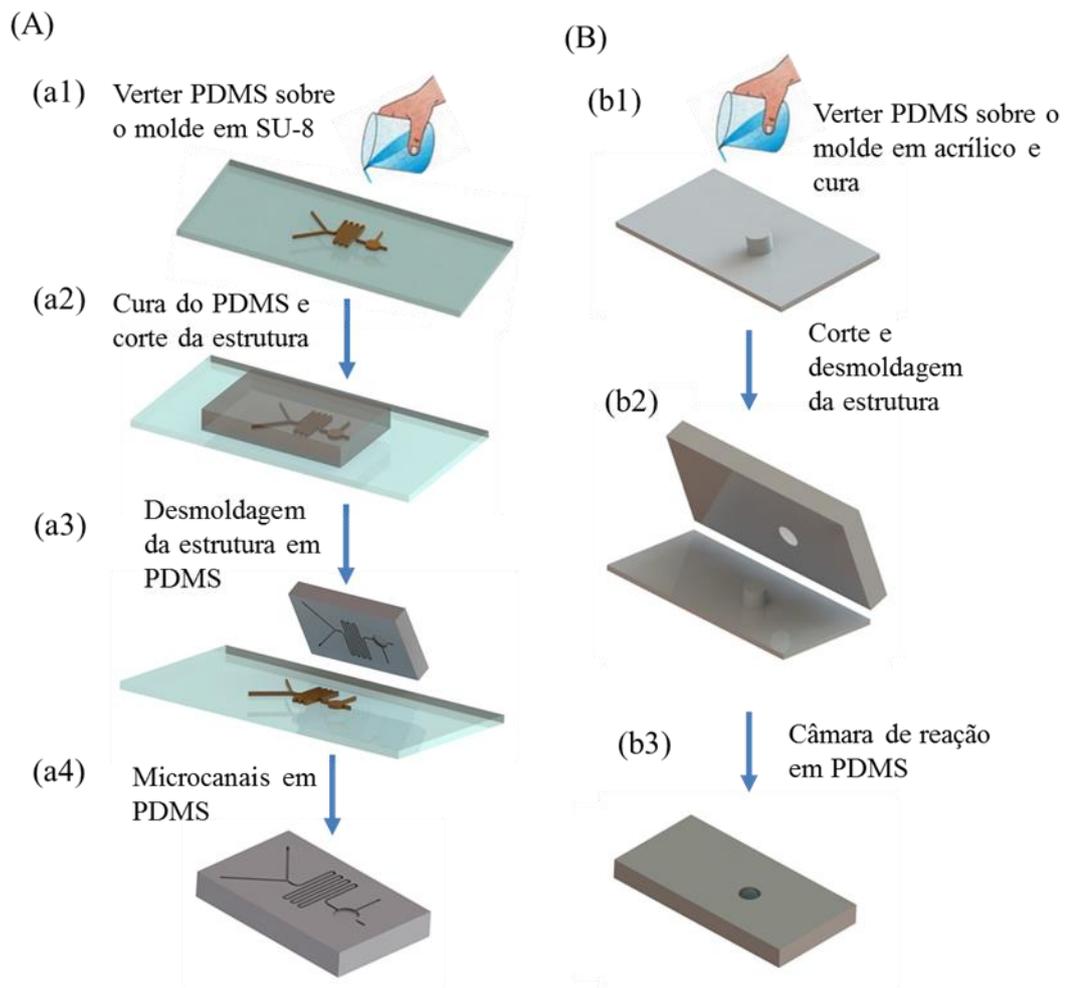


Figura 5.17 Representação esquemática do processo de fabrico do (A) microcanal e (B) câmara de reação.



Figura 5.18 Sistema de vácuo para remoção de bolhas de ar da mistura de PDMS: bomba de vácuo (esquerda) e exsiccador de vácuo (direita).

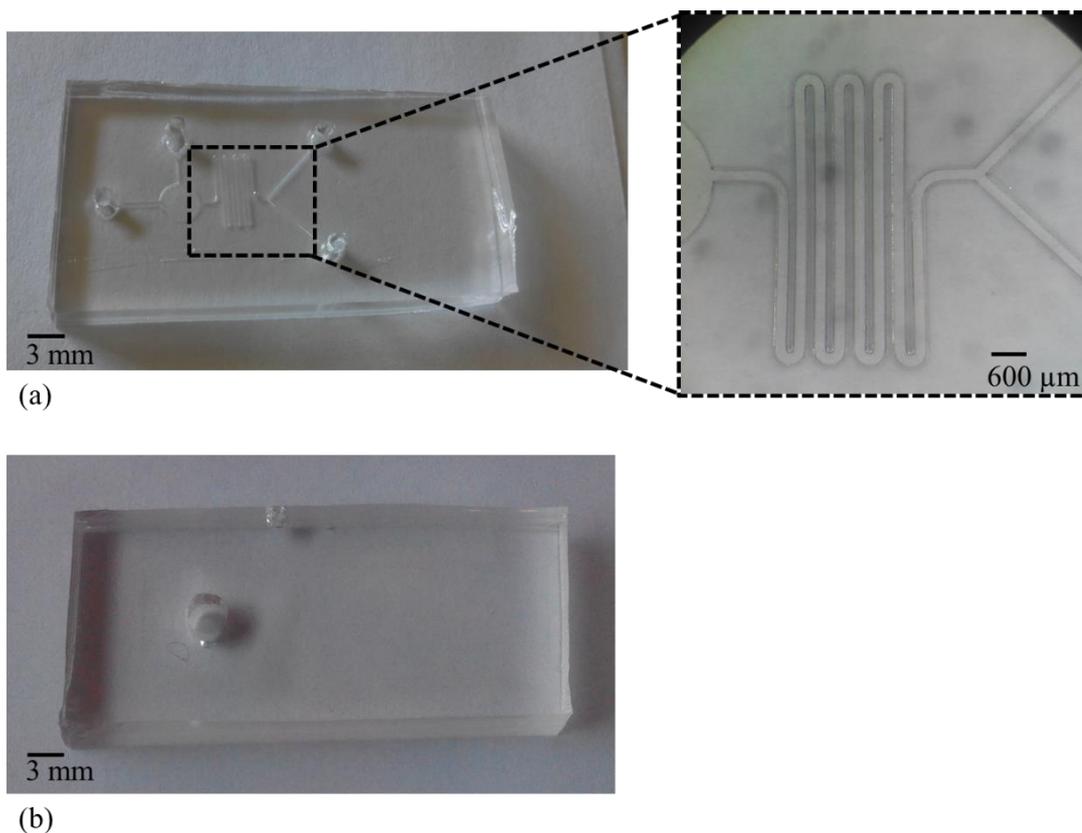


Figura 5.19 Partes do sistema microfluídico em PDMS separadas: (a) fotografia dos microcanais obtidos por molde em SU-8 (esquerda) e ampliação obtida por microscopia ótica (direita), e (b) câmara de reação obtida por molde em acrílico.

Para fechar os canais microfluídicos as estruturas em PDMS foram sujeitas ao plasma de O_2 utilizando o equipamento *Plasma Systems ZEPTO from Diener electronic*, como ilustrado na figura 5.20. Este tratamento foi efetuado durante 60 s a 100 W e com uma pressão de 0,6 mbar. Após este tratamento, as amostras são retiradas do equipamento e as superfícies oxidadas são colocadas em contacto para promover a ligação resultando no dispositivo final (figura 5.21). Para além de promover a ligação do PDMS, o plasma foi utilizado para formar grupos OH responsáveis pela ligação com o APTES para a funcionalização da câmara de reação com grupos aminas, tal como foi descrito na secção 4.2.3. Como forma de simplificar os testes nos canais microfluídicos para obtenção da curva de calibração, foi utilizado um adaptador de acrílico (figura 5.22), responsável por pressionar as duas camadas do dispositivo e, conseqüentemente, obter um fecho reversível. Assim, os tratamentos e imobilização (descritos na secção 4.2.3) foram realizados apenas na câmara de reação, uma vez que esta estava acessível para colocação das soluções, utilizando

simplesmente uma pipeta, evitando a necessidade de recorrer as bombas. Devido à necessidade de múltiplos dispositivos microfluídicos para obter a calibração, optou-se por utilizar esta estratégia para minimizar o tempo exigido em cada teste.



Figura 5.20 Equipamento utilizado para gerar plasma de O_2 . O equipamento é constituído por: 1) câmara de reação em aço inoxidável; 2) Botão de ligar/desligar o equipamento; 3) Indicador de pressão; 4) Temporizador; 5) Botão de ventilação; 6) Botão de ligar/desligar o gerador de plasma; 7) Botão ligar/desligar a bomba de vácuo e 8) Botão de abrir/fechar válvula do gás.

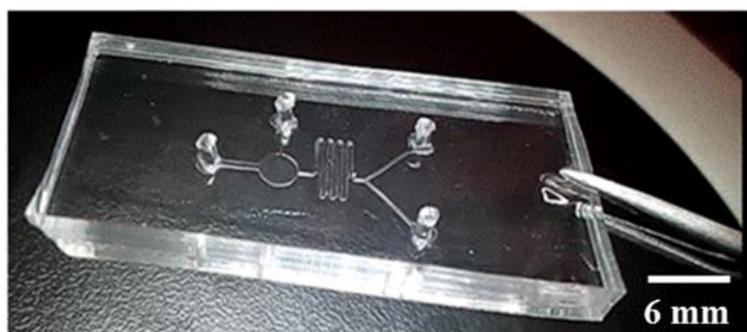


Figura 5.21 Dispositivo microfluídico em PDMS com dimensões externas de 20 mm de largura \times 30 mm comprimento \times 5 mm de altura (adaptado de [5]).

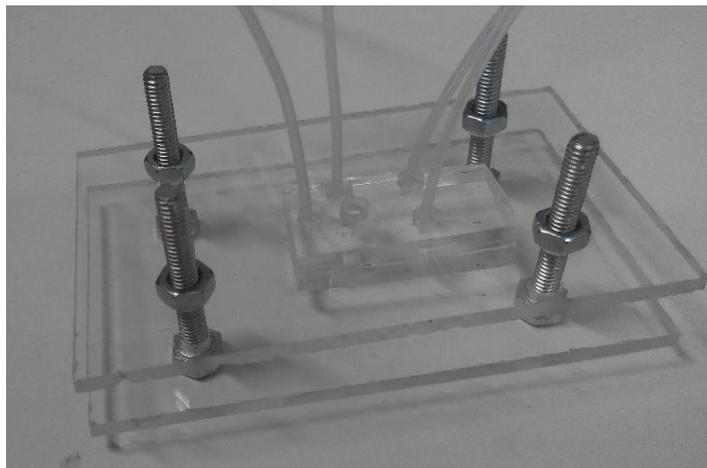


Figura 5.22 Adaptador em acrílico.

Por outro lado, quando se utilizou o fecho irreversível com plasma de O_2 o tratamento para a imobilização foi realizado recorrendo ao sistema de bombeamento descrito na secção 5.5.1. e ao microscópio ótico para garantir que o passo de imobilização ocorra apenas na câmara de reação. Para isso, foi introduzido o APTES (50% v/v) pela saída do canal até à câmara de reação e incubado durante 20 min à temperatura ambiente. De seguida, introduziu-se etanol pelas entradas para remover o excesso de APTES na câmara de reação e aqueceu-se o dispositivo a $80^\circ C$ durante 2h num forno de vácuo. Posteriormente, introduziu-se o GA, também através da saída do dispositivo, até à câmara de reação incubando-o durante 1h à temperatura ambiente. O excesso de GA foi removido com PBS que foi introduzido pelas entradas. Após estes passos, introduziram-se os Ac de revestimento pela saída apenas até à câmara de reação para que a seletividade esteja apenas nessa câmara, impedindo assim que a ligação dos Ac de captura ocorra nos microcanais. Os Ac foram incubados durante a noite à temperatura ambiente, executando-se no passo seguinte a lavagem com PBS-Tween20 (introduzido pelas entradas) para remover o excesso de Ac. Finalmente, foi introduzida a solução de bloqueio pelas entradas e incubada durante 4h à temperatura ambiente, de forma a impedir a adsorção não-específica das proteínas/Ac ao longo dos canais, executando-se no passo seguinte a lavagem com PBS -Tween20 (introduzido pelas entradas). O sistema microfluídico pode ser armazenado a $4^\circ C$ para posteriores análises ao cortisol. O tempo de armazenamento foi discutido na secção 4.4.2.

O dispositivo microfluídico de PDMS foi concebido para ser descartável para evitar interferência entre ensaios devidos a impurezas e resíduos, degradação da imobilização e

outros. Como o PDMS é um material de baixo custo e processado por uma técnica de fabrico simples, permite o desenvolvimento de dispositivos descartáveis. O fabrico do PDMS é realizado a partir de um molde SU-8 que é reutilizado várias vezes sem degradação. Estes passos de fabrico garantem a reprodutibilidade do dispositivo microfluídico a baixo custo. O sistema de bombeamento e o *chip* de deteção ótica são reutilizáveis.

5.5 Quantificação espectrofotométrica de cortisol salivar no dispositivo microfluídico

A quantificação da concentração de cortisol salivar utilizando o imunossensor microfluídico em PDMS foi medida utilizando um sistema experimental que se subdivide em 2 subsistemas:

- Sistema de bombeamento de fluidos;
- Sistema de espectrofotometria para medições de absorção ótica.

O diagrama de blocos bem como os respetivos equipamentos de toda montagem experimental encontram-se nas figuras 5.23 e 5.24, respetivamente.

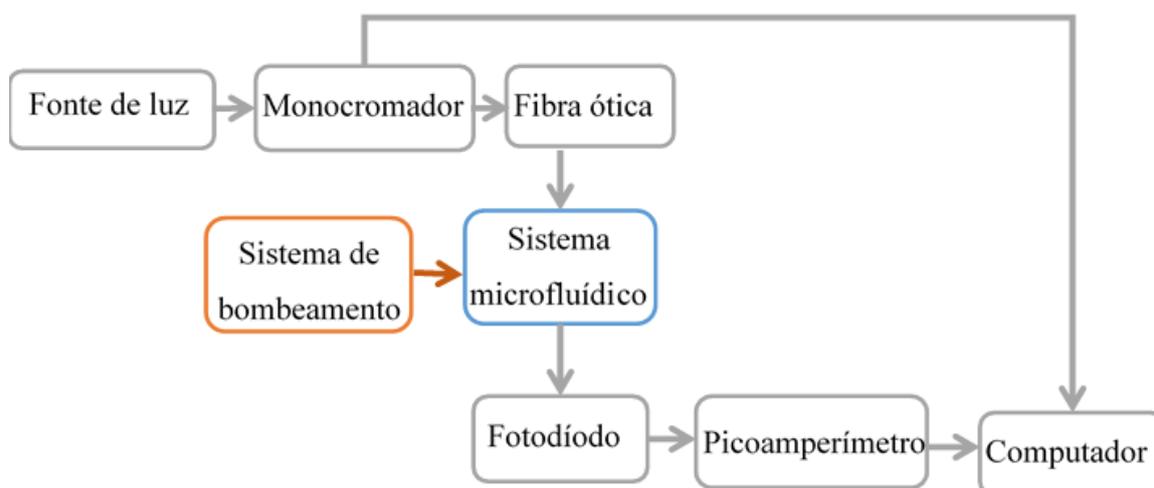


Figura 5.23 Diagrama de blocos da montagem experimental utilizado nos testes do imunossensor microfluídico para a quantificação de cortisol salivar.

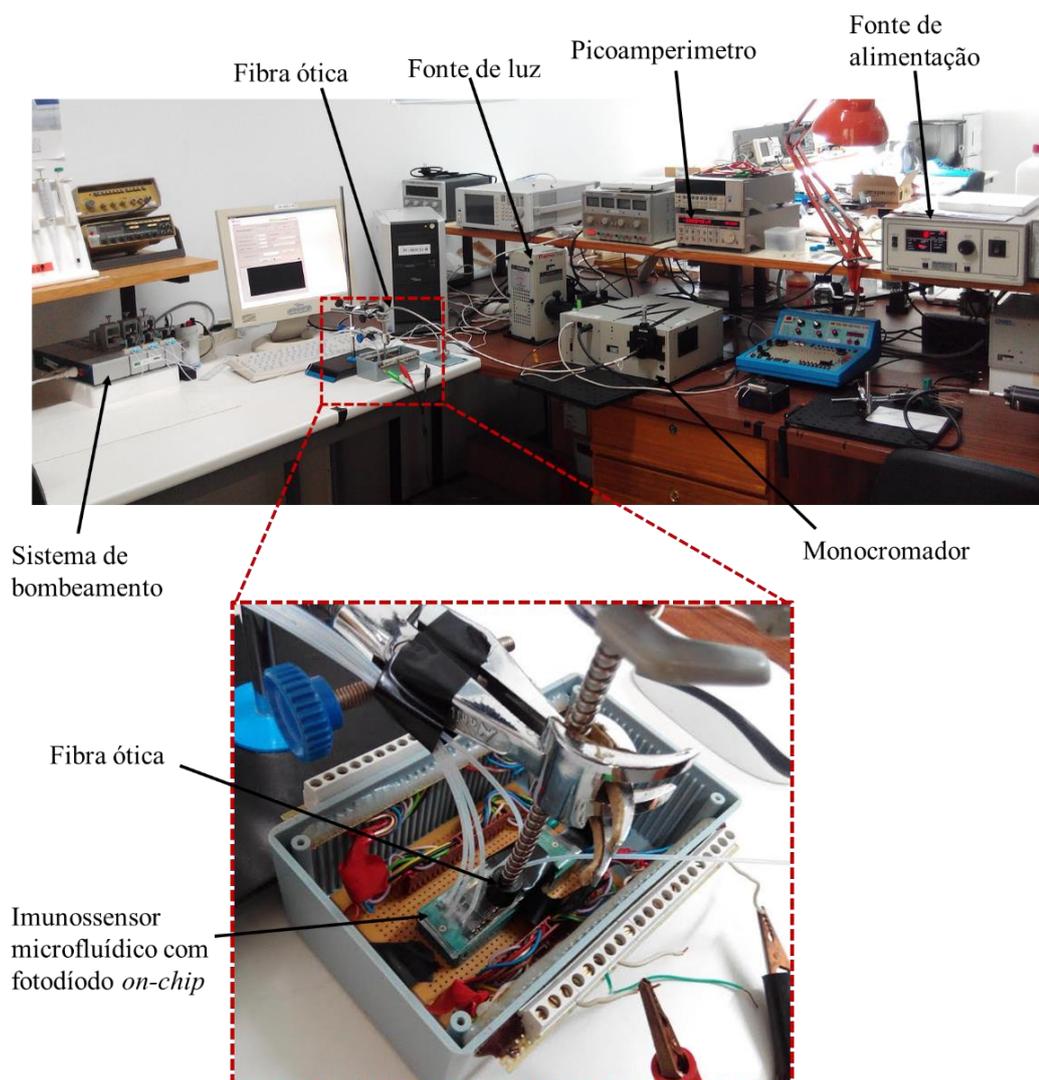


Figura 5.24 Fotografia da montagem experimental utilizado para os testes do imunossensor microfluídico para a quantificação de cortisol salivar.

5.5.1 Bombeamento dos fluidos

O dispositivo microfluídico foi testado utilizando o sistema de bombeamento de fluidos *Nemesys Syringe Pump* que controla o caudal dos fluídos no interior dos microcanais. Este sistema é constituído por três seringas, controladas individualmente através do *software neMESYS UserInterface* (figura 5.25). Esta interface possibilita a geração de caudais contínuos dos fluidos, a administração de volumes precisos, o controlo interativo manual do caudal e a geração de perfis de caudal dinâmico com base em valores tabelados ou funções matemáticas. As seringas que controlam o caudal dentro dos canais foram ligadas ao

dispositivo microfluídico utilizando tubos de politetrafluoretileno (PTFE) com diâmetro interior e exterior de 0,8 mm e 1,6 mm, respetivamente.

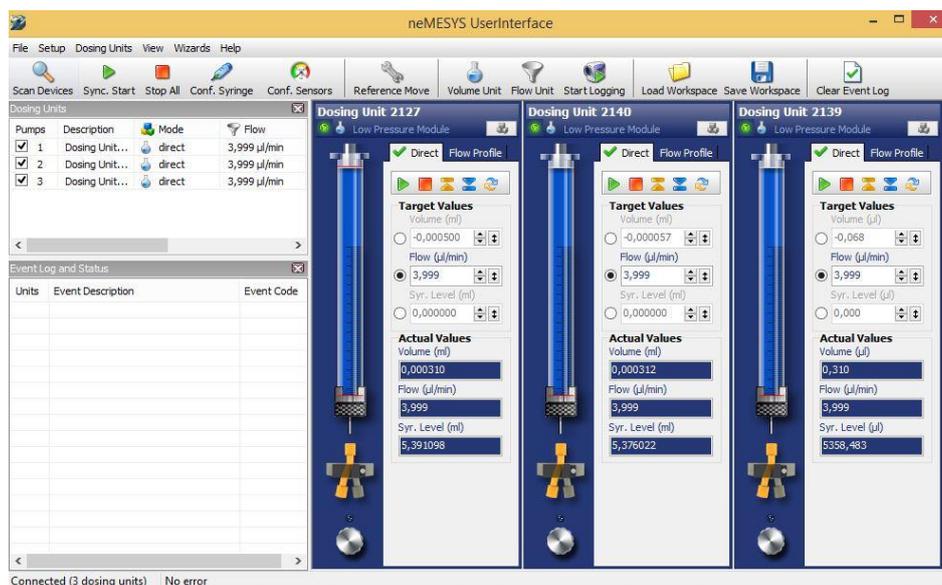


Figura 5.25 Sistema de bombeamento *Nemesis Syringe Pump* utilizado para testar o imunossensor microfluídico.

O imunoensaio no interior do dispositivo microfluídico foi feito bombeando numa das entradas 5 µl de Ac de captura com um caudal de 2 µL/min, e introduzindo-se na outra entrada 10 µL de cortisol marcado com HRP e cortisol padrão (5 µL de cada) com um caudal de 4 µL/min. Note-se que estas proporções estão de acordo com as simulações efetuadas na

secção 5.4.1. Estas soluções foram incubadas na câmara de reação do dispositivo microfluídico durante 20 min. É de notar que nos poços de PDMS o tempo de incubação, utilizando os mesmos reagentes, foi de 1 h. Esta redução de tempo deve-se à geometria em serpentina do microcanal, que faz com que haja um aumento da eficiência devido ao transporte de massa bem como devido à redução da distância de difusão. Assim, é possível obter uma aceleração na mistura dos reagentes quando comparado com os poços, onde a mistura é feita manualmente e, por isso, com menos eficiência.

Em seguida, foi bombeada pelas entradas a solução de lavagem de PBS-Tween20 com um caudal de 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1 min. A terceira entrada, que conduz à câmara de reação, foi utilizada para introduzir 10 μL de TMB, o qual foi incubado durante 10 min. Todo este processo foi realizado à temperatura ambiente. Depois disso, esta solução produziu uma cor azul dentro da câmara de reação, como ilustrado na figura 5.26a. Seguidamente, foi introduzido pela terceira entrada 5 μL de solução STOP, que, ao chegar à câmara de reação, transformou essa cor azul numa cor amarela (figura 5.26b). Esta reação colorimétrica foi medida por absorção ótica a 450 nm.

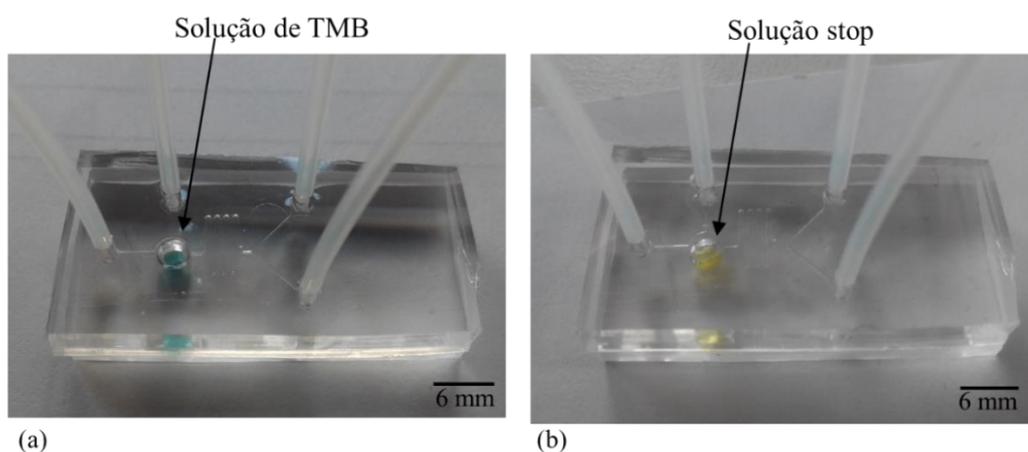


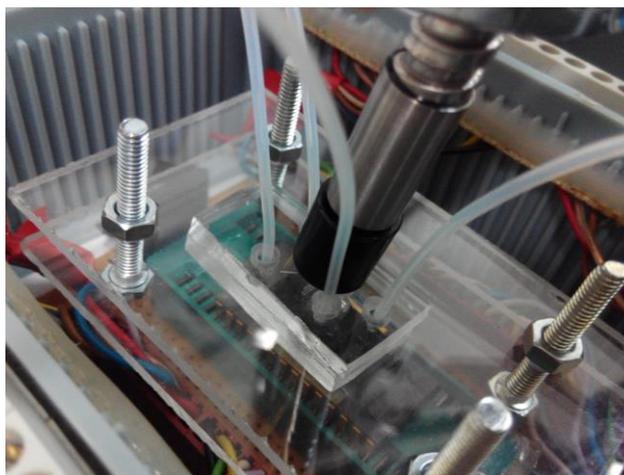
Figura 5.26 Câmara de reação ilustrando (a) a cor azul quando foi adicionada a solução de TMB e (b) a cor amarela quando foi adicionada a solução STOP (adaptado de [5]).

Em futuros desenvolvimentos, o sistema comercial de bombeamento *Nemesys Syringe Pump* poderá ser substituído por sistemas mais baratos. Para isso, poderão ser fabricados sistemas de bombeamento, de mistura e de controlo miniaturizados e reutilizáveis os quais

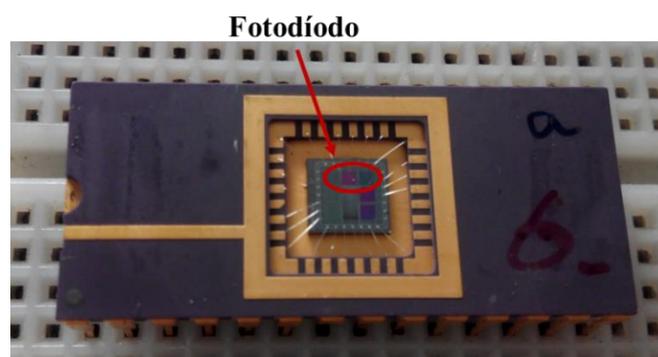
incluem os componentes de atuação (por exemplo, microbombas piezoelétricas) integrados nos sistemas eletrónicos [13-15]. Um sistema integrado permitirá o controlo preciso dos fluidos dentro dos microcanais, transportando-os desde o momento em que são injetados no dispositivo, até chegarem à microcâmara de análise. Comercialmente, já existem sistemas compactos e leves, como microbombas piezoelétricas, especificamente projetados para aplicações microfluídicas, garantindo assim sistemas portáteis [16].

5.5.2 Espectrofotometria por absorção ótica

O sistema ótico utilizado para a quantificação de cortisol no imunossensor microfluídico foi o mesmo sistema utilizado para a caracterização espectrométrica na secção 4.4. A diferença reside no facto de agora o fotodetector ser um fotodíodo de silício integrado num *chip* CMOS com vista à miniaturização do sistema de deteção. O fotodíodo utilizado nestas medições foi um fotodíodo de junção p-n, com uma área ativa de 1×1 mm desenvolvido por [17] que foi colocado por baixo da câmara de reação (figura 5.27). Este fotodíodo apresenta uma responsividade (\mathcal{R}) de 131 mA/W e uma eficiência quântica de 38% a 450 nm (figura 5.28). Note-se que este fotodíodo já existia no laboratório, é um fotodíodo otimizado para a gama espectral dos 550 nm, e por isso não está otimizado para esta aplicação, daí o valor da responsividade ser baixo.

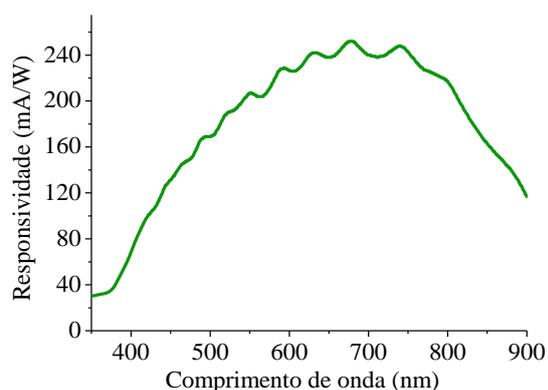


(a)

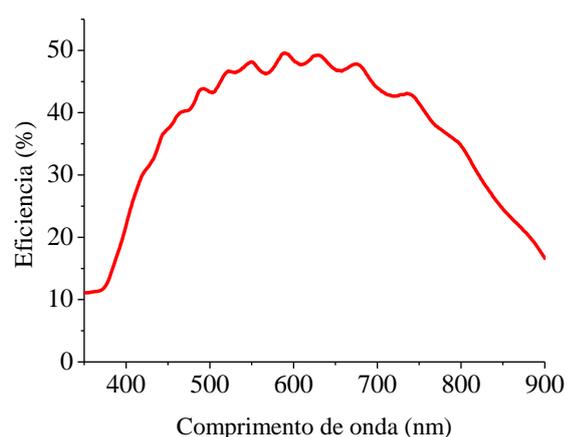


(b)

Figura 5.27 (a) Sistema ótico incluindo o imunossensor microfluídico e (b) detalhe do fotodíodo *on-chip*.



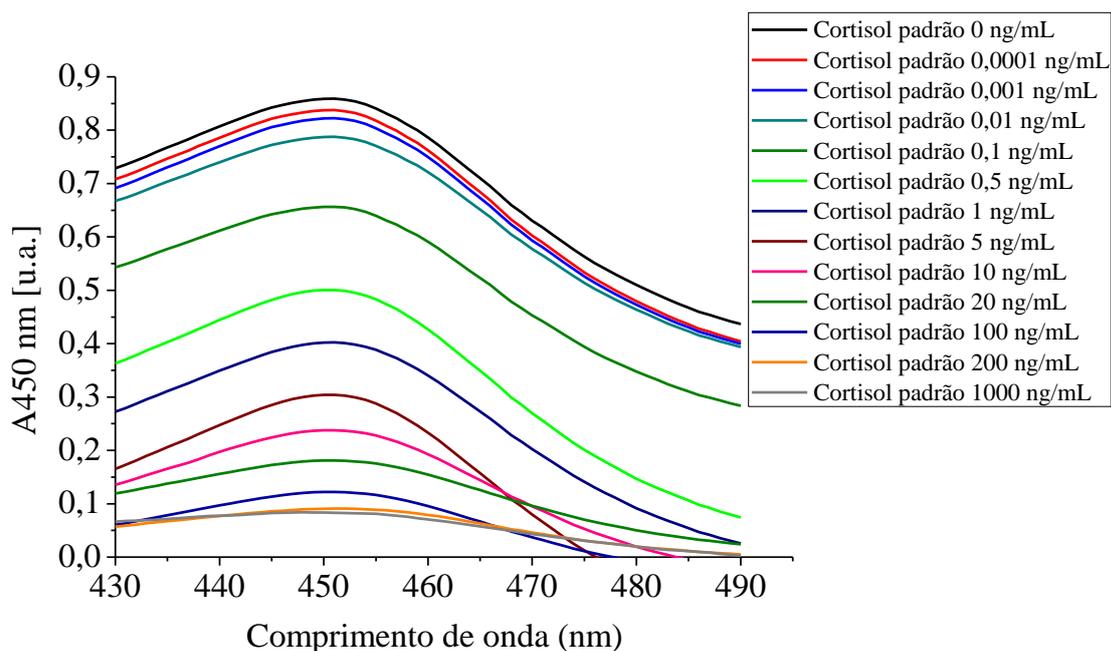
(a)



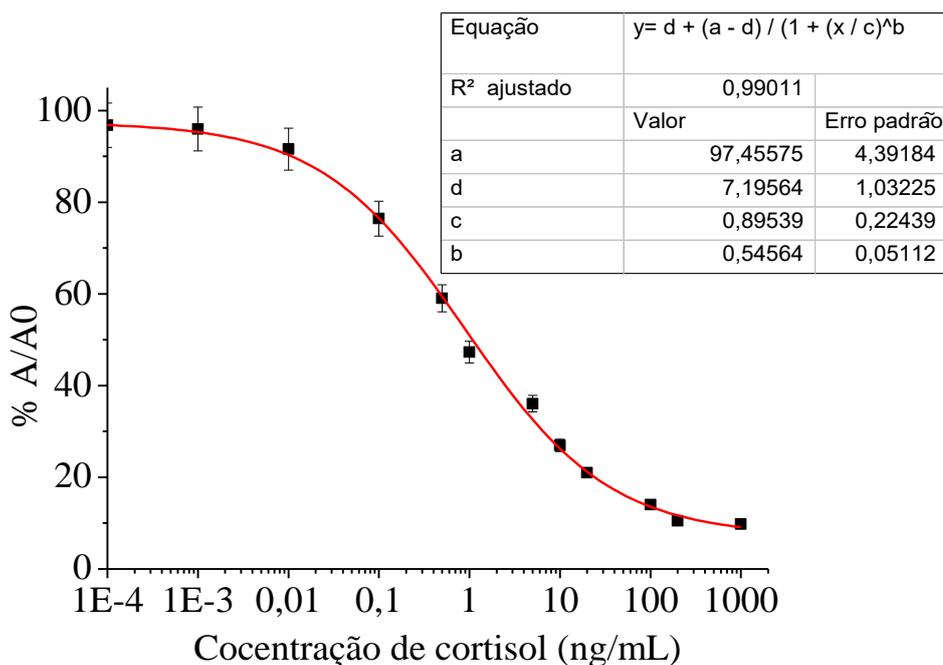
(b)

Figura 5.28 Características espectrais do fotodíodo *on-chip* com uma área ativa de 1×1 mm: (a) curva da responsividade e (b) curva da eficiência quântica.

A quantificação da concentração de cortisol salivar utilizando o imunossensor microfluídico foi realizada por absorção ótica para várias concentrações de cortisol padrão (figura 5.29a). Pela sua curva de calibração conclui-se que o LD é de 18 pg/mL e a gama de trabalho de 0,01 a 20 ng/mL (figura 5.29b). Este LD é semelhante ao obtido nos poços, o que levou a concluir que a transição para as tecnologias microfluídicas não afetou negativamente o desempenho do imunoensaio, provando que todas as otimizações nos poços em relação aos reagentes, seus volumes e tempos de incubação são um ponto de partida para ter a mesma precisão nos microcanais.



(a)



(b)

Figura 5.29 Espectro de absorvência em função do comprimento de onda no espectro de luz visível de várias concentrações de cortisol padrão e (b) curva de calibração, obtidos a partir do imunossensor microfluídico *on-chip* (adaptado de [5]).

Notavelmente, o sensor desenvolvido pode oferecer uma solução para a quantificação de cortisol com uma diminuição significativa quer do consumo de reagentes, quer do tempo

do imunoensaio, quando comparado com os métodos convencionais, conforme ilustrado na tabela 5.3. Além disso, o imunossensor microfluídico permite a quantificação de cortisol até 18 pg/mL com um tempo de análise de cerca de 35 min. Estes resultados sugerem que o dispositivo microfluídico desenvolvido é promissor para a quantificação dos níveis de cortisol salivar (valores normais entre 1-8 ng/mL). Apesar da gama linear do imunossensor ser menor que o método convencional ELISA, para os valores de concentração do cortisol salivar humano, esta gama é perfeitamente adequada. O LD pode ser ainda melhorado, uma vez que atualmente, o tamanho reduzido do fotodíodo *on-chip* levou a uma dificuldade no alinhamento ótico, erro esse que influencia a sensibilidade da análise. Futuramente, numa versão toda integrada num único dispositivo (*bonding* do *die* de microfluidos com o *die* CMOS), esse alinhamento será cumprido, uma vez que o *chip* CMOS será fabricado especificamente para este imunossensor microfluídico, ficando a câmara de reação e o fotodíodo verticalmente alinhados. Nesta situação serão também facilitadas as ligações microfluídicas com o sistema de bombeamento.

Tabela 5.3 Desempenho analítico do imunossensor microfluídico em comparação com os métodos ELISA convencionais (adaptado de [5]).

	Dispositivo microfluídico para cortisol salivar com fotodíodo <i>on-chip</i> com área ativa 1 x 1 mm	ELISA convencional
Limite de deteção (pg/mL)	18	315
Gama de trabalho (ng/mL)	0,01-20	1-500
Duração do ensaio (h)	~0,58	~14
Quantidade de cada reagente (µL)	5-20	75-200
Miniaturização	Sim	Não

5.6 Conclusão

Neste capítulo, demonstrou-se o desenvolvimento de um novo imunossensor microfluídico em PDMS para a determinação da concentração de cortisol salivar por absorção ótica, utilizando como fotodetector um fotodíodo CMOS integrado *on-chip*. A abordagem desenvolvida baseou-se num ensaio competitivo no *die* microfluídico, onde o cortisol marcado com HRP compete com o cortisol da amostra pelos locais de ligação do Ac. Numa fase inicial, o imunoenensaio foi otimizado em poços de PDMS para estimar: (1) quais as melhores condições para a funcionalização; (2) qual a melhor concentração de Ac de revestimento; (3) qual a melhor solução de bloqueio; (4) quais as melhores diluições de imunoreagentes (Ac de captura e cortisol marcado com HRP) e (5) qual o melhor tempo de incubação do imunoenensaio. As condições ótimas extrapoladas a partir dos testes nos poços de PDMS foram utilizadas nos dispositivos microfluídicos, mas com quantidades menores de reagentes/amostra (reduzindo tudo para metade). O comportamento químico do imunoenensaio desenvolvido é idêntico nas duas abordagens. Já a nível físico, a utilização do sistema miniaturizado com os microcanais ajuda a reduzir o tempo de incubação e de mistura. A geometria e a dimensão dos microcanais que asseguram uma mistura completa no imunossensor microfluídico, foi projetada através de simulação, utilizando o *software COMSOL Multiphysics*.

O imunossensor desenvolvido fornece uma alternativa para a quantificação de cortisol salivar com uma diminuição bastante significativa do tempo de análise (de cerca de 95%, executando a análise em 35 min) e do consumo de reagentes (de cerca de 90%, 20 μ l no máximo de cada reagente), quando comparado com os métodos convencionais. Além disso, o material PDMS utilizado para o *die* microfluídico possibilita um processo de fabrico fácil e de baixo custo. O imunossensor compreende uma gama linear entre 0,01-20 ng/mL e um LD até 18 pg/mL para a quantificação de cortisol salivar (95% menor que os métodos convencionais). Estes resultados mostram que o imunossensor microfluídico é muito promissor para aplicações POC de quantificação rápida dos níveis de cortisol salivar, proporcionando um primeiro passo importante para monitorizar a secreção de cortisol durante o ciclo circadiano. Assim, a plataforma desenvolvida suporta um procedimento simplificado com redução do tempo de ensaio, consumo de amostra/reagentes e melhoria na eficiência da

reação. Mais importante, a portabilidade oferecida pelo seu tamanho compacto é muito importante para aplicações POC.

Referências

- [1] K. N. Han, C. A. Li, and G. H. Seong, “Microfluidic chips for immunoassays,” *Annual review of analytical chemistry*, vol. 6, pp. 119-141, 2013.
- [2] C.-C. Lin, J.-H. Wang, H.-W. Wu, and G.-B. Lee, “Microfluidic immunoassays,” *Journal of the Association for Laboratory Automation*, vol. 15, no. 3, pp. 253-274, 2010.
- [3] A. H. Ng, U. Uddayasankar, and A. R. Wheeler, “Immunoassays in microfluidic systems,” *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 397, no. 3, pp. 991-1007, 2010.
- [4] N. Bojorge Ramírez, A. Salgado, and B. Valdman, “The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives,” *Brazilian journal of chemical engineering*, vol. 26, no. 2, pp. 227-249, 2009.
- [5] V. Pinto, P. Sousa, S. Catarino, M. Correia-Neves, and G. Minas, “Microfluidic immunosensor for rapid and highly-sensitive salivary cortisol quantification,” *Biosensors and Bioelectronics*, 2016.
- [6] J. Horák, “Microfluidic immunosensor for point-of-care diagnostics,” University of Freiburg, 2013.
- [7] D. A. Armbruster, and T. Pry, “Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation,” *Clin Biochem Rev*, vol. 29, no. Suppl 1, pp. S49-52, 2008.
- [8] A. M. Sesay, L. Micheli, P. Tervo, G. Palleschi, and V. Virtanen, “Development of a competitive immunoassay for the determination of cortisol in human saliva,” *Analytical biochemistry*, vol. 434, no. 2, pp. 308-314, 2013.
- [9] A. D. Stroock, and G. M. Whitesides, “Components for integrated poly (dimethylsiloxane) microfluidic systems,” *Electrophoresis*, vol. 23, no. 20, pp. 3461-3473, 2002.
- [10] P. Sousa, L. Silva, V. Pinto, L. Goncalves, and G. Minas, “A thin-film aluminum strain gauges array in a flexible gastrointestinal catheter for pressure measurements,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 26, no. 8, pp. 084011, 2016.
- [11] V. C. Pinto, P. J. Sousa, V. F. Cardoso, and G. Minas, “Optimized SU-8 processing for low-cost microstructures fabrication without cleanroom facilities,” *Micromachines*, vol. 5, no. 3, pp. 738-755, 2014.

- [12] V. F. Cardoso, A. R. Machado, V. C. Pinto, P. J. Sousa, G. Botelho, G. Minas, and S. Lanceros-Méndez, “From superhydrophobic-to superhydrophilic-patterned poly (vinylidene fluoride-co-chlorotrifluoroethylene) architectures as a novel platform for biotechnological applications,” *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 2016.
- [13] S. Catarino, L. R. Silva, P. Mendes, J. Miranda, S. Lanceros-Mendez, and G. Minas, “Piezoelectric actuators for acoustic mixing in microfluidic devices—Numerical prediction and experimental validation of heat and mass transport,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 205, pp. 206-214, 2014.
- [14] S. O. Catarino, V. C. Pinto, P. J. Sousa, R. Lima, J. M. Miranda, and G. Minas, "A numerical and experimental study of acoustic micromixing in 3D microchannels for lab-on-a-chip devices”, *38th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 16-20 August 2016, pp. 5660-5663, 2016.
- [15] J. Rife, M. Bell, J. Horwitz, M. Kabler, R. Auyeung, and W. Kim, “Miniature valveless ultrasonic pumps and mixers,” *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 86, no. 1, pp. 135-140, 2000.
- [16] DesignHMI: Bartels Micropump For Medical & Other Applications. (20/04/2016). Available: <http://www.designhmi.com/2015/03/09/bartels-micropump-for-medical-other-applications/>.
- [17] G. M. H. Minas, “Microsistema laboratorial para análise de fluidos biológicos,” Universidade do Minho, 2004.

6 Conclusões e trabalho futuro

Neste capítulo são apresentadas as principais conclusões do presente trabalho assim como sugestões que poderão contribuir para futuros desenvolvimentos.

6.1 Conclusões

Esta tese descreve todo o processo de desenvolvimento, fabrico, otimização e resultados experimentais do imunossensor microfluídico integrado com técnicas de detecção ótica para quantificação de cortisol salivar. O cortisol é uma hormona importante para o diagnóstico de *stress* crónico e de várias doenças que necessita de uma monitorização sistemática ao longo do seu ciclo circadiano. Assim, o principal objetivo consiste no desenvolvimento de uma plataforma de monitorização de cortisol a baixo custo, fácil de utilizar, sensível, com redução dos consumos de reagentes/amostra e dos tempos de análise, para além de utilizar um fluido biológico com um método de recolha não invasivo, indolor e de simples recolha sem necessidade de pessoal especializado, como é o caso da saliva. Desta forma, a saliva representa o fluido biológico que poderá ser utilizado em qualquer situação,

com a melhor relação custo/benefício para estudos de monitorização populacionais. A utilização conjunta de uma plataforma com estas características permite direcionar a aplicação para um dispositivo de quantificação autónomo que pode ser adaptado para uso de diagnóstico em situações desprovidas de equipamentos sofisticados, especialmente quando se pretende uma aplicação POC.

O imunossensor desenvolvido é baseado na tecnologia de reconhecimento extremamente específica utilizando Ac. As tecnologias baseadas em Ac, atualmente ainda são preferidas em detrimento de estratégias baseadas em aptameros, principalmente quando se pretende um imunossensor microfluídico POC com vista a poder ser um dispositivo comercial. Estas técnicas estão bem estabelecidas e encontram-se comercialmente disponíveis numerosos imunoreagentes para uma ampla gama de vários analitos. Para além disso, os Ac têm uma afinidade de ligação superior aos aptameros. Assim foram estudados vários métodos de imobilização de Ac na superfície do material a ser utilizado para o fabrico do *die* microfluídico. Após o estudo dos materiais e dos métodos de deteção tendo em conta o desenvolvimento de um dispositivo de baixo custo, foi selecionado o PDMS como material de fabrico para o protótipo do *die* microfluídico. O PDMS é frequentemente utilizado como material de base para a fabricação de *dies* microfluídicos pelas suas múltiplas vantagens, nomeadamente transparência ótica o que o torna compatível com as técnicas de deteção ótica, e lhe fornece características como baixo custo, flexibilidade e biocompatibilidade. Para além disso, o fabrico de *dies* microfluídicos em PDMS utiliza técnicas bem estabelecidas, sendo apenas necessário um molde que pode ser reutilizado inúmeras vezes sem degradação. Em termos de custo para o material do *die* de microfluídicos poderia ser utilizado o papel (material mais económico). No entanto, ele apresenta várias desvantagens, especialmente no que diz respeito à retenção ou difusão dos reagentes e da amostra para o interior da matriz de celulose, que é extremamente porosa, e à evaporação das amostras/reagentes a partir dos canais abertos que levam a um consumo excessivo. Estas limitações podem levar a que os dispositivos microfluídicos baseados em papel não sejam os preferidos para a quantificação de analitos de pequeno tamanho e com baixa concentração, como é o caso do cortisol salivar. Mais ainda, os métodos de deteção apropriados para este tipo de dispositivos são limitados, especialmente as técnicas óticas, uma vez que as fibras do papel originam uma elevada dispersão da luz. Por todas as razões enumeradas, o PDMS foi o material escolhido para o fabrico do dispositivo microfluídico.

Após o estudo dos métodos de imobilização de Ac na superfície do PDMS, concluiu-se que o método de imobilização covalente por funcionalização da superfície do PDMS com grupos amina apresentou um grande potencial para ser utilizado no imunossensor microfluídico, devido à elevada estabilidade, à simplicidade de processamento bem como à elevada eficiência de imobilização.

O imunossensor desenvolvido fornece uma alternativa para a quantificação de cortisol salivar por absorção ótica. As suas vantagens quando comparado com os métodos bem estabelecidos de análises clínicas (designados de *gold-standard*), incluem: (1) diminuição do consumo de reagente (5-20 μL) e tempo de análise de 35 min; (2) baixo custo e facilidade de fabrico e baixo custo por teste; (3) LD de 18 pg/mL; (4) gama linear de deteção entre 0,01-20 ng/mL. Estes resultados demonstram a viabilidade do imunossensor desenvolvido para a monitorização da secreção do cortisol salivar no seu ciclo circadiano. Desta forma, este trabalho apresenta uma nova perspectiva para a quantificação de cortisol salivar através de um procedimento simplificado com possibilidade de ser utilizado em aplicações POC, especialmente devido ao seu tamanho compacto que lhe confere portabilidade. Apesar disso, necessitam ainda de ser realizados mais estudos de forma a desenvolver uma plataforma totalmente autónoma que inclua processamento, manipulação e análise da amostra de saliva. Na secção seguinte serão abordadas, com mais pormenor, as principais limitações que ainda necessitam de ser ultrapassadas para a obtenção de um dispositivo totalmente funcional.

6.2 Trabalho futuro

Esta secção apresenta propostas de trabalho futuro, complementar ao apresentado, e que poderão contribuir para a melhoria do imunossensor desenvolvido.

Neste trabalho apenas foram utilizadas soluções de cortisol padrão, não sendo possível prever a influência da matriz da saliva no imunossensor desenvolvido. Assim, é de elevado interesse validar o imunossensor com amostras reais de saliva e comparar os resultados obtidos com os dos kits comerciais de ELISA.

O imunossensor desenvolvido poderá também ser melhorado integrando os sistemas de tratamento, manipulação e movimentação da saliva para quantificação de cortisol. Como foi referido no capítulo 2, a saliva apresenta uma elevada viscosidade que pode torná-la difícil de utilizar em dispositivos microfluídicos. Deste modo, o imunossensor microfluídico poderá ser complementado com um sistema de tratamento da amostra que possa ser integrado na plataforma microfluídica desenvolvida. São exemplos as abordagens baseadas em filtro-H ou filtros de membranas, as quais podem permitir reduzir a viscosidade da saliva bem como remover alguns detritos alimentares.

Relativamente à movimentação dos fluidos, o sistema comercial de bombeamento utilizado, *Nemesys Syringe Pump*, deverá ser substituído por sistemas compactos, portáteis e mais baratos. Para isso, poderão ser fabricados sistemas de bombeamento, de mistura e de controlo miniaturizados e reutilizáveis, através da utilização de, por exemplo, microbombas piezoelétricas integradas com o sistema eletrónico, ficando apenas o *die* microfluídico descartável. Para além disso, o desenvolvimento de um sistema de análise totalmente integrado facilita o processo de alinhamento da câmara de reação do *die* microfluídico com o fotodíodo do *die* CMOS bem como facilita as ligações microfluídicas com o sistema de bombeamento.

O imunossensor desenvolvido deverá ser estudado em termos de estabilidade a longo prazo, uma vez que neste trabalho esta estabilidade foi estudada apenas para 3 semanas.