UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Thiago Mazzu do Nascimento

**Plataformas de baixo custo à base de papel para testes
imunodiagnósticos e enzimáticos**

2016
São Carlos

Thiago Mazzu do Nascimento

**Plataformas de baixo custo à base de papel para testes
imunodiagnósticos e enzimáticos**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e
Biológica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

**2016
São Carlos**

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Nascimento, Thiago Mazzu do

Plataformas de baixo custo à base de papel para testes imunodiagnósticos e enzimáticos / Thiago Mazzu do Nascimento. — São Carlos, 2016.
95 f.

Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

1. Imunoensaio. 2. Química analítica. 3. Imunologia clínica. 4. Bioquímica clínica. 5. Enzimas. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha namorada Mara, que com muito amor sempre esteve ao meu lado.

Aos meus pais, ao meu irmão e a minha sogra, que embora não soubessem exatamente o que eu estava fazendo eles me apoiaram.

Ao Prof. Dr. Emanuel Carrilho por ter me acolhido desde a iniciação científica, pela orientação, e pela liberdade em desenvolver todos os experimentos.

Ao Adriano (Draculino) e ao Giorgio (Monstro) pela forte amizade construída ao longo dos anos. Do Giorgio, além da valiosa amizade foi quase uma coorientação.

Ao Paulo e ao Jonatan do nosso Grupo - o BioMicS - por todos os experimentos que envolveram eletroforese capilar.

Ao grupo BioMicS.

Ao Prof. Dr. Laudemir, ao João e ao Daniel do Grupo de Materiais Coloidais/IQSC pela valiosa ajuda sobre as nanopartículas de ouro e suas aplicações.

Ao Prof. Dr. Gustavo Batista e ao Diego do ICMC na colaboração com a escrita da Macro e nas discussões estatísticas.

Ao Prof. Dr. Luis A. Milan do Departamento de Estatística da Ufscar pela valiosa colaboração nas análises estatísticas.

A Prof. Dra. Fabiana Donofrio que me acompanhou e me ajudou desde a graduação, colaborando para o sucesso com os imunoensaios em papel.

Ao Laboratório Maricondi e a WAMA Diagnóstica por todo o suporte, em especial ao Beto, João, Alessandro, Lucas e ao Wagner Maricondi.

A todos os funcionários do IQSC.

Aos demais amigos que me apoiaram.

À FAPESP pela bolsa de Doutorado concedida (processo 2011/13997-8).

Epígrafe

“Água mole em pedra dura, tanto bate até que fura”. Sabedoria popular.

Resumo

Os imunoensaios e os ensaios bioquímicos são amplamente utilizados em clínica médica. Os dispositivos fabricados em papel são ideais para serem aplicados em regiões carentes devido ao seu baixo custo, portabilidade e a possibilidade da produção local dos dispositivos. Os imunoensaios em papel se mostraram extremamente versáteis, capazes de detectar diferentes analitos: primeiramente desenvolvemos um ensaio imunocromatográfico que permitiu a detecção de IgG de coelho em um dispositivo fabricado via impressão com cera, mostrando que esse protótipo tem potencial de ser aplicado em diferentes ensaios imunológicos. O segundo ensaio em plataforma de papel foi um teste enzimático colorimétrico para detecção de um potencial marcador de tumor de câncer de próstata, a sarcosina (sarcosina oxidase, peroxidase e o indicador redox (ABTS)), apresentando boas figuras de mérito ($LOD = 0,21 \text{ mmol L}^{-1}$; $LOQ = 0,61 \text{ mmol L}^{-1}$, $r^2 = 0,890$). O terceiro dispositivo em papel foi capaz de detectar toxoplasmose (IgG contra *Toxoplasma gondii* em amostras de soro humano). A avaliação da performance do teste apresentou um $cut-off = 21,73 \text{ U.A}$, sensibilidade = 0,96, especificidade = 0,87, $AUC = 0,97$, além da definição de uma zona cinza utilizando uma tolerância em porcentagem sobre a $cut-off$ de 15%. Desenvolvemos também uma macro no Microsoft Excel[®] que calcula a acurácia do teste diagnóstico, *m-Acuraccy*, sendo uma nova forma de se calcular a acurácia com grande inovação na clínica médica, a qual nos forneceu um valor de 0,88 para o teste de toxoplasmose. O quarto dispositivo criado permitiu a detecção do marcador tumoral CEA através de um ensaio do tipo sanduíche, com um $cut-off = 68,28 \text{ U.A}$, sensibilidade = 0,86, especificidade = 1, $AUC = 0,97$. A tolerância em porcentagem sobre a $cut-off$ para a criação da zona cinza foi de 12%, e uma acurácia de 0,90. Pela primeira vez, foi aplicada essa completa avaliação estatística em testes em papel. Torna-se evidente o grande potencial que os dispositivos fabricados em papel possuem como novas ferramentas diagnósticas.

Abstract

Immunoassays and bioassays are broadly used in clinical medicine. Paper-based devices are ideal to be used in remote regions due to their low-cost, portability and the possibility of *in loco* manufacture. Paper-based immunoassays are extremely versatile, capable of detecting distinct analytes: initially we have developed an immunochromatographic assay to detect rabbit IgG in a paper-based device fabricated using wax printing technology, and we have shown that this prototype has potential to be applied in distinct immunoassays. The second developed paper-based device was an enzymatic colorimetric assay for the detection of a potential prostate cancer biomarker – sarcosine (sarcosine oxidase, peroxidase and redox indicator (ABTS)), obtaining good figures of merit ($\text{LOD} = 0.21 \text{ mmol L}^{-1}$; $\text{LOQ} = 0.61 \text{ mmol L}^{-1}$, $r^2 = 0.890$). The third developed paper-based device was capable of detecting toxoplasmosis (IgG against *Toxoplasma gondii* in human serum samples). The performance evaluation showed a cut-off = 21.73 A.U., sensitivity = 0.96, specificity = 0.87, AUC = 0.97, besides defining the gray zone as the zone comprehended in-between 15% over the cut-off value. We also have developed a Microsoft Excel[®] macro to calculate diagnostic test's accuracy – m-Accuracy – that is a new way to calculate accuracy with great innovation for clinical medicine, which resulted in an accuracy of 0.88 for toxoplasmosis assay. The fourth developed paper-based device was used to detect CEA tumor biomarker using a sandwich ELISA assay, with a cut-off = 68.28 A.U, sensitivity = 0.86, specificity = 1.0, AUC = 0.97. The defined gray zone to this test was the zone comprehended in-between 12% over the cut-off value, with an accuracy of 0.90. To the best of our knowledge, this is the first complete statistical evaluation of paper-based diagnostic devices, which showed the great potential of this technology to be used as a new point-of care diagnostic tool.

Lista de ilustrações

Capítulo 1

Ensaio imunológico de fluxo lateral em papel com nanopartículas de ouro

<i>Figura 1.1- Esquema das etapas envolvidas na fabricação de dispositivos em papel.</i>	<i>9</i>
<i>Figura 1.2 - Coloração das suspensões coloidais de nanopartículas de ouro.</i>	<i>11</i>
<i>Figura 1.3 - Micrografia das nanopartículas recém-sintetizadas.</i>	<i>12</i>
<i>Figura 1.4 - Distribuição média do diâmetro das AuNPs sintetizadas pelo método de Turkevich e pelo método de Martin</i>	<i>13</i>
<i>Figura 1.5 - Espectroscopia UV-vis de nanopartículas de ouro</i>	<i>14</i>
<i>Figura 1.6 - Espectros UV-Vis das soluções coloidais de nanopartículas de ouro.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 1.7 - Ensaio de fluidez em microcanais lineares em diversos valores de largura do canal após impressão (nominal) e após permeação da cera pelo papel com aquecimento.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 1.8 - Ensaio de fluxo lateral para detecção de IgG de coelho.....</i>	<i>18</i>

Capítulo 2

Ferramentas analíticas para detecção do potencial biomarcador de câncer de próstata - a sarcosina

<i>Figura 2.1 – Representação gráfica do número de internações de pacientes com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016 agrupados por localizações gerais dos tumores.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.2 – Representação gráfica do número de óbitos de pacientes internados com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016 agrupados por localizações gerais dos tumores.</i>	<i>37</i>
<i>Figura 2.3 – Mecanismo de elevação na concentração de sarcosina.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 2.4 – Esquema das etapas envolvidas na fabricação de microplacas em papel.</i>	<i>34</i>
<i>Figura 2.5 – Etapas do ensaio colorimétrico para detecção de sarcosina... ..</i>	<i>36</i>
<i>Figura 2.6 – Avaliação da especificidade sarcosina oxidase para a sarcosina</i>	<i>40</i>
<i>Figura 2.7– Parâmetros analíticos obtidos para análise sarcosina no ensaio enzimático baseado em papel.....</i>	<i>43</i>

<i>Figura 2.8 – Seleção da concentração do eletrólito de corrida (BGE) para a análise por CE-C4D de sarcosina na presença dos 12 aminoácidos normalmente encontrados na urina humana..</i>	<i>46</i>
<i>Figura 2.9 – Parâmetros analíticos obtidos para análise sarcosina por CE-C⁴D..</i>	<i>57</i>

Capítulo 3

Imunoensaios enzimáticos em papel

<i>Figura 3.1 – Esquema da sequência de todas as etapas envolvidas no ensaio de ELISA em papel para detecção de toxoplasmose....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 3.2 – Esquema da sequência de todas as etapas envolvidas no ensaio de ELISA em papel para detecção do marcador tumoral CEA.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 3.3 – Fotografia dos microdispositivos em papel após impressão com cera com posterior aquecimento pela prensa térmica</i>	<i>66</i>
<i>Figura 3.4 – Comparação ELISA x ELISA em papel....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 3.5 – Métodos para determinação do cut-off para o ELISA em papel para detecção de toxoplasmose.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 3.6 – Correlação diagnóstica entre ELISA comercial x ELISA em papel para observação de resultados falsos positivos e falsos negativos.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 3.7 – Correlação diagnóstica entre ELISA comercial x ELISA em papel com aplicação de níveis variados de tolerância (em porcentagem) sobre o cut-off.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 3.8 – Curva ROC aplicada ao ELISA baseado em papel, utilizado para calcular a acurácia do imunoensaio em papel para detecção de toxoplasmose.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 3.9 – Esquema envolvendo todos os passos para o cálculo da acurácia de um novo teste diagnóstico pela m-Accuracy.</i>	<i>80</i>
<i>Figura 3.10 – Métodos para determinação do cut-off para o ELISA em papel para detecção de marcadores tumorais</i>	<i>82</i>
<i>Figura 3.11 – Correlação diagnóstica entre quimiluminescência x ELISA em papel para observação de resultados falsos positivos e falsos negativos</i>	<i>84</i>
<i>Figura 3.12 – Correlação diagnóstica entre quimiluminescência x ELISA em papel com aplicação de uma tolerância variável em porcentagem sobre o cut-off.....</i>	<i>85</i>

<i>Figura 3.13 – Curva ROC aplicada ao ELISA baseado em papel, utilizado para calcular a acurácia do imunoensaio em papel para detecção do marcador tumoral CEA.</i>	<i>87</i>
<i>Figura 3.14 – m-Accuracy aplicada para calcular a acurácia do ELISA em papel para detecção de marcadores tumorais.</i>	<i>88</i>

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Ferramentas analíticas para detecção do potencial biomarcador de câncer de próstata - a sarcosina

<i>Anexo 1 - Número de internações de pacientes com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016.....</i>	<i>93</i>
<i>Anexo 2 - Número de óbitos de pacientes internados com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016.</i>	<i>94</i>

Capítulo 3

Imunoensaios enzimáticos em papel

<i>Tabela 3.1 – Comparação dos custos entre ELISA x ELISA em papel.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 3.2 – Parâmetros para avaliação de desempenho de um teste diagnóstico.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 3.3 – Aplicação de níveis variados de tolerância (em porcentagem) sobre o cut-off para o teste de ELISA em papel para detecção de toxoplasmose.....</i>	<i>75</i>
<i>Tabela 3.4 – Aplicação de níveis variados de tolerância (em porcentagem) sobre o cut-off para o teste de ELISA em papel para detecção de CEA.....</i>	<i>86</i>

Lista de abreviações e siglas

μPAD: dispositivos microfluídicos analíticos em papel (*paper-based microfluidic analytical devices*)

ABTS: ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

BSA: Albumina do soro bovino (bovine serum albumin)

C⁴D: detecção condutométrica sem contato (*capacitively coupled contactless conductivity detection*)

CE: eletroforese capilar (*capillary electrophoresis*)

CEA: antígeno carcinoembrionário

CMYK: sistema de cores ciano, magenta, amarelo, preto (*cyan, magenta, yellow, black*)

GNMT: glicina-*N*-metiltransferase

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)

HRP: peroxidase extraída da raiz da *Armoracia rusticana* (*horseradish peroxidase*)

LIF: fluorescência induzida à laser (*laser induced fluorescence*)

MS: espectrometria de massas (*mass spectrometry*)

PBS: Tampão fosfato salino (phosphate buffered saline)

PBS-T: Tampão fosfato salino com Tween-20 (phosphate buffered saline with Tween 20)

PIPOX: ácido pipecólico

POCT: testes diagnósticos realizados diretamente no local (*point-of-care testing*)

RGB: sistema de cores vermelho, verde, azul (*red, green, blue*)

SARDH: sarcosina desidrogenase

SOx: sarcosina oxidase

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

Sumário

<i>Capítulo 1</i>	1
Ensaio imunológico de fluxo lateral em papel com nanopartículas de ouro	
1.1 INTRODUÇÃO	2
1.1.1 Nanopartículas de ouro e bioconjugações	2
1.1.2 Ensaio imunológico	3
1.1.3 Microdispositivos em papel	4
1.2 OBJETIVOS	5
1.2.1 Objetivos gerais	5
1.2.2 Objetivos específicos	5
1.3 MATERIAS E MÉTODOS	6
1.3.1 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro (AuNPs)	6
1.3.1.1 Método de redução utilizando boroidreto de sódio (Método de Martin) ..	6
1.3.1.2 Método de redução utilizando citrato de sódio (Método de Turkevich) ...	6
1.3.2 Caracterização das AuNPs.....	7
1.3.3 Conjugação de AuNPs com anticorpos anti-IgG	7
1.3.4 Fabricações de microdispositivos em papel.....	8
1.3.5 Teste de fluxo lateral.....	9
1.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	11
1.4.1 Síntese das nanopartículas.....	11
1.4.2 Micrografia das nanopartículas sintetizadas.....	12
1.4.3 Determinação do diâmetro médio da partícula	13
1.4.4 UV-Vis e análise das AuNPs sintetizadas pelo método de Turkevich	13
1.4.5 Ensaio de espessura dos microcanais para testes de fluxo lateral.....	15
1.4.6 Ensaio de fluxo lateral	17
1.5 CONCLUSÃO	20
1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

Capítulo 2.....24

Ferramentas analíticas para detecção do potencial biomarcador de câncer de próstata - a sarcosina

2.1	INTRODUÇÃO	25
2.1.1	Câncer	25
2.1.2	Biomarcadoras tumorais	28
2.1.3	Sarcosina e o câncer de próstata.....	28
2.1.3.1	Detecção de Sarcosina	31
2.2	OBJETIVOS	33
2.2.1	Objetivos gerais	33
2.2.2	Objetivos específicos	34
2.3	MATERIAS E MÉTODOS	34
2.3.1	Fabricações das microplacas em papel	34
2.3.2	Ferramentas analíticas para detecção de sarcosina	34
2.3.2.1	Teste enzimático colorimétrico em papel para detecção de sarcosina	34
2.3.2.2	Eletroforese Capilar	36
2.3.2.2.1	Instrumentação	36
2.3.2.2.2	Sistema de detecção condutométrica sem contato (C ⁴ D)	37
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
2.4.1	Detecção colorimétrica em papel.....	38
2.4.2	Eletroforese capilar com detecção C ⁴ D	44
2.4.2.1	Otimização das condições de separação	44
2.5	CONCLUSÃO	48
2.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Capítulo 3.....55

Imunoensaios enzimáticos em papel

3.1	INTRODUÇÃO	56
3.1.1	ELISA e pELISA	56
3.1.2	Toxoplasmose	56
3.1.3	Antígeno carcinoembrionário (CEA).....	57
3.2	OBJETIVOS	58
3.2.1	Objetivos gerais	58
3.2.2	Objetivos específicos	58

3.3	MATERIAS E MÉTODOS	59
3.3.1	Imunoensaio indireto em papel para detecção de toxoplasmose	59
3.3.1.1	Sensibilização	59
3.3.1.2	Bloqueio	59
3.3.1.3	Aplicação do teste com amostra dos paciente	59
3.3.1.4	Revelação	60
3.3.1.5	Utilização do kit ELISA tradicional	61
3.3.2	Imunoensaio de captura em papel para detecção de marcadores tumorais...	62
3.3.2.1	Sensibilização	62
3.3.2.2	Bloqueio	62
3.3.2.3	Adição de amostra dos pacientes	62
3.3.2.4	Anticorpos secundários	63
3.3.2.5	Revelação	63
3.3.3	Análise estatística	64
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
3.4.1	Potencial da cera na criação de camada hidrofóbica	65
3.4.2	Imunoensaio indireto em papel para detecção de toxoplasmose	66
3.4.2.1	Determinação do <i>Cut off</i> , sensibilidade, especificidade e precisão do ELISA em papel para detecção de toxoplasmose	69
3.4.2.1.1	Cálculo da acurácia por análise comparativa pelo Excel	78
3.4.3	Imunoensaio de captura em papel para detecção de marcadores tumorais...	81
3.4.3.1	Determinação do <i>Cut off</i> , sensibilidade, especificidade e acurácia do ELISA em papel para detecção de marcadores tumorais	81
3.5	CONCLUSÃO	89
3.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

Prefácio

Essa tese foi dividida em três capítulos. O capítulo 1 aborda ensaios imunológicos de fluxo lateral em papel, o capítulo 2 abrange as ferramentas analíticas para detecção da sarcosina, que é um potencial marcador de câncer de próstata. Por fim, o capítulo 3 apresenta os imunoensaios em papel, o primeiro para detecção de toxoplasmose e o segundo para detecção do marcador tumoral CEA.

Capítulo 1

Ensaaios imunológicos de fluxo lateral em papel com nanopartículas de ouro

1.1 Introdução

1.1.1 Nanopartículas de ouro e bioconjugações

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido amplamente utilizadas em bioensaios, devido às suas propriedades ópticas e compatibilidade com biomoléculas [1]. As soluções coloidais de AuNPs podem exibir diferentes colorações, dependendo do seu tamanho, forma, e solvatação, devido à ressonância plasmônica [1]. A coloração vermelha de uma suspensão coloidal de AuNPs é atribuída ao ouro metálico, sendo essas partículas de ouro de formato esférico em escalas nanométricas geralmente utilizadas em detecções colorimétricas [2].

Vários métodos foram desenvolvidos para aperfeiçoar a produção de AuNPs com tamanho e forma controlados [3], tais como diferentes agentes redutores, temperaturas controladas, o que permite as mais diferentes aplicações [4]. AuNPs exibem excelente compatibilidade com diferentes biomoléculas, principalmente através da interação entre os grupos tiol e amino das biomoléculas com a superfície das AuNPs [4], locais nos quais acontecerão as bioconjugações [5,6].

Métodos físicos, químicos e eletroquímicos são utilizados para a síntese de AuNPs. Alguns métodos de síntese utilizam ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) ou outros sais precursores como KAuCl_4 . Os métodos podem se diferenciar pelo agente redutor utilizado, pela condição na qual a redução é conduzida (redução fotoquímica por irradiação ultravioleta (UV)) e pelas condições específicas de operação, tais como pH e temperatura [7]. O tamanho das nanopartículas pode ser controlado através da alteração da temperatura da reação, tempo e concentração do sal de ouro precursor [7]. O método de síntese de Turkevich, por exemplo, utiliza

o HAuCl_4 como precursor e o citrato de sódio como agente redutor [7].

A utilização de AuNPs em ensaios imunológicos está baseada, principalmente, na conjugação dessas nanopartículas com biomoléculas de interesse, especialmente anticorpos, os quais podem se ligar à moléculas-alvos, fornecendo um sinal colorimétrico, sendo ideais para aplicação em diagnósticos clínicos [7,8]. Uma das estratégias mais comuns para a bioconjugação de AuNPs com anticorpos é por adsorção física das biomoléculas, via interações eletrostáticas. Em condições fisiológicas os anticorpos possuem uma carga global positiva [9], e as nanopartículas apresentam cargas superficiais negativas, permitindo assim as interações [4]. Este método é simples e rápido, sendo um dos mais comuns em laboratórios [10].

1.1.2 Ensaios imunológicos

Após Yalow e Berson descreverem o primeiro ensaio imunológico para analisar insulina humana, rendendo-lhes o Prêmio Nobel de Medicina em 1977 [11], os imunoensaios conquistaram uma parte importante do mercado de análise, tornando-se a principal ferramenta em análises clínicas.

Os imunoensaios de fluxo lateral (LFIA) surgiram como uma nova ferramenta analítica para o diagnóstico de doenças, sendo dispositivos portáteis que podem ser utilizados como *Point-of-care Testing Devices* (POCT) [8,12–16]. Esses dispositivos portáteis possuem antígenos ou anticorpos imobilizados na matriz de teste, os quais reconhecerão moléculas-alvos que passarem por essa região. Normalmente, essas moléculas-alvos estão ligadas a outros anticorpos/antígenos específicos conjugados em nanopartículas, tais como o ouro, prata, látex ou *carbon black* [8,13]. Alguns dos dispositivos POCT permitem a detecção simultânea de vários analitos em um

mesmo dispositivo, sendo estes ensaios multiplexados uma das tendências atuais em imunoensaios [13,15].

1.1.3 Microdispositivos em papel

Os dispositivos analíticos baseados em papel surgiram como uma nova plataforma de baixo custo para bioensaios, apresentando várias vantagens sobre as ferramentas analíticas tradicionais, tais como baixo consumo de amostra, baixo consumo de reagentes e flexibilidade analítica [17–20]. Os resultados dos ensaios realizados em dispositivos de papel podem ser digitalizados ou simplesmente fotografados por uma câmera de celular, permitindo uma análise local por um *smartphone* [21] ou uma análise mais detalhada, realizada posteriormente via telemedicina em uma central de análise [14,17,19,20,22–24]. Ensaios imunológicos enzimáticos realizados em microzonas individualizadas em uma matriz de papel, a partir da formação de barreiras hidrofóbicas, foram desenvolvidos recentemente, chamados de ELISA baseado em papel (p-ELISA) [18].

O primeiro método utilizado para fabricar dispositivos microfluídicos em papel foi a fotolitografia, técnica na qual um fotorresiste é aplicado em papel cromatográfico [25]. No entanto, esse método de fabricação envolve várias etapas e requer equipamentos sofisticados para fabricação [26]

A impressão à cera substitui a necessidade de se utilizar o complexo método de fotolitografia para a criação de microzonas em papel. Padrões de cera são impressos sobre a superfície de papel, e uma prensa térmica derrete a cera, fazendo com que ela atravesse toda a espessura do papel. Esse processo cria barreiras hidrofóbicas completas sobre papel, permitindo a realização de ensaios nesses microcanais [27].

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivos gerais

Criar um teste colorimétrico de fluxo lateral em papel utilizando uma única camada impressa por cera para detecção de IgG de coelho, mostrando que esse protótipo tem potencial de ser aplicado em diferentes ensaios imunológicos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de ouro por diferentes métodos, utilizando o método de redução do ouro por citrato de sódio (Método de Turkevich) ou utilizando boroidreto de sódio (Método de Martin), objetivando sintetizar partículas esféricas com diâmetros maiores;
- Caracterizar as nanopartículas recém-sintetizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM);
- Conjugar as nanopartículas de ouro com anticorpos anti-IgG por meio de adsorção física para detectar anticorpos IgG de coelho;
- Fabricar dispositivo em papel usando a tecnologia de impressão à cera para realizar ensaios de fluxo lateral para detecção de IgG.

1.3 MATERIAS E MÉTODOS

1.3.1 Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro (AuNPs)

1.3.1.1 Método de redução utilizando boroidreto de sódio (Método de Martin)

Foi preparada uma solução aquosa 50 mmol L^{-1} de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e 50 mmol L^{-1} de HCl , (solução-estoque precursora da síntese). Outra solução aquosa foi preparada contendo 50 mmol L^{-1} de NaOH e 50 mmol L^{-1} de NaBH_4 . Para a síntese das AuNPs foram adicionados $100 \mu\text{L}$ da solução $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}/\text{HCl}$ em um tubo de ensaio contendo $9,6 \text{ mL}$ de água sob agitação mecânica, à 25°C , utilizando um agitador do tipo vortex, e em seguida, foi acrescentado de uma só vez $300 \mu\text{L}$ da solução de $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$. A solução mudou de uma coloração amarelo-claro para laranja e, em seguida, para o vermelho, enquanto estava sob agitação mecânica, liberando gás hidrogênio (H_2) [28].

1.3.1.2 Método de redução utilizando citrato de sódio (Método de Turkevich)

Foi realizado o preparo de 10 mL de uma solução aquosa $0,01\% \text{ m/V}$ de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ e, em seguida, esta solução foi aquecida até à ebulição sob vigorosa agitação em um balão de 50 mL de fundo redondo. Nessas condições, 1 mL de uma solução aquosa 40 mmol L^{-1} de citrato de sódio foi rapidamente injetada no meio reacional. Após 10 min de ebulição, essa solução foi arrefecida à temperatura ambiente sob agitação contínua por 15 min . As soluções coloidais foram armazenadas em frascos protegidos da luz à 4°C [29].

1.3.2 Caracterização das AuNPs

Primeiramente a coloração da solução de AuNPs foi avaliada, observando-se se houve a formação da característica coloração vermelha. Segundo a literatura [5], a coloração avermelhada indica a formação de NPs estáveis (sem agregação ou formação de bastões de ouro), com um formato esférico [5].

As características e as dimensões das nanopartículas foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) no Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (LCE-DEMA-UFSCar) no equipamento PHILIPS CM120 operando a 120 kV. As amostras foram preparadas da seguinte forma: uma pequena porção da amostra foi dispersa em isopropanol e a dispersão foi mantida sob sonicação por 60 min. Após este procedimento, uma gota dessa dispersão foi depositada sobre um suporte de cobre previamente recoberto por um filme de *Formvar*® seguido de uma deposição de carbono por *sputtering*. O solvente foi lentamente evaporado à temperatura ambiente por aproximadamente 1 h e a amostra foi mantida sob vácuo por no mínimo 6 h. Em seguida, utilizando o software *ImageJ*, foram medidos aleatoriamente os diâmetros de aproximadamente 100 nanopartículas e calculada uma média do diâmetro das partículas formadas.

1.3.3 Conjugação de AuNPs com anticorpos anti-IgG

As AuNPs sintetizadas foram utilizadas para a conjugação com anticorpos policlonais Anti-IgG de coelho produzidos em cabra. Ajustou-se a solução para o pH 9,0, utilizando 10 mmol L⁻¹ de solução-tampão borato pH 9,2. 1,5 mL de suspensão de AuNPs foram misturados à 100 µL da solução de anticorpo (100 µg/mL). Essa mistura foi incubada durante 20 min à 650 rpm. Em seguida, 100 µL de uma solução

aquosa de BSA (1 mg/mL) foram adicionados ao meio reacional, e essa solução foi novamente incubada por mais 20 min à 650 rpm. Por fim, a solução foi centrifugada a 14000 rpm durante 20 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento de AuNPs foi ressuspendido em 300 µL de solução-tampão borato (2 mmol L⁻¹, pH 7,4) [10].

1.3.4 Fabricações de microdispositivos em papel

Projetou-se o design da plataforma com o programa *Corel Draw*. Em seguida, as folhas de papéis cromatográficos de Whatman nº 1 foram cortadas em tamanho A4 e introduzidas na impressora de Cera Xerox Phaser 8560. Padrões de cera foram impressos sobre a superfície do papel, criando os microcanais. Em seguida, os microdispositivos impressos com cera foram levados a uma prensa térmica e aquecidos por 2 min sob a temperatura de 150 °C, para que a cera impressa sobre a superfície derretesse e permeasse por toda a espessura o papel, criando uma verdadeira barreira hidrofóbica, impedindo o extravasamento de líquidos do canal. As zonas hidrofílicas são aquelas onde não foi depositado cera, sendo os canais pelos quais os fluidos permearão e que ocorrerão as reações [27]. A Figura 1.1 ilustra as etapas envolvidas na fabricação dos dispositivos em papel.

Figura 1.1- Esquema das etapas envolvidas na fabricação de dispositivos em papel. A) Desenho dos dispositivos. B) Impressão de cera sobre a superfície do papel. C) Aquecimento dos microdispositivos. D) Dispositivo finalizado.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (no prelo). Paper-Based Microfluidics Immunoassay for Detection of Canine Distemper Virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016.

1.3.5 Teste de fluxo lateral

Com o auxílio do programa *Corel Draw* foram projetados microcanais com diferentes espessuras, visando avaliar o *design* com maior velocidade de permeação de fluidos para ser utilizado no teste de fluxo lateral. Depois de se avaliar a espessura do canal, alíquotas de anticorpos IgG de coelho (4 a 11 mg mL⁻¹) e anti-IgG de coelho (10 a 13 mg mL⁻¹) produzidos em cabra foram aplicadas nos canais, em duas regiões distintas, sendo a primeira região a zona teste e a segunda região o controle. Na região de teste foram imobilizados anticorpos anti-IgG de coelho e na região de controle anticorpos IgG de coelho. Foram aplicados 2 µL da solução anti-IgG e IgG de coelho diluídos 1:4 em solução-tampão carbonato de sódio (0,1 mol L⁻¹, pH 9,5). Em seguida, misturou-se soro de IgG de coelho na

proporção de 1:2 com anti-IgG de coelho conjugados às nanopartículas de ouro e 5 μL de amostra foi aplicado na base do microdispositivo, utilizando-se 200 μL de solução-tampão PBS ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4) para eluir a amostra.

1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1 Síntese das nanopartículas

A solução recém-sintetizada de AuNPs apresentou uma coloração avermelhada, o que indica a redução dos íons Au^{3+} provenientes do HAuCl_4 (coloração amarela) a ouro metálico coloidal e a formação das nanopartículas de ouro, como demonstrado na Figura 1.2.

Figura 1.2 - Coloração das suspensões coloidais de nanopartículas de ouro. A) Solução contendo apenas $\text{HAuCl}_4/\text{HCl}$. B) Formação de AuNPs reduzidas por boroidreto de sódio.

Fonte: Autoria própria.

A coloração avermelhada da solução de nanopartículas de ouro é resultado da absorção proveniente da ressonância plasmônica de superfície juntamente dos efeitos de espalhamento [1]. Por esse motivo logo após a síntese somente através da observação da coloração da solução foi possível pressupor que as nanopartículas foram formadas. Além disso, tal coloração se assemelha à absorção

de partículas de ouro em escala nanométrica e morfologia aproximadamente esférica [2].

1.4.2 Micrografia das nanopartículas sintetizadas

Ao utilizar o método de síntese de Martin foi observada a formação de nanopartículas esféricas bastantes regulares sem a presença de agregação entre as partículas, além de uma estreita distribuição de tamanho e pouca variação, como demonstrado na Figura 1.3A. Esse método apresenta grande simplicidade e é realizado em condições ambientes, porém as nanopartículas formadas apresentam diâmetros pequenos (entre 5 a 6 nm). As partículas com diâmetros maiores apresentam maior interesse por possuírem uma maior área superficial, ampliando-se a possibilidade de conjugação com biomoléculas. Nesse contexto foi realizada uma nova síntese pelo método de Turkevich, visando-se obter partículas maiores. A Figura 1.3B apresenta a micrografia das nanopartículas sintetizadas pelo método de Turkevich, as quais apresentaram formatos esféricos e diâmetro médio de 17,4 nm.

Figura 1.3 - Micrografia das nanopartículas recém-sintetizadas. A) síntese das AuNPs por boroidreto de sódio (método de Martin). B) síntese das AuNPs utilizando citrato de sódio (método de Turkevich).

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (no prelo). Paper-Based Microfluidics Immunoassay for Detection of Canine Distemper Virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016.

1.4.3 Determinação do diâmetro médio da partícula

Utilizando o software *ImageJ* foi medido o diâmetro das AuNPs, como representado na Figura 1.4. O diâmetro médio apresentado foi de 5,4 nm pelo método de Martin e 17,4 nm pelo método de Turkevich.

Figura 1.4 - Distribuição média do diâmetro das AuNPs sintetizadas pelo método de Turkevich e pelo método de Martin.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (no prelo). Paper-Based Microfluidics Immunoassay for Detection of Canine Distemper Virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016.

1.4.4 UV-Vis e análise das AuNPs sintetizadas

Desvios na posição do máximo de absorção no espectro UV-Vis podem ser atribuídos à presença de partículas não-esféricas (mais de uma banda plasmônica ou surgimento de ombros na banda principal), agregação das partículas, impurezas no solvente e à presença de compostos de citrato, subprodutos da síntese (o que pode influenciar na constante dielétrica do material, pois estes compostos possivelmente ficam adsorvidos ou ligados a superfície das partículas). Os bastões, por exemplo, apresentam uma ressonância longitudinal e uma transversal e, normalmente, o modo transversal mostra uma ressonância coincidente com a banda de *plasmon* de partículas esféricas, por exemplo, em 520 nm, enquanto que a

ressonância do modo longitudinal é deslocada para o vermelho, aparecendo geralmente acima de 700 nm [30], como mostrado na Figura 1.5.

Figura 1.5 - Espectroscopia UV-vis de nanopartículas de ouro A) Espectro típico de AuNPs com formato esférico. B) Espectro típico de AuNPs não esféricas.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Toma, H.E.; Zamarion, V.M.; Toma, S.H.; Araki, K. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1158–1176, 2010.

Foram obtidos os espectros UV-vis das nanopartículas de ouro obtidas por ambos os métodos. Observou-se a formação de uma banda plasmon em aproximadamente 513 nm para as partículas sintetizadas por ambos os métodos, típico de nanopartículas esféricas (bandas próximas a 520 nm), bem como o não deslocamento da banda após a conjugação, evidenciando a estabilidade das nanopartículas após a conjugação com anti-IgG (Figura 1.6).

Figura 1.6 - Espectros UV-Vis das soluções coloidais de nanopartículas de ouro. Síntese pelo método de Martin, antes (linha preta sólida) e após a conjugação com anti-IgG (linha preta tracejada). Síntese pelo método de Turkevich, antes (linha vermelha sólida) e após a conjugação com anti-IgG (linha vermelha tracejada). No destaque, ampliação da região de máximo de absorbância, entre 480 e 570 nm.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (no prelo). Paper-Based Microfluidics Immunoassay for Detection of Canine Distemper Virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016.

1.4.5 Ensaios de espessura dos microcanais em papel para testes de fluxo lateral

Seis plataformas com larguras de canais variando de 1 a 6 mm foram avaliadas pelo tempo de permeação de 200 μ L uma solução contendo corante vermelho (tinta vermelha da marca Waterman), como mostrado na Figura 1.7.

Figura 1.7 - Ensaio de fluidez em microcanais lineares em diversos valores de largura do canal após impressão (nominal) e após permeação da cera pelo papel com aquecimento. Fotografias tomadas em A) 30 s, B) 1 min 30 s, C) 2 min 30 s e D) 3 min 10 s.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (no prelo). Paper-Based Microfluidics Immunoassay for Detection of Canine Distemper Virus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2016.

Após 3 minutos e 10 segundos o preenchimento foi completo na plataforma com largura nominal de 3 mm (canal de 2,7 mm). Dessa forma, esse valor foi escolhido para se realizar os ensaios de fluxo lateral.

Quando os microdispositivos impressos por cera são submetidos ao tratamento térmico há um estreitamento dos canais, devido ao espalhamento lateral da cera das barreiras hidrofóbicas, tal como descrito pela Equação de Washburn (Equação 1.1) [31], caracterizado pela permeação da cera líquida na matriz de papel poroso em fluxo capilar [27]. Existe também uma relação linear entre a largura da barreira e a linha impressa (Equação 1.2), e largura do canal e o espaço entre as

barreiras hidrofóbicas (Equação 1.3) [27], o que permite prever as dimensões finais do dispositivo durante a criação.

$$L = \left(\frac{\gamma D t}{4\eta} \right)^{1/2} \quad (1.1)$$

$$W_B = W_P + 2L \quad (1.2)$$

$$W_C = W_G - 2L \quad (1.3)$$

L: Distância percolada pelo líquido
 η : Viscosidade do líquido
 γ : Tensão superficial
D: Diâmetro do poro
t: Tempo de permeação
 W_B : Largura da barreira
 W_P : Largura da linha impressa
 W_C : Largura do canal hidrofílico
 W_G : Espaço entre as duas linhas impressas

1.4.6 Ensaio de fluxo lateral

O *layout* do dispositivo foi desenvolvido para que o microcanal escolhido apresentasse duas regiões de detecção, as quais irão compor a “zona de teste” e a “zona controle”. A região denominada “zona teste” é aquela na qual o analito de interesse reage com sua molécula-alvo, indicando a presença ou ausência da biomolécula de interesse. Já a “zona controle” determina a validação do teste, ou seja, mostra se houve êxito nos processos de bioconjugação realizados anteriormente.

Um dos métodos mais utilizados para a imobilização de anticorpos ou antígenos em superfícies sólidas é por adsorção, primariamente via forças hidrofóbicas [32]. Para os ensaios iniciais, na região de teste foram imobilizados anticorpos anti-IgG de coelho e na região de controle anticorpos IgG de coelho. A

Figura 1.8A ilustra todas as etapas envolvidas na realização de um ensaio imunocromatográfico para detecção de IgG de coelho. Foram aplicados 2 μL da solução anti-IgG e IgG de coelho diluídos 1:4 em solução-tampão carbonato de sódio 0,1 mol L^{-1} pH 9,5. Em seguida, uma alíquota de soro de IgG de coelho foi misturada na proporção de 1:2 com anti-IgG de coelho conjugados às nanopartículas de ouro e 5 μL de amostra foram aplicados no microcanal, juntamente com 200 μL de tampão diluente PBS (Figura 1.8B).

Figura 1.8 - Ensaio de fluxo lateral para detecção de IgG de coelho. A) Etapas envolvidas do desenvolvimento do dispositivo de fluxo lateral. B) Fotografia após a adição da amostra. C) Fotografia com o contraste aumentado (processamento digital da imagem).

Fonte: Autoria própria.

O método de imobilização por adsorção é um dos mais utilizados, mas ainda apresenta alguns problemas, como a lixiviação de reagentes, como é possível notar

na Figura 1.8B-C. Mesmo com o deslocamento da posição inicial dos reagentes imobilizados foi possível observar que ocorreu o bioreconhecimento entre os anticorpos IgG presentes no soro do coelho com os anti-IgG imobilizados, bem como o êxito no processo de bioconjugação indicado pela reação ocorrida na “zona controle”.

1.5 CONCLUSÃO

Os ensaios imunocromatográficos utilizando uma única camada de papel impressa por cera surge como um protótipo com potencial utilização clínica, principalmente devido à sua simplicidade e baixo custo envolvido na fabricação. As nanopartículas de ouro obtidas pelo método de Turkevich apresentaram um diâmetro médio de 17,4 nm, e por isso esse método foi escolhido para a síntese de AuNPs, com posterior bioconjugação com anticorpos Anti-IgG. O imunocomplexo permaneceu estável após a conjugação, demonstrando a efetividade do método. Através da variação da largura dos microcanais constatou-se que os canais com 2,7 milímetros apresentaram maior velocidade de permeação pelo fluido, sendo assim utilizados para a construção dos dispositivos. O método de bioconjugação nanopartículas de ouro com anticorpos por adsorção física apresentou sucesso, permitindo a detecção de anticorpos da classe IgG, mostrando que esse protótipo tem potencial de ser aplicado em diferentes ensaios imunológicos.

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 FARADAY, M. The bakerianlecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 147, p. 145–181, 1857.
- 2 MODY, V. V; SIWALE, R.; SINGH, A.; MODY, H.R. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282–289, 2010.
- 3 LINK, S.; EL-SAYED, M.A. Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, p. 8410–8426, 1999.
- 4 FRATILA, R.M.; MITCHELL, S.G.; PINO, P. DEL; GRAZU, V.; LA FUENTE, J.M. Strategies for the biofunctionalization of gold and iron oxide nanoparticles. **Langmuir**, v. 30, n. 50, p. 15057–71, 2014.
- 5 ELGHANIAN, R. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles. **Science**, v. 277, n. 5329, p. 1078–1081, 1997.
- 6 MULVANEY, P. Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles. **Langmuir**, v. 12, p. 788–800, 1996.
- 7 PANDA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Synthesis of au nanoparticles at “all” pH by H₂O₂ reduction of HAuCl₄. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, n. 6, p. 1911–1915, 2007.
- 8 LINARES, E.M.; KUBOTA, L.T.; MICHAELIS, J.; THALHAMMER, S. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: evaluation and comparison of bioconjugates. **Journal of Immunological Methods**, v. 375, n. 1–2, p. 264–70, 2012.
- 9 SCHOCH, A.; KETTENBERGER, H.; MUNDIGL, O.; WINTER, G.; ENGERT, J.; HEINRICH, J.; EMRICH, T. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FcRn-dependent pharmacokinetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 19, p. 5997–6002, 2015.
- 10 PAROLO, C.; MEDINA-SÁNCHEZ, M.; LA ESCOSURA-MUÑIZ, A. DE; MERKOÇI, A. Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassays. **Lab on a chip**, v. 13, n. 3, p. 386–90, 2013.
- 11 YALOW, R.S., BERSON, S.A. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, v. 184, p. 1648–1649, 1959.

- 12 HU, J.; WANG, S.; WANG, L.; LI, F.; PINGGUAN-MURPHY, B.; LU, T.J.; XU, F. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. **Biosensors & bioelectronics**, v. 54, p. 585–97, 2014.
- 13 MABEY, D.C.; SOLLIS, K. A; KELLY, H. A; BENZAKEN, A.S.; BITARAKWATE, E.; CHANGALUCHA, J.; CHEN, X.-S.; YIN, Y.-P.; GARCIA, P.J.; STRASSER, S.; CHINTU, N.; PANG, T.; TERRIS-PRESTHOLT, F.; SWEENEY, S.; PEELING, R.W. Point-of-care tests to strengthen health systems and save newborn lives: the case of syphilis. **PLoS Medicine**, v. 9, n. 6, p. e1001233, 2012.
- 14 CHIN, C.D.; CHEUNG, Y.K.; LAKSANASOPIN, T.; MODENA, M.M.; CHIN, S.Y.; SRIDHARA, A.A.; STEINMILLER, D.; LINDER, V.; MUSHINGANTAHE, J.; UMVILIGIHOZO, G.; KARITA, E.; MWAMBARANGWE, L.; BRAUNSTEIN, S.L.; WIJGERT, J. VAN DE; SAHABO, R.; JUSTMAN, J.E.; EL-SADR, W.; SIA, S.K. Mobile device for disease diagnosis and data tracking in resource-limited settings. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 629–40, 2013.
- 15 GORDON, J.; MICHEL, G. Discerning trends in multiplex immunoassay technology with potential for resource-limited settings. **Clinical chemistry**, v. 58, n. 4, p. 690–8, 2012.
- 16 WHITESIDES, G.M. A Glimpse into the future of diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 589–591, 2013.
- 17 CARRILHO, E.; PHILLIPS, S.T.; VELLA, S.J.; MARTINEZ, A.W.; WHITESIDES, G.M. Paper microzone plates. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 5990–8, 2009.
- 18 CHENG, C.M.; MARTINEZ, A.W.; GONG, J.; MACE, C.R.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; MIRICA, K.A.; WHITESIDES, G.M. Paper-based ELISA. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 28, p. 4771–4, 2010.
- 19 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; WHITESIDES, G.M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.
- 20 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; WILEY, B.J.; GUPTA, M.; WHITESIDES, G.M. FLASH: a rapid method for prototyping paper-based microfluidic devices. **Lab On a Chip**, v. 8, n. 12, p. 2146–50, 2008.
- 21 SHEN, L.; HAGEN, J.A.; PAPAUTSKY, I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 21, p. 4240–4243, 2012.
- 22 CHIN, C.D.; LAKSANASOPIN, T.; CHEUNG, Y.K.; STEINMILLER, D.; LINDER, V.; PARSA, H.; WANG, J.; MOORE, H.; ROUSE, R.; UMVILIGIHOZO, G.; KARITA, E.; MWAMBARANGWE, L.; BRAUNSTEIN, S.L.; WIJGERT, J. VAN DE; SAHABO, R.; JUSTMAN, J.E.; EL-SADR, W.; SIA, S.K. Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world. **Nature Medicine**, v. 17, n. 8, p. 1015–9, 2011.

- 23 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S.W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G.M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699–707, 2008.
- 24 WEBSTER, M.; KUMAR, V.S. Lab on a stamp : paper-based diagnostic tools. **Clinical Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 956–958, 2012.
- 25 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; BUTTE, M.J.; WHITESIDES, G.M. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.
- 26 COLTRO, W.K.T.; JESUS, D.P.; SILVA, J.A.F.; LAGO, C.L.; CARRILHO, E. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. **Electrophoresis**, v. 31, n. 15, p. 2487–98, 2010.
- 27 CARRILHO, E.; MARTINEZ, A.W.; WHITESIDES, G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–5, 2009.
- 28 MARTIN, M.N.; BASHAM, J.I.; CHANDO, P.; EAH, S.K. Charged gold nanoparticles in non-polar solvents: 10-min synthesis and 2D self-assembly. **Langmuir**, v. 26, n. 10, p. 7410–7, 2010.
- 29 TURKEVICH, J.; STEVENSON, P.C.; HILLER, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, p. 55–75, 1951.
- 30 TOMA, H.E.; ZAMARION, V.M.; TOMA, S.H.; ARAKI, K. The coordination chemistry at gold nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1158–1176, 2010.
- 31 WASHBURN, E.W. The dynamics of capillary flow. **Physical Review**, v. 17, n. 3, p. 273–283, 1921.
- 32 MIDDLETON, P.J.; HOLDAWAY, M.D.; PETRIC, M.; SZYMANSKI, M.T.; TAM, J.S. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of rotavirus. **Infection and Immunity**, v. 16, n. 2, p. 439–44, 1977.

Capítulo 2

Ferramentas analíticas para detecção do potencial biomarcador de câncer de próstata - a sarcosina

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Câncer

Em 2012 foram reportados cerca de 14,1 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo, ocasionando a morte de 8,2 milhões de pessoas e um total de 32,6 milhões de pacientes vivendo com câncer [1]. Para representar o impacto dos diferentes tipos de neoplasias no Brasil, apresentamos aqui um levantamento utilizando o banco de dados do sistema único de saúde (DATASUS) do Ministério da Saúde, através do Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) [2]. Essa busca foi realizada selecionando a opção morbidade hospitalar do SUS na categoria neoplasia (tumores) pela Classificação Internacional de Doenças (CID-10) dos diferentes tipos de neoplasias. Esse levantamento contemplou o número de internações de pacientes com neoplasias (Anexo 1) e o número de óbitos de pacientes internados com neoplasias (Anexo 2) nos últimos 10 anos (junho de 2006 a junho 2016). Essa pesquisa mostrou que, em 10 anos, 6.562.086 de pacientes foram internados com neoplasias, com uma média anual de aproximadamente 596 mil internações.

Se representarmos esses números através de um gráfico agrupado por localizações gerais, nota-se que as neoplasias de órgãos digestivos e neoplasias do útero lideram as internações (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Representação gráfica do número de internações de pacientes com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016 agrupados por localizações gerais dos tumores.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Acesso em: 26 Ago. 2016. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926>

Quando analisado o número de óbitos são 506.119 casos em 10 anos, com uma média anual de mais de 46 mil óbitos. Ao agrupar novamente por localizações gerais, observa-se as neoplasias de órgãos digestivos, como a principal causa de óbitos dos pacientes internados com tumores (Figura 2.2)

Figura 2.2 - Representação gráfica do número de óbitos de pacientes internados com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016 agrupados por localizações gerais dos tumores.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926>> Acesso em: 26 Ago. 2016.

As causas de processos tumorais podem ser variadas, estando ligadas a fatores externos e internos ao organismo. Os fatores externos estão relacionados aos hábitos sociais e ao meio ambiente, tais como, os raios ultravioletas e radiação ionizante, o benzopireno presente na fumaça do cigarro, a aflotoxina fúngica B1 (contaminante de alimentos), o arsênio (contaminante de água potável), além de infecções causadas por vírus, bactérias e parasitas [1,3]. Os fatores internos são comumente determinados pela genética do indivíduo e estão ligadas às falhas do sistema de reparo do organismo. Uma vez que uma célula sofre mutação, mecanismos operantes reparam as lesões no DNA ou então induzem a morte desta célula mutada [3]. Dessa forma, se os mecanismos homeostáticos intracelulares não foram capazes de eliminar a célula tumoral, essas mutações serão fixadas na população celular e sua frequência irá aumentar à medida que as células se duplicam [3].

As células tumorais levam um tempo para crescerem [3] e formarem a massa tumoral a qual chamamos de câncer. Todo esse processo pode levar anos para ocorrer, o que dificulta um diagnóstico precoce da doença. Esses elevados números de óbitos (Anexo 2 e Figura 2.2) demonstram cada vez mais a importância em se diagnosticar e tratar precocemente o câncer. A detecção precoce do câncer é essencial para haja sucesso no tratamento [4,5]. Tumores não detectados em seus estágios iniciais, e consequentemente, não tratados adequadamente, permitem com que ocorram processos de metástases [5], apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade. A metástase é caracterizada pela proliferação de células, angiogênese, adesão celular, migração e a invasão das células cancerígenas nos tecidos adjacentes, o que reduz a possibilidade de cura [6,7].

2.1.2 Biomarcadores tumorais

Os marcadores tumorais são moléculas (antígenos de superfície celular, glicoproteínas, enzimas, hormônios, receptores, antígenos oncofetais ou oncogenes) presentes no tumor, no sangue ou em outros fluídos biológicos, cujo aumento em suas concentrações está relacionado ao aparecimento ou estadiamento de um processo neoplásico [8–10]. Essas moléculas podem ser produzidas diretamente por células tumorais ou endogenamente estimuladas por um processo neoplásico, estando presentes tanto intracelularmente ou liberadas para a circulação em fluidos biológicos, tais como soro [9,11,12].

Os marcadores são extremamente úteis no direcionamento clínico dos pacientes com câncer, auxiliando nos processos de diagnóstico, estadiamento, avaliação de resposta terapêutica, detecção de recidivas [5,13], além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento [14].

Essas biomoléculas podem ser caracterizadas ou quantificadas por métodos bioquímicos ou imuno-histoquímicos nos tecidos ou no sangue, e por testes genéticos para pesquisas de oncogenes, genes supressores de tumores e alterações genéticas. Cada marcador tumoral tem um determinado valor referencial. As taxas acima dos valores de referência, apresentadas por um paciente, devem ser investigadas [15]. Testes com biomarcadores têm sido rotineiramente utilizados na clínica médica para o diagnóstico precoce de câncer e no monitoramento da eficácia do tratamento [14,16–20].

2.1.3 Sarcosina e o câncer de próstata

O câncer de próstata foi uma das moléstias que teve sua detecção e o tratamento mais beneficiadas com o advento dos biomarcadores. O antígeno específico da próstata (PSA) tornou-se um marcador indispensável, tanto para o diagnóstico como para o acompanhamento dos pacientes, especialmente após a prostatectomia radical. Apesar do seu excelente desempenho, o teste de PSA apresenta limitações, tal como a sua falta de especificidade, além de poder apresentar valores elevados em casos de tecidos normais, apresentando casos de falsos-positivos [21–24]. Assim, marcadores mais específicos são necessários para um diagnóstico precoce e confiável [21,25].

A sarcosina (*N*-metil-glicina) é um aminoácido derivado da glicina oriundo de uma metilação oxidativa realizada pela enzima glicina-*N*-metiltransferase (GNMT) [25]. A concentração elevada de sarcosina está relacionada com um aumento da atividade GNMT, e uma redução das atividades das enzimas sarcosina desidrogenase (SARDH) e oxidase de ácido pipecólico (PIPOX). A SARDH e a

PIPOX são enzimas que catalisam a desmetilação oxidativa de sarcosina, convertendo sarcosina de volta para glicina [26], como mostra a Figura 2.3.

Figura 2.3 – Mecanismo de elevação na concentração de sarcosina.

Fonte: Autoria própria.

O aumento de GNMT e a diminuição de SARDH e PIPOX foram observados em processos de progressão do câncer de próstata, especialmente em estágios mais avançados, tais como a metástase [26]. Dessa forma, a sarcosina surge como um potencial biomarcador para a detecção precoce do câncer de próstata [21]. Além disso, a sarcosina é excretada na urina, o que permite a detecção desse aminoácido de forma não-invasiva [25].

Os níveis de sarcosina encontrados na urina de pessoas saudáveis está na faixa de 20 nmol L^{-1} , enquanto que, em pessoas portadoras de câncer de próstata que estão em tratamento, os níveis chegam a 60 nmol L^{-1} . Em pacientes portadores de neoplasia prostática, os níveis encontrados de sarcosina chegam a $5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, o que torna esse marcador um dos principais alvos de pesquisas acerca do câncer de próstata [22].

2.1.3.1 Detecção da sarcosina

As técnicas mais comuns usadas para a detecção de sarcosina são cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas [27], cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (HPLC-MS) [28] ou detecção por UV-vis (HPLC-UV), e electroforese capilar com detecção por fluorescência induzida por laser (CE-LIF) [29]. As técnicas de separação cromatográficas que utilizam espectrometria de massas como sistema de detecção possuem um elevado custo de operação, enquanto que sistemas de detecção por fluorescência, tal como CE-LIF requerem uma etapa adicional de derivação química [30].

A eletroforese capilar com detecção condutimétrica sem contato (CE-C⁴D) é uma técnica bastante vantajosa para analisar sarcosina, pois apresenta as seguintes vantagens: i) requer um baixo volume de amostras e de reagentes; ii) tempo de análise reduzido; iii) detecção direta, dispensando etapas adicionais de derivação ou adição do cromóforo no eletrólito de corrida (BGE) [30,31]. Além disso, o sistema CE-C⁴D pode ser miniaturizado em um microchip [32], o que traz a portabilidade ao sistema, permitindo sua aplicação como um *point-of-care testing* (POCT) [33–35].

Outros métodos de baixo custo para a detecção de sarcosina incluem ensaios enzimáticos, com detecção colorimétrica ou fluorimétrica [24,36]. As enzimas oxidases estão sendo amplamente utilizadas na detecção de moléculas em testes amperométricos, fluorimétricos e colorimétricos [24]. Colesterol, glicose, creatinina entre outros analitos podem ser detectados utilizando-se oxidases [37–40] tanto que a peroxidase é uma das enzimas mais utilizadas na clínica médica [41]. Os testes colorimétricos estão entre os preferidos pelos clínicos, por fornecerem uma análise instantânea e possibilitarem uma triagem de pacientes [14,18,24,42].

Quando esses testes colorimétricos são fabricados em plataformas de papel, há uma grande redução no custo da fabricação dos testes, custando centavos de dólares [42]. Essa significativa redução de custos está envolvida ao baixo custo do papel, baixo volume de amostra, além disso, esses sistemas permitem a substituição dos leitores de fluorescência e espectrofotométricos por câmeras digitais ou telefones celulares [43–45]. Mais do que isso, os dispositivos baseados em papel são portáteis, simples, baratos e de fácil manuseio [46], surgindo como uma alternativa para realizar testes de diagnóstico de baixo custo em regiões carentes e áreas rurais [42–44,47].

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivos gerais

Criar testes capazes de detectar o potencial marcador de câncer de próstata, a sarcosina, em urina.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Fabricar os microdispositivos em papel impressos por cera no formato de um microplaca de ELISA com 96 poços;
- Imobilizar nas microzonas as enzimas sarcosina oxidase e peroxidase, além do indicador redox 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido) sal de diamônio (ABTS);
- Calcular as figuras de mérito do método de detecção colorimétrica;
- Otimizar a separação de sarcosina dos 12 aminoácidos comumente encontrados na urina por eletroforese capilar com detecção condutimétrica sem contato acoplada capacitivamente (CE-C⁴D);
- Calcular as figuras de mérito do método CE-C⁴D.

2.3 MATERIAS E MÉTODOS

2.3.1 Fabricações das microplacas em papel

Utilizando a mesma metodologia de desenvolvimento dos dispositivos em papel para ensaios de fluxo lateral, criamos um *layout* que corresponde a uma microplaca de ELISA, com 96 poços (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Esquema das etapas envolvidas na fabricação de microplacas em papel. A) Desenho das microplacas com 96 poços. B) Impressão de cera sobre a superfície do papel. C) Aquecimento das microplacas baseadas em papel. D) microplacas finalizado.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Towards low-cost bioanalytical tools for sarcosine assays for cancer diagnostics. **Analytical Methods**, v.8, p.7312–7318, 2016.

2.3.2 Ferramentas analíticas para detecção de sarcosina

2.3.2.1 Teste enzimático colorimétrico em papel para detecção de sarcosina

Foram adicionadas sobre a microplaca de papel 5 μL de uma solução contendo sarcosina oxidase (120 kU L^{-1}) diluído em solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 8.3). Após a secagem (20 min), acrescentaram-se 5 μL de uma solução de

horseradish peroxidase (30 kU L^{-1}) diluída em solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 6.0) e, após 20 min, foram adicionados $5 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de indicador redox de ABTS (25 mmol L^{-1}), preparadas em solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 6.0). Esse protocolo foi modificado a partir do ensaio-modelo para a detecção de glicose a partir do sistema glicose oxidase-peroxidase [44,48]. Cada padrão de concentração de sarcosina ($5 \text{ }\mu\text{L}$) foi aplicado em triplicata na microplaca que continha as enzimas e o cromóforo. Os padrões de sarcosina foram preparados por diluição de uma solução-estoque 1 mol L^{-1} de sarcosina em solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 6.0) variando-se a concentração de 20 mmol L^{-1} até $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Para a análise do branco foram utilizados $5 \text{ }\mu\text{L}$ de solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 6.0). Além disso, foram preparadas soluções de todos os 20 aminoácidos naturais (4 mmol L^{-1}) em solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 6.0), e $5 \text{ }\mu\text{L}$ de cada solução de aminoácidos foram aplicados em triplicata, no intuito de avaliar a especificidade de enzima sarcosina oxidase frente a outros aminoácidos. Após a secagem completa das microzonas (20 min) as microplacas foram digitalizadas utilizando-se um scanner de mesa. A intensidade média da cor formada foi medida utilizando o *software* Adobe Photoshop CS4. O ensaio para detecção de sarcosina em papel está representado na Figura 2.5.

Figura 2.5 - Etapas do ensaio colorimétrico para detecção de sarcosina. A) Aplicação da amostra com a microplaca em papel contendo previamente as enzimas sarcosina oxidase, peroxidase e o indicador redox ABTS. B) Oxidação do ABTS, alterando a coloração de incolor para azul. C) Digitalização da microplaca. D) Análise dos resultados.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Towards low-cost bioanalytical tools for sarcosine assays for cancer diagnostics. **Analytical Methods**, v.8, p.7312–7318, 2016.

2.3.2.2 Eletroforese Capilar

2.3.2.2.1 Instrumentação

As separações dos aminoácidos e da sarcosina por eletroforese capilar (CE) foram realizadas utilizando um equipamento de eletroforese capilar P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) com detecção condutimétrica sem contato (CE-C⁴D) (eDAQ, Sidney, Australia). Utilizou-se um capilar de sílica fundida (Phoenix, USA) de 360 µm de diâmetro externo (DE) e 50 µm de diâmetro interno (DI) com um comprimento total de 50 cm (35 cm de comprimento efetivo). Um gráfico de Ohm foi obtido para cada um dos tampões testados nas separações por CE, definindo a voltagem máxima aplicada durante a separação, no intuito de evitar o aquecimento excessivo do capilar. As amostras foram injetadas por aplicação de uma pressão de 0,5 psi positiva para o frasco de amostra durante 6 s, resultando em um plugue de amostra de 7,13 nL (~1% do volume do capilar até a janela de detecção). O capilar de sílica fundida foi condicionado a cada dia, lavando-se com água ultrapura (2 min), seguido por uma lavagem com uma solução de NaOH (100 mmol L⁻¹) (5 min), seguido por uma segunda lavagem com água ultrapura (3 min), e

finalmente uma lavagem com a solução-tampão de corrida (3 min). Uma pressão de 20 *psi* foi aplicada ao sistema em todos os passos do condicionamento do capilar.

2.3.2.2.2 Sistema de detecção condutométrica sem contato (C⁴D)

O sistema de detecção utilizado com o equipamento de eletroforese capilar foi um sistema comercial C⁴D (modelo ER225) *head stage* ET120 (EDAQ, Sidney, Austrália). O detector C⁴D foi otimizado para cada solução-tampão de corrida usando o *software* de perfil C⁴D, que variou automaticamente a frequência e amplitude do sinal. O capilar foi preenchido com o eletrólito de corrida (BGE) por aplicação de uma pressão de 20 *psi* durante 1,5 min, e o *software* de otimização foi iniciado. Os 12 aminoácidos normalmente encontrados na urina (lisina, prolina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, alanina, serina, glicina, tirosina, ácido glutâmico, arginina) [49] e a sarcosina foram detectados utilizando uma frequência de 1,100 kHz, amplitude de 1,8 V de pico a pico, e o modo de ganho de sinal ligado.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Detecção colorimétrica em papel

O baixo custo e versatilidade atribuída aos microdispositivos baseados em papel (μ PADs) são características ideais para testes de rastreio ou triagem (*screening*), que podem ser facilmente aplicados para análise de sarcosina. Embora as técnicas instrumentais sejam comuns para análise de aminoácidos, estamos apresentando pela primeira vez, um ensaio baseado em papel utilizando enzimas e um indicador redox para análise quantitativa de sarcosina como potencial marcador tumoral. O ensaio colorimétrico para a detecção de sarcosina é baseada em duas reações enzimáticas acopladas. A sarcosina oxidase (SOx) catalisa a desmetilação da sarcosina na presença de oxigênio e água, que origina o aminoácido glicina, formaldeído e peróxido de hidrogênio como produtos (Equação 2.1). Na reação subsequente a peroxidase catalisa a redução do peróxido de hidrogênio em água, oxidando o indicador redox – nesse caso ABTS para $ABTS^{+}$ (Equação 2.2) [48]. O indicador redox, na forma oxidada apresenta uma coloração azul esverdeado, permitindo a detecção da sarcosina (Figura 2.6).

As microplacas com os ensaios colorimétricos foram digitalizadas e analisadas pelo *software* Adobe Photoshop usando a ferramenta histograma nos canais RGB. O sinal analítico nesses testes é a média de intensidade de pixel (unidades arbitrárias (U.A.)) da cor desenvolvida por cada zona na microplaca. A intensidade média de pixel no modelo de cor RGB (Equação 2.3) varia de 255

(branco) a 0 (preto): quanto mais próximo de “0” mais intensa é a cor e, portanto, mais alta a concentração de analito na amostra. No intuito de construir uma curva analítica com um coeficiente de correlação positiva, a escala foi invertida, subtraindo o sinal obtido (S_{obt}) de 255, assim, conseguimos um sinal corrigido (S_{corr}) (Equação 2.4). Dessa forma, quanto maior a concentração de analito na amostra, maior será o sinal (intensidade média de pixel).

$$S_{\text{obt}} = \frac{R + G + B}{3} \quad (2.3)$$

$$S_{\text{corr}} = 255 - S_{\text{obt}} \quad (2.4)$$

A fim de se avaliar a especificidade do ensaio para a sarcosina, todos os 20 aminoácidos naturais foram utilizados como substrato para a enzima sarcosina oxidase (Figura 2.6), uma vez que em matrizes biológicas a sarcosina pode ser encontrada juntamente com outras biomoléculas, em especial a glicina, que é o substrato da biossíntese de sarcosina [25].

Figura 2.6 - Avaliação da especificidade sarcosina oxidase para a sarcosina ($5 \mu\text{L}$ of 120 U mL^{-1}) contra todos os 20 aminoácidos naturais (4 mmol L^{-1}) em solução-tampão PBS (0.01 mol L^{-1} ; pH 6.0) nas microplacas em papel. Cada barra representa a média em triplicata, e a barra de erro representa 95% de intervalo de confiança da distribuição *t* de Student. A imagem na parte inferior de cada barra mostra uma imagem representativa do ensaio colorimétrico.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Towards low-cost bioanalytical tools for sarcosine assays for cancer diagnostics. **Analytical Methods**, v.8, p.7312–7318, 2016.

Na Figura 2.6 é possível notar nitidamente a formação da cor azul apenas para sarcosina. Utilizando a sarcosina como substrato para SOx, foi observado uma diferença de ~3 vezes o sinal do branco, enquanto que para os 20 aminoácidos a coloração formada é muito próxima da cor gerada pelo branco, o que indica que a enzima é específica para a sarcosina, e eventuais aminoácidos que estiverem presentes na amostra não serão interferentes na análise.

A curva analítica para o ensaio colorimétrico de sarcosina está representada na Figura 2.7A. O indicador redox ABTS responde a concentrações do analito até $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; no entanto, esse ensaio apresentou uma pequena faixa linear (abaixo de $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$) e saturação de sinal ocorrendo acima de 10 mmol L^{-1} (um teste *t*

foi realizado comparando os limites superiores e os limites inferiores da curva analítica). Diante disso, uma curva de crescimento e saturação (Equação 2.5) foi plotada para descrever o comportamento do sinal, como relatado por Chaplan *et al.* [48].

$$Y = \frac{S_{\max}[\text{conc}]}{K + [\text{conc}]} \quad (2.5)$$

Sendo Y o sinal analítico, $S_{\max}$ é o sinal analítico máximo, [conc] é a concentração da substância a ser analisada, e K é uma constante.

Esse modelo se ajusta bem aos dados, como pode ser observado no gráfico de resíduos (Figura 2.7C) e por um teste F realizado para esse conjunto de dados (dados não apresentados). No entanto, alguns problemas estão relacionados com essa abordagem. É necessário atribuir um significado físico para a constante K [48]. Chaplan *et al.* [48] observaram que a constante K não é afetada pelas condições de luminosidade durante a digitalização do teste, porém mais estudos sobre essa constante são necessários para compreender os fatores que podem afetá-la.

O papel é um material anisotrópico [50], o que acaba afetando as medidas de refletância difusa e aumenta a dispersão dos resultados tanto para as medições em branco quanto para as medições do padrão. Uma estratégia para minimizar o efeito é igualar o índice de refração de papel pela adição de um solvente compatível [51], reduzindo a influência da matriz no sinal. Ressalta-se que essa abordagem é mais recomendada para uma detecção por transmitância [51], ao invés de medidas de refletância.

Quando um modelo não linear é plotado para o conjunto de dados, as figuras de mérito do método analítico são afetadas. Por exemplo, a sensibilidade do método

não é constante ao longo de toda a curva analítica, tornando-se dependente de uma faixa da curva. Uma abordagem comum consiste em encontrar a faixa linear dinâmica da curva de calibração e usar esses valores de concentração para calcular as figuras de mérito do método.

A faixa linear dinâmica para o ensaio da sarcosina oxidase está representado na Figura 2.7B. Essa faixa é confirmada com perfil linear, por um teste de F (dados não apresentados) e por análise do gráfico de resíduos (Figura 2.7D). Ao considerar a faixa linear dinâmica, as figuras de mérito para esse método mostram uma sensibilidade de 21,2 U.A./mmol L⁻¹; limite de detecção (LOD) = 0,21 mmol L⁻¹; limite de quantificação (LOQ) = 0,61 mmol L⁻¹; $r^2 = 0,8898$.

Figura 2.7 - Parâmetros analíticos obtidos para análise sarcosina no ensaio enzimático baseado em papel. A) curva analítica para o ensaio de sarcosina oxidase com ajuste dos dados com um modelo de saturação. B) Gráfico de regressão linear para a região linear do ensaio de sarcosina oxidase (0 a 1 mmol L⁻¹). (C) Gráfico de distribuição residual para o modelo de crescimento e de saturação para o ensaio de sarcosina oxidase. Não há nenhuma tendência aparente na distribuição dos resíduos. (D) Gráfico da distribuição residual para a região linear do ensaio de sarcosina oxidase. Não há nenhuma tendência aparente na distribuição dos resíduos.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Towards low-cost bioanalytical tools for sarcosine assays for cancer diagnostics. **Analytical Methods**, v.8, p.7312–7318, 2016.

A sarcosina está presente na urina de pacientes com câncer de próstata, em concentrações na faixa de 5 μmol L⁻¹ [22]. Dessa forma, os ensaios colorimétricos ainda requerem uma otimização para melhorar os limites de detecção e quantificação. Contudo, isso não impede a aplicação dos dispositivos microfluídicos à base de papel para detecção de pequenas biomoléculas em baixas concentrações. Além disso, recentemente Han *et al.* [52] apresentou um pré-concentrador baseado em papel utilizando polarização por concentração de íons,

capaz de concentrar em até 1000 vezes uma biomolécula. Esse sistema utiliza uma membrana seletiva para cátions em uma fita adesiva, a qual é acoplada ao papel, assim que um campo elétrico é aplicado é iniciada a pre-concentração [52]. Diante disso, ensaios futuros englobarão um pré-concentrador antes das zonas de testes, o que permitirá alcançarmos baixíssimos limites de detecção.

Além do teste de triagem de baixo custo fornecido pelo papel, uma análise por eletroforese capilar associada a um detector C⁴D pode alcançar uma alta sensibilidade e detectar concentrações mais baixas desse analito na urina. Além disso, os métodos de eletroforese capilar podem ser miniaturizados utilizando materiais de baixo custo, tais como poliéster-toner (PET) [53], também fazendo parte de um esforço para tornar esta análise disponível para aqueles que precisam.

2.4.2 Eletroforese capilar com detecção C⁴D

2.4.2.1 Otimização das condições de separação

Uma característica essencial do eletrólito de corrida (BGE) em eletroforese capilar é a baixa condutividade, a fim de minimizar o aquecimento por efeito Joule do capilar, além de proporcionar alta sensibilidade para a detecção de C⁴D [54]. Outra característica importante do BGE é o pH, uma vez que o grau de ionização dos analitos e a quantidade de grupos silanóis carregados negativamente do capilar de sílica fundida estão relacionados com pH do BGE [55]. A sarcosina apresenta grupos ionizáveis, um do ácido carboxílico (pKa 2,06) e o outro do grupo da amina (pKa 10,35), o que se traduz em um *zwitterion* com pI 6,2 [56]. A fim de melhorar a separação da sarcosina frente aos outros 12 aminoácidos presentes na solução foi escolhido um BGE com um valor de pH mais alto, composto por trietilamina (TEA), pKa 10,8, nas seguintes concentrações: 5 mmol L⁻¹ (pH 10,9); 10 mmol L⁻¹ (pH

11,3); 25 mmol L⁻¹ (pH 11,5) e 50 mmol L⁻¹ (pH 11,7). Os eletroferogramas oriundos da análise de sarcosina em uma solução aquosa contendo 12 aminoácidos normalmente encontrados na urina humana estão apresentados na Figura 2.8. Ao escolher um BGE com um pH elevado, os grupo amina e os grupo carboxílico de sarcosina estão desprotonados e os compostos apresentarão uma carga global negativa, a qual é necessária para a mobilidade eletroforética e detecção por C⁴D. O pH elevado do BGE também desprotona completamente os grupos silanóis do capilar de sílica fundida, levando a um fluxo eletroosmótico (EOF) elevado e estável, e conseqüentemente, a um curto tempo de análise.

Figura 2.8 - Seleção da concentração do eletrólito de corrida (BGE) para a análise por CE- C^4D de sarcosina na presença dos 12 aminoácidos normalmente encontrados na urina humana [49]. 1, lisina ($240 \mu\text{mol L}^{-1}$); 2, prolina ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$); 3, leucina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); 4, isoleucina ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$); 5, fenilalanina ($40 \mu\text{mol L}^{-1}$); 6, metionina ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$); 7, sarcosina ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$); 8, alanina ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$); 9, serina ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$); 10, glicina ($90 \mu\text{mol L}^{-1}$); 11, tirosina ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$); 12, ácido glutâmico ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$). Arginina ($110 \mu\text{mol L}^{-1}$) comigrou com o fluxo eletrosmótico (EOF) devido sua carga global ser aproximadamente zero (pI de 10,92). A) TEA 50 mmol L^{-1} . B) de TEA 25 mmol L^{-1} . C) de TEA 10 mmol L^{-1} . D) de TEA 5 mmol L^{-1} .

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Towards low-cost bioanalytical tools for sarcosine assays for cancer diagnostics. **Analytical Methods**, v.8, p.7312–7318, 2016.

Na concentração mais baixa de BGE (5 mmol L^{-1}) (Figura 2.8D) ocorreu uma comigração entre metionina e sarcosina, o que não foi observado em concentrações mais altas do BGE. Quando a concentração de TEA foi aumentada para 10 mmol L^{-1} (Figure 2.8C) houve uma separação completa dos picos da metionina e sarcosina, além de obtermos uma linha de base estável. Ao comparar as concentrações BGE de 10 mmol L^{-1} (Figura 2.8C), 25 mmol L^{-1} (Figura 2.8B) e 50 mmol L^{-1} (Figura 2.8A), nota-se que a concentração mais baixa (10 mmol L^{-1}) de BGE separou um maior número de aminoácidos, além de manter a intensidade do

sinal do pico de sarcosina, enquanto que para concentrações mais elevadas, observou-se uma instabilidade na linha de base e uma diminuição da resolução.

A concentração de BGE escolhida para a determinação da reprodutibilidade intra-dia e inter-dia do método proposto foi de 10 mmol L⁻¹ de TEA. A curva analítica para a análise de sarcosina está representada na Figura 2.9A. A regressão linear foi realizada para esse conjunto de dados, e nenhuma tendência foi observada no gráfico de resíduos (Figura 2.9B), o que corrobora com a escolha do modelo. As figuras de mérito para esse método mostraram um limite de detecção (LD) = 0,034 mmol L⁻¹ e um limite de quantificação (LQ) = 0,069 mmol L⁻¹; $r^2 = 0,9978$. Uma mistura dos aminoácidos foi preparada todos os dias por diluição da solução estoque. A amostra foi consecutivamente injetada 10 vezes (cada dia) durante 3 dias consecutivos. A reprodutibilidade do tempo de migração (desvio padrão relativo - DPR) intra e inter-dias foi inferior a 0,6% e 4,4%, respectivamente, o que mostra uma boa estabilidade método.

Figura 2.9 – Parâmetros analíticos obtidos para análise sarcosina por CE-C⁴D. A) Curva analítica para sarcosina. B) Gráfico de distribuição residual para a regressão linear da curva analítica da sarcosina. Não há nenhuma tendência aparente na distribuição dos resíduos.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Towards low-cost bioanalytical tools for sarcosine assays for cancer diagnostics. **Analytical Methods**, v.8, p.7312–7318, 2016.

2.5 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi apresentado um ensaio enzimático colorimétrico em um dispositivo microfluídico em papel para detecção de sarcosina. Este teste enzimático em papel foi capaz de detectar um potencial biomarcador de tumor de câncer de próstata - sarcosina - com especificidade, e nenhuma atividade frente a todos os vinte aminoácidos naturais, apresentando um limite de detecção = $0,21 \text{ mmol L}^{-1}$ e limite de quantificação = $0,61 \text{ mmol L}^{-1}$. Ao utilizar as enzimas sarcosina oxidase, peroxidase e o indicador redox (ABTS), constatou-se que intensidade da cor formada foi proporcional à concentração de sarcosina presente na amostra, o que permitirá futuramente relacionar a intensidade de cor formada com a presença e/ou estágio clínico do câncer, além do monitoramento do tratamento. Esse ensaio tem grande capacidade de ser fabricado e aplicado localmente, satisfazendo os requisitos de um *Point-of-care Testing*.

A eletroforese capilar mostrou ser um método adequado para a análise de sarcosina, devido à reprodutibilidade, sensibilidade, tempo de análise, e o baixo consumo de amostra e reagentes. O tempo total de análise foi de menos de 2,5 minutos, e esse método mostrou-se útil para separar a sarcosina frente aos 12 aminoácidos normalmente encontrados na urina humana, permitindo avaliar o perfil eletroforético desse potencial biomarcador tumoral numa amostra complexa, apresentando um limite de detecção = $0,034 \text{ mmol L}^{-1}$ e um limite de quantificação LOQ = $0,069 \text{ mmol L}^{-1}$. Dessa forma, o método permitiu uma detecção rápida e direta de aminoácidos por detecção condutométrica sem contato (C^4D), dispensando etapas de derivação. Além disso, pesquisas futuras envolvem a miniaturização do sistema usando materiais de baixo custo, tais como dispositivos de toner de poliéster (PT), para aplicações como *point-of-care testing*.

Dessa forma, o teste em papel pode ser facilmente utilizado como uma ferramenta de *screening*, enquanto que o CE- C⁴D pode quantificar as amostras que testaram positivas para o ensaio colorimétrico, uma vez que essa técnica apresenta elevada sensibilidade.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. **Fact sheet No297**. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 30 Ago. 2016.
- 2 MINISTÉRIO DA SAÚDE. **DATASUS**. 2016. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926>> acesso em: 26 Ago. 2016.
- 3 ALBERTS, B. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre :Artmed, 2010. p.1205-1265.
- 4 PEPE, M.S.; ETZIONI, R.; FENG, Z.; POTTER, J.D.; LOU, M.; THORNQUIST, M.; WINGET, M.; YASUI, Y. Phases of biomarker development for early detection of cancer. **Cancer**, v. 93, n. 14, p. 1054–1061, 2001.
- 5 WULFKUHLE, J.D.; LIOTTA, L.A.; PETRICON, E.F. Proteomic applications for the early detection of cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 4, p. 267–275, 2003.
- 6 KHAN, N.; MUKHTAR, H. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, p. 435–445, 2011.
- 7 DONG, F.; BUDHU, A.S.; WANG, X.W. Translating the metastasis paradigm from scientific theory to clinical oncology. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 8, p. 2588–2593, 2009.
- 8 SHARMA, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. **Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology**, v. 30, n. 1, p. 1–8, 2009.
- 9 MALATI, T. Tumour markers : an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 17–31, 2007.
- 10 KLEIST, S. VON What's new in tumor markers and their measurements? **Pathology, Research and Practice**, v. 183, n. 1, p. 95–99, 1988.
- 11 BATES, S.E.; LONGO, D.L. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. **Seminars in Oncology**, v. 14, n. 2, p. 102–138, 1987.
- 12 HELZLSouer, K.J. Serological markers of cancer and their applications in clinical trials. **Cancer Research**, v. 54, n. 7 Suppl, p. 2011s–2014s, 1994.
- 13 DUFFY, M.J. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 175–184, 2007.
- 14 WEI, W.; ZHANG, C.; QIAN, J.; LIU, S. Multianalyte immunoassay chip for detection of tumor markers by chemiluminescent and colorimetric methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 10, p. 3269–74, 2011.

- 15 SARANDAKOU, A.; PROTONOTARIOU, E.; RIZOS, D. Tumor markers in biological fluids associated with pregnancy. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 44, n. 2, p. 151–78, 2007.
- 16 AFKARIAN, M.; BHASIN, M.; DILLON, S.T.; GUERRERO, M.C.; NELSON, R.G.; KNOWLER, W.C.; THADHANI, R.; LIBERMANN, T.A. Optimizing a proteomics platform for urine biomarker discovery. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 10, p. 2195–204, 2010.
- 17 WU, J.; CHEN, Y.; GU, W. Urinary proteomics as a novel tool for biomarker discovery in kidney diseases. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 11, n. 4, p. 227–37, 2010.
- 18 WANG, J.; CAO, Y.; XU, Y.; LI, G. Colorimetric multiplexed immunoassay for sequential detection of tumor markers. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 532–6, 2009.
- 19 PRABHULKAR, S.; ALWARAPPAN, S.; LIU, G.; LI, C.-Z. Amperometric micro-immunosensor for the detection of tumor biomarker. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 12, p. 3524–30, 2009.
- 20 MAYEUX, R. Biomarkers: potential uses and limitations. **NeuroRx**, v. 1, n. 2, p. 182–8, 2004.
- 21 CAVALIERE, B.; MACCHIONE, B.; MONTELEONE, M.; NACCARATO, A.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Sarcosine as a marker in prostate cancer progression: a rapid and simple method for its quantification in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 9, p. 2903–12, 2011.
- 22 CERNEI, N.; HEGER, Z.; GUMULEC, J.; ZITKA, O.; MASARIK, M.; BABULA, P.; ECKSCHLAGER, T.; STIBOROVA, M.; KIZEK, R.; ADAM, V. Sarcosine as a potential prostate cancer biomarker--a review. **International journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 13893–908, 2013.
- 23 MELICHAR, B. Tumor biomarkers: PSA and beyond. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 50, n. 11, p. 1865–9, 2012.
- 24 BURTON, C.; GAMAGEDARA, S.; MA, Y. A novel enzymatic technique for determination of sarcosine in urine samples. **Analytical Methods**, v. 4, n. 1, p. 141–146, 2012.
- 25 SREEKUMAR, A.; POISSON, L.M.; RAJENDIRAN, T.M.; KHAN, A.P.; CAO, Q.; YU, J.; LAXMAN, B.; MEHRA, R.; LONIGRO, R.J.; LI, Y.; NYATI, M.K.; AHSAN, A.; KALYANA-SUNDARAM, S.; HAN, B.; CAO, X.; BYUN, J.; OMENN, G.S.; GHOSH, D.; PENNATHUR, S.; ALEXANDER, D.C.; BERGER, A.; SHUSTER, J.R.; WEI, J.T.; VARAMBALLY, S.; BEECHER, C.; CHINNAIYAN, A.M. Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 910–914, 2009.

- 26 KHAN, A.P.; RAJENDIRAN, T.M.; ATEEQ, B.; ASANGANI, I.A. The role of sarcosine metabolism in prostate cancer progression. **Neoplasia**, v. 15, n. 5, p. 491–501, 2013.
- 27 WU, H.; LIU, T.; MA, C.; XUE, R.; DENG, C.; ZENG, H.; SHEN, X. GC/MS-based metabolomic approach to validate the role of urinary sarcosine and target biomarkers for human prostate cancer by microwave-assisted derivatization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 2, p. 635–646, 2011.
- 28 JIANG, Y.; CHENG, X.; WANG, C.; MA, Y. Quantitative determination of sarcosine and related compounds in urinary samples by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 21, p. 9022–7, 2010.
- 29 CERNEI, N.; ZITKA, O.; RYVOLOVA, M.; ADAM, V.; MASARIK, M. Spectrometric and electrochemical analysis of sarcosine as a potential prostate carcinoma marker. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 4286–4301, 2012.
- 30 KUBÁŇ, P.; HAUSER, P.C. Contactless conductivity detection in capillary electrophoresis: A review. **Electroanalysis**, v. 16, n. 24, p. 2009–2021, 2004.
- 31 TŮMA, P.; SAMCOVÁ, E.; ANDELOVÁ, K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Journal of chromatography B**, v. 839, n. 1–2, p. 12–8, 2006.
- 32 SILVA, E.R.; SEGATO, T.P.; COLTRO, W.K.T.; LIMA, R.S.; CARRILHO, E.; MAZO, L.H. Determination of glyphosate and AMPA on polyester-toner electrophoresis microchip with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2107–11, 2014.
- 33 LIMA, R.S.; PIAZZETTA, M.H.O.; GOBBI, A.L.; SEGATO, T.P.; CABRAL, M.F.; MACHADO, S.A.S.; CARRILHO, E. Highly sensitive contactless conductivity microchips based on concentric electrodes for flow analysis. **Chemical Communications**, v. 49, n. 97, p. 11382–4, 2013.
- 34 LIMA, R.S.; PIAZZETTA, M.H.O.; GOBBI, A.L.; RODRIGUES-FILHO, U.P.; NASCENTE, P.A.P.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E. Contactless conductivity biosensor in microchip containing folic acid as bioreceptor. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 11, p. 1963–1966, 2012.
- 35 COLTRO, W.K.T.; LIMA, R.S.; SEGATO, T.P.; CARRILHO, E.; JESUS, D.P.; LAGO, C.L.; SILVA, J.A.F. Capacitively coupled contactless conductivity detection on microfluidic systems—ten years of development. **Analytical Methods**, v. 4, n. 1, p. 25–33, 2012.
- 36 LAN, J.; XU, W.; WAN, Q.; ZHANG, X.; LIN, J.; CHEN, J.; CHEN, J. Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**, v. 825, p. 63–8, 2014.

- 37 FOSSATI, P.; PRENCIPE, L.; BERTI, G. Enzymic creatinine assay: a new colorimetric method based on hydrogen peroxide measurement. **Clinical Chemistry**, v. 29, n. 8, p. 1494–6, 1983.
- 38 GRAF, E.; PENNISTON, J.T. Method for determination of hydrogen peroxide, with its application illustrated by glucose assay. **Clinical chemistry**, v. 26, n. 5, p. 658–60, 1980.
- 39 NIEH, C.H.; TSUJIMURA, S.; SHIRAI, O.; KANO, K. Amperometric biosensor based on reductive H₂O₂ detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 128–33, 2013.
- 40 O'BRIEN, D.P.; GOUGH, D.B.; SKEHILL, R.; GRIMES, H.; GIVEN, H.F. Simple method for comparing reliability of two serum tumour markers in breast carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 2, p. 134–7, 1994.
- 41 VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.
- 42 CARRILHO, E.; PHILLIPS, S.T.; VELLA, S.J.; MARTINEZ, A.W.; WHITESIDES, G.M. Paper microzone plates. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 15, p. 5990–8, 2009.
- 43 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; WHITESIDES, G.M.; CARRILHO, E. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.
- 44 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S.W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G.M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699–707, 2008.
- 45 SHEN, L.; HAGEN, J.A.; PAPAUTSKY, I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 21, p. 4240–4243, 2012.
- 46 BYRNES, S.; THIESSEN, G.; FU, E. Progress in the development of paper-based diagnostics for low-resource point-of-care settings. **Bioanalysis**, v. 5, n. 22, p. 2821–36, 2013.
- 47 CARRILHO, E.; MARTINEZ, A.W.; WHITESIDES, G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–5, 2009.
- 48 CHAPLAN, C.A.; MITCHELL, H.T.; MARTINEZ, A.W. Paper-based standard addition assays. **Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1296–1300, 2014.
- 49 BROOKS, T.; KEEVIL, C.W. A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 203–6, 1997.

- 50 PELTON, R. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 8, p. 925–942, 2009.
- 51 ELLERBEE, A.K.; PHILLIPS, S.T.; SIEGEL, A.C.; MIRICA, K.A.; MARTINEZ, A.W.; STRIEHL, P.; JAIN, N.; PRENTISS, M.; WHITESIDES, G.M. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 20, p. 8447–8452, 2009.
- 52 HAN, S. IL; HWANG, K.S.; KWAK, R.; LEE, J.H. Microfluidic paper-based biomolecule preconcentrator based on ion concentration polarization. **Lab Chip**, v. 16, p. 2219–2227, 2016.
- 53 DUARTE, G.R.M.; COLTRO, W.K.T.; BORBA, J.C.; PRICE, C.W.; LANDERS, J.P.; CARRILHO, E. Disposable polyester-toner electrophoresis microchips for DNA analysis. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2692–8, 2012.
- 54 PORMSILA, W.; KRÄHENBÜHL, S.; HAUSER, P.C. Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for uric acid determination in biological fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, n. 2, p. 224–228, 2009.
- 55 BACHMANN, S.; HUCK, C.W.; BAKRY, R.; BONN, G.K. Analysis of flavonoids by CE using capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 28, n. 5, p. 799–805, 2007.
- 56 CHEMICALIZE. **Sarcosine**. 2016. Disponível em:
<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=sarcosine&source=fp_sarcosine>.
Acesso em: 20 ago. 2016.

Capítulo 3

Imunoensaios enzimáticos em papel

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 ELISA e p-ELISA

O *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) é o imunoensaio mais conhecido, amplamente utilizado em imunologia, bioquímica e indústria alimentícia [1,2]. Esse método combina a especificidade de anticorpos com uma variedade de enzimas catalíticas, proporcionando especificidade e sensibilidade para os ensaios, permitindo uma análise quantitativa por meio de um leitor de microplacas [1].

O método p-ELISA recebeu essa nomenclatura por consistir em um ensaio imunológico do tipo ELISA, realizado em microzonas criadas em papel. A finalidade de projetar microdispositivos em papel está ligada ao baixo custo de sua produção e na viabilidade de utilização no campo de análises clínicas, principalmente em regiões carentes [3]. Esses dispositivos tem sido protótipos para análises de metabólitos simples como proteínas e glicose [4]. Essa plataforma combina a sensibilidade e a especificidade do ELISA convencional, mas com maior facilidade de utilização e um menor custo, dispensando a necessidade de equipamentos onerosos, tal como o leitor de microplacas [3].

3.1.2 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose considerada uma das infecções mais comuns no mundo, causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), tendo o felino como hospedeiro definitivo [5]. A toxoplasmose congênita é transmitida da mãe para o feto via transplacentária, sendo um dos principais agentes teratogênicos, com grande preocupação médica, e ainda assim é considerada como uma doença negligenciada [5]. Essa doença infecciosa pode causar sérios danos ao recém-nascido, tais como: lesões coriorretinianas, calcificação intracraniana,

hidrocefalia, microcefalia e convulsões, entre outras manifestações [6,7]. Nos adultos, a toxoplasmose pode causar várias complicações de saúde, principalmente em indivíduos imunocomprometidos [8].

A infecção por esse protozoário induz o sistema imunológico a produzir anticorpos específicos contra o *T. gondii* (anti-*T. gondii*) [9,10]. A primeira resposta imunitária é a produção das imunoglobulinas M e A (IgM e IgA), com duração de alguns dias, seguida pela produção da imunoglobulina G (IgG) de longa duração [10]. O diagnóstico laboratorial mais comum é baseado na detecção e na quantificação de anticorpos IgG, os quais são mais facilmente encontrados na circulação sanguínea [9].

3.1.3 Antígeno carcinoembrionário (CEA)

O antígeno carcinoembrionário (CEA) é um dos biomarcadores tumorais mais bem conhecidos e estudados, sendo aplicado especialmente para testes de rastreio de detecção do câncer colorretal (CCR) [11]. O CEA é um antígeno oncofetal, pertencente à família das glicoproteínas de superfície celular, que pode ser produzido durante o desenvolvimento fetal, mas é encontrado apenas em quantidades vestigiais em células humanas adultas [12,13]. Esse antígeno oncofetal é produzido em excesso durante o desenvolvimento do câncer [13], especialmente em carcinomas do cólon e em processo de metástase, o que torna esse biomarcador extremamente útil para rastreamento de CCR, acompanhamento da eficiência do tratamento e monitorização recidivas [11–14], permitindo ainda, avaliar a progressão do câncer colorretal antes e após a ressecção cirúrgica [11].

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivos Gerais

Criar dois imunoensaios enzimáticos baseados em papel para detecção de toxoplasmose e para detecção do marcador tumoral CEA.

3.2.2 Objetivos específicos

- Criar uma microplaca de ELISA com 96 poços em papel, impressa por cera, para realização de imunoensaios em papel;
- Realizar um imunoensaio em plataforma de papel para detecção de toxoplasmose, apresentando todos os passos envolvidos em um imunoensaio indireto;
- Realizar um imunoensaio em plataforma de papel para detecção do marcador tumoral CEA, apresentando todos os passos envolvidos em um imunoensaio de captura, do tipo sanduíche;
- Avaliar estatisticamente os novos testes em papel, o que inclui: escolha do *cut-off*, cálculo da sensibilidade, especificidade e acurácia;
- Criar uma nova forma de se calcular a acurácia no Excel através de uma macro, apresentando grande inovação científica para testes p-ELISA.

3.3 MATERIAS E MÉTODOS

3.3.1 Imunoensaio indireto em papel para detecção de toxoplasmose

3.3.1.1 Sensibilização

As microzonas foram sensibilizadas utilizando 5 µL na diluição de 1:10 de uma solução de extrato proteico, oriundos da sonificação do sedimento de *Toxoplasma gondii*, diluídos em solução-tampão carbonato-bicarbonato 0,6 mol L⁻¹ em pH 9,6. Após a adição, aguardou-se a secagem das microzonas em temperatura ambiente durante 20 min. As áreas foram lavadas por 2 vezes, com solução-tampão PBS (0,01 mol L⁻¹, pH 7,4) acrescido de 0,075% V/V de Tween-20 (PBS-T), para remoção de proteínas que não foram adsorvidas no papel. O excesso de liquido foi removido utilizando-se papel de filtro.

3.3.1.2 Bloqueio

Uma solução de bloqueio contendo 10% m/V de leite em pó desnatado, 0,075% V/V Tween-20 foi preparada em solução-tampão PBS. Adicionaram-se 5 µL da solução de bloqueio em cada microzona e aguardou-se a secagem em temperatura ambiente. As áreas foram novamente lavadas por 2 vezes. A solução de bloqueio foi utilizada para bloquear sítios livres não ocupados durante a etapa de sensibilização, impedindo assim reações inespecíficas.

3.3.1.3 Aplicação do teste com amostra dos pacientes

Utilizaram-se 100 amostras sorológicas de pacientes cedidas gentilmente pelo Laboratório Médico Dr. Maricondi LTDA. O Volume de 5 µL na diluição de 1:20

em PBS-T acrescido de 1% m/V de leite em pó desnatado foi adicionado em cada microzona.

Foi aguardado até que as microzonas secassem por completo. Em seguida, as áreas foram lavadas por 5 vezes com PBS-T e removido o excesso de líquido com papel de filtro. Com as lavagens é esperada a remoção dos anticorpos que não estejam ligados às proteínas.

3.3.1.4 Revelação

Acrescentou-se 5 µL da solução de anti-IgG Humano conjugado à peroxidase na diluição de 1:1000 em PBS-T acrescidos de 1% m/V de leite em pó desnatado. Aguardou-se 20 s e as áreas foram lavadas por 10 vezes com PBS-T, removendo o excedente de líquido com papel de filtro.

Após as lavagens foi acrescentado 5 µL 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB) e aguardado o tempo de 2 min. A reação foi interrompida utilizando a solução de ácido clorídrico. Aguardou-se a secagem das áreas e a microplaca foi digitalizada. A intensidade de cor gerada foi analisada pelo programa Adobe Photoshop CS5 utilizando a ferramenta histograma no canal CMYK amarelo. A Figura 3.1 resume as etapas envolvidas na realização do ELISA em papel para detecção de toxoplasmose.

Figura 3.1 - Esquema da sequência de todas as etapas envolvidas no ensaio de ELISA em papel para detecção de toxoplasmose. A) Etapas envolvidas do ensaio imunológico para detecção de IgG contra *T. gondii*. B) Digitalização da microplaca após secagem. C) Análise da intensidade média de pixel pelo Adobe Photoshop.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

3.3.1.5 Utilização do kit ELISA tradicional

As mesmas 100 amostras foram testadas pelo kit comercial de ELISA para detecção de IgG contra *T. Gondii*. As instruções foram seguidas conforme recomendações do fabricante. As amostras foram diluídas em 1:20 na solução diluente. A leitura espectrofotométrica (densidade óptica (D.O)) foi realizada por uma leitora de microplacas em 450 nm. Os resultados obtidos foram comparados com o imunoensaio em papel.

3.3.2 Imunoensaio de captura em papel para detecção de marcadores tumorais

3.3.2.1 Sensibilização

As microzonas foram sensibilizadas utilizando 5 μL de uma solução contendo anticorpos policlonais contra o antígeno carcinoembrionário (anti-CEA) (1 mg mL^{-1}) diluído a 1:10 em solução-tampão carbonato-bicarbonato ($0,6 \text{ mol L}^{-1}$, pH 9.6). Aguardou-se até que as microzonas secassem completamente à temperatura ambiente (20 min). As áreas foram lavadas por 2 vezes, com solução-tampão PBS pH 7,4 acrescido de 0,075% de Tween-20 (PBS-T), para remoção dos anticorpos que não foram adsorvidas no papel. O excesso de líquido foi removido utilizando-se papel de filtro.

3.3.2.2 Bloqueio

A etapa de bloqueio foi idêntica ao procedimento realizado para o imunoensaio para detecção de toxoplasmose, usando 5 μL de uma solução de bloqueio contendo 10% m/V de leite em pó desnatado, 0,075% V/V Tween-20, e após a secagem, lavado por 2 vezes com PBS-T.

3.3.2.3 Adição de amostra dos pacientes

O Laboratório Médico Dr. Maricondi forneceu gentilmente 33 amostras sorológicas de pacientes que foram previamente testados para presença do antígeno carcinoembrionário (CEA) pela técnica de quimiluminescência em equipamento comercial. As amostras foram diluídas a 1:20 em solução-tampão

PBS-T, e 5 μL dessa solução foram adicionados a cada microzona. Após secagem (20 min), as microzonas foram lavadas 5 vezes com PBS-T.

3.3.2.4 Anticorpos secundários

Foram adicionados em cada microzona 5 μL de uma solução de anticorpo anti-CEA (1 mg mL^{-1}) conjugado com biotina diluídos a 1:20 em solução-tampão PBS-T. Após secagem (20 min), as microzonas foram lavadas 10 vezes com solução-tampão PBS-T para remover os anticorpos não-ligados.

3.3.2.5 Revelação

Foram adicionados em cada microzona 5 μL de uma solução de avidina conjugada com peroxidase (avidina-peroxidase) diluído em solução-tampão PBS-T a 1:1000. Após 20 s, as microzonas foram lavadas 10 vezes com PBS-T. Em seguida, foram acrescentados 5 μL da solução de indicador redox 3,3',5,5'-tetrametil benzidina (TMB) em cada microzona. Rapidamente foi formando a coloração azul. Após um minuto, a reação foi interrompida com a adição de 5 μL de solução de parada (solução ácida), mudando a cor de azul para amarelo. Após secagem completa (40 min), a microplaca foi digitalizada e a intensidade média de pixel foi medida utilizando a ferramenta histograma do programa Adobe Photoshop®, usando a cores CMYK. A Figura 3.2 ilustra as etapas envolvidas no ensaio de captura de CEA.

Figura 3.2 - Esquema da sequência de todas as etapas envolvidas no ensaio de ELISA em papel para detecção do marcador tumoral CEA.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Development and statistical assessment of a paper-based immunoassay for detection of tumor markers. **Analytica Chimica Acta**, v.950, p.156-161, 2017.

3.3.3 Análise estatística

Para determinar o ponto de corte para os imunoensaios em papel foi utilizado o índice (J) de Youden, e a acurácia foi calculada utilizando a área sob a curva (AUC) pela curva ROC (*Receiving Operator Characteristic*). Todas as análises foram realizadas utilizando o pacote do software "R" chamado pROC [15], disponível em <https://www.r-project.org>. R é um *software* livre para aplicações estatísticas e computacionais, e mais informações podem ser encontradas no endereço citado.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios imunoenzimáticos são considerados o padrão ouro em análises clínicas, devido sua alta sensibilidade e especificidade. O ELISA apresenta antígenos ou anticorpos previamente imobilizados numa superfície sólida e a detecção do analito é realizada através de anticorpos específicos marcados com enzimas. Esta técnica permite automação, além de apresentar uma grande versatilidade na aplicação de testes para diagnóstico, tais como ensaios de captura ou do tipo sanduíche. Contudo o ELISA requer um leitor de microplacas, que pode custar próximo de R\$ 60.000,00 [3]. Os imunoenaios baseados em papel requerem apenas um *scanner* de mesa para análise dos resultados, que possui um custo em torno de R\$300,00 [3]. Os dispositivos à base de papel proporcionam uma elevada sensibilidade, assim como os testes convencionais, além de apresentar vantagens, tais como o baixo custo, a simplicidade de fabricação, a velocidade de análise e a possibilidade de fabricá-los localmente.

3.4.1 Potencial da cera na criação de camada hidrofóbica

O intuito de utilizar uma impressora de cera está na capacidade hidrofóbica que a cera possui, capaz de conter líquidos em determinada zona em volumes acima de sua capacidade de absorção, como ilustrado na Figura 3.3. Essa figura foi baseada na microplaca de ELISA de 96 poços, e demonstra a versatilidade do papel na criação das mais variadas plataformas para diagnóstico.

Figura 3.3 - Fotografia dos microdispositivos em papel após impressão com cera com posterior aquecimento pela prensa térmica. a) criação das microzonas reacionais. b) potencial da cera como criador de barreiras hidrofóbicas.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

3.4.2 Imunoensaio indireto em papel para detecção de toxoplasmose

As comparações foram feitas entre os ensaios realizados nos dispositivos de ELISA em papel e com kit comercial ELISA. Os parâmetros para comparações foram os volumes de reagentes e amostras consumidos durante cada etapa (sensibilização, bloqueio, de reação e revelação), assim como, o tempo gasto durante estas etapas.

No que diz respeito ao tempo consumido, o método baseado em papel apresenta vantagens em relação aos testes convencionais. Os testes de ELISA em papel levam cerca de 60 min para completar todas as etapas, enquanto a técnica de ELISA convencional necessita cerca de 310 min para completar o ensaio, como representado na Figura 3.5A.

Ao considerarmos o volume gasto na realização dos testes, os testes baseados em papel apresentaram grandes vantagens sobre os testes de ELISA comercial. Enquanto o método em papel usa 5 μL por etapa, testes de ELISA convencionais precisam de 100 μL por etapa, como mostrado na Figura 3.4B.

Figura 3.4 - Comparação ELISA x ELISA em papel. A) Tempo gasto por etapa. B) Volume gasto por etapa.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

Quando comparamos o custo por etapa, os dispositivos em papel apresentaram um valor bastante inferior quando comparado com método convencional, principalmente nas etapas de sensibilização e revelação, resultando em uma diferença de custo total de cerca de R\$ 61,20 entre os dois métodos por placa de 96 ensaios. Além disso, o elevado valor de um leitor de microplacas de ELISA implica em uma maior discrepância no preço entre as técnicas imunológicas, uma vez que ELISA em papel utiliza apenas um *scanner* ou um dispositivo fotográfico. A comparação completa em relação aos custos está apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Comparação dos custos entre ELISA x ELISA em papel

	ELISA em papel	ELISA
Custo por microplaca	R\$0,02	R\$5,00
Sensibilização	R\$9,05	R\$18,37
Anti-IgG humano	R\$0,03	R\$0,12
Revelação	R\$0,26	R\$5,39
Custo associado ao tempo do analista	R\$10,00	R\$51,67
*Custo total	R\$19,36	R\$80,55
Análise dos resultados	Scanner/Celular (~R\$300,00)	Leitor de microplaca (R\$60.000)

*custo por 96 análises

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

O processo de fabricação de dispositivos baseados em papel por impressão cera é simples e barato, com um custo de ~\$0,001 por cm² usando papel cromatográfico Whatman No. 1 [16]. Uma microplaca em papel para realização de um ELISA custa aproximadamente ~R\$ 0,02, o que resulta em um diagnóstico realmente barato. Dessa forma se considerarmos os ensaios individuais, um ELISA em papel ficaria em torno de ~R\$0,09/ensaio ou ~R\$0,20/ensaio, já considerando o custo da hora/trabalho, o que o torna uma ferramenta atraente para rastreamento de doenças. Todas as etapas da técnica de ensaio imunoenzimático em papel são realizadas em temperatura ambiente, dispensando a utilização de qualquer equipamento analítico sofisticado, além de permitir a fabricação local dos dispositivos.

3.4.2.1 Determinação do *Cut off*, sensibilidade, especificidade e precisão do ELISA em papel para detecção de toxoplasmose

Os ensaios foram realizados com amostras suspeitas para toxoplasmose, Utilizando O kit comercial de ELISA, considerado padrão-ouro para classificar o *status* dos pacientes (positivo ou negativo) para toxoplasmose. A bula do teste informou um *cut off* de 1,0 de densidade óptica (D.O.), com um intervalo de confiança de $\pm 10\%$, sendo zona incerta (zona cinza) do teste entre $0,9 < \text{Abs} < 1,1$. Valores com D.O. acima de 1,1 foram considerados positivos e abaixo de 0,9 negativos. Considerando todos os pacientes (com amostras sorológicas), o teste comercial classificou 62 amostras como positivas, 33 como negativas e 5 pacientes como incertos (dentro da zona cinza).

Para avaliação de um novo teste de diagnóstico, são comparados os resultados obtidos por este teste com os resultados oriundos do método padrão, submetendo as mesmas amostras a estes ensaios. A Tabela 3.2 e as Equações 3.1, 3.2 e 3.3 ilustram como é comumente avaliado um novo teste para diagnóstico [17].

Tabela 3.2 - Parâmetros para avaliação de desempenho de um teste diagnóstico

	Doentes	Não Doentes	Total
Positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	VP + FP
Negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)	FN + VN
Total	VP + FN	VN + FP	VP + FN + VN + FP

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Swets, J.A. Measuring the Accuracy of Diagnostic Systems. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1285–1293, 1988

$$Sensibilidade = \frac{VP}{VP + FN} \quad (3.1)$$

$$Especificidade = \frac{VN}{VN + FP} \quad (3.2)$$

$$Acurácia = \frac{VP + VN}{VP + FP + VN + FN} \quad (3.3)$$

Para calcular a sensibilidade, especificidade e precisão de um método, tal como representado nas equações 3.1-3, é necessário definirmos um ponto de corte (*cut-off*) do novo método [18–20]. Esse valor irá determinar o limiar entre os resultados positivos e negativos. O ponto de corte em um teste de diagnóstico deve atingir um nível ótimo entre sensibilidade e especificidade [21]. Uma maneira de determinar o valor de *cut-off* é traçar um gráfico da sensibilidade (*Se*) e especificidade (*Sp*) em função do ponto de corte: o valor de *cut-off* será definido como o ponto de intersecção entre essas duas linhas [22]. Outra maneira de definir o ponto de corte é usando o índice (*J*) de Youden, que é calculado usando a Equação 3.4.

$$J = Sp + Se - 1 \quad (3.4)$$

Esse índice é uma função de sensibilidade e especificidade, variando entre 0 e 1, sendo o ponto mais elevado da curva (mais próximo de 1) escolhido como o valor de *cut-off* para o teste [19]. Aplicamos essas ferramentas para definir o valor de *cut-off* para o teste, a fim de obter a melhor combinação de sensibilidade e especificidade. Usando o gráfico da sensibilidade e especificidade em função do ponto de corte, obtivemos um *cut-off* = 24,74 U.A (unidades arbitrárias, obtida a

partir da intensidade média de pixel), resultando em uma sensibilidade = especificidade = 0,87 (Figura 3.5A). Quando nós aplicamos o índice de Youden obtivemos um *cut-off* = 21,73 U.A. e uma sensibilidade = 0,96 e uma especificidade = 0,87 (Figura 3.5B).

Figura 3.5 - Métodos para determinação do *cut-off* para o ELISA em papel para detecção de toxoplasmose. A) Gráfico da sensibilidade e especificidade em função do ponto de corte (*cut-off* = 24,74 U.A.). B) Gráfico utilizando o índice de Youden (*cut-off* = 21,73 U.A.).

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

Foi escolhido valor de *cut-off* (21,73 U.A.) calculado pelo índice de Youden, uma vez que foi possível obter um ganho na sensibilidade quando comparado com o outro método. Nota-se que o método da sensibilidade e especificidade em função do *cut-off* possui uma região antes do ponto de corte entre 19 e 24 U.A. em que a linha da especificidade permanece inalterada, enquanto que a linha a sensibilidade apresenta um decaimento. Fica claro que se escolhido um valor inferior a 24 U.A. haverá um ganho de sensibilidade, tal como apresentado pelo índice de Youden. Dessa forma, o método sensibilidade x especificidade não é o melhor método para o cálculo de *cut-off* no referido teste diagnóstico.

Em testes diagnósticos o valor de *cut-off* é usado como o limiar que separa a pacientes doentes de pacientes saudáveis [23]. No entanto, essa classificação binária (doentes e não doentes) nem sempre pode fornecer um resultado clínico realmente seguro para o rastreio da doença [24], estando propenso a diagnósticos equivocados, tais como falsos positivos e falsos negativos [23,25]. Para evitar esses resultados equivocados, é necessário utilizar 3 zonas de classificação ao invés de apenas 2, sendo realizada da seguinte forma: i) doente; ii) não doente; iii) zona cinza (inconclusivos) [23]. A zona cinza é uma região que contém um determinado nível de incerteza (falsos positivos e falsos negativos), em uma tentativa de fornecer um dispositivo de diagnóstico mais seguro [23,25].

Diferentes critérios podem ser aplicados para criar uma zona cinza em um teste de diagnóstico. Isso inclui uma análise da razão de verossimilhança positiva (RVP) e razão de verossimilhança negativa (RVN) [23,25]; um fator numérico sobre o desvio padrão (DP) dos valores obtidos pelas amostras negativas, e até mesmo uma percentagem de tolerância sobre valor de *cut-off* [26–28]. Os resultados incertos pertencentes à zona de cinza devem ser testados por um segundo método para confirmar o diagnóstico [23,25].

Como dito anteriormente, das 100 amostras sorológicas testadas pelo teste ELISA comercial, 62 amostras foram classificadas como positivas, 33 como negativas e 5 pacientes como incertos pelo método padrão de cálculo definido pelo fabricante. Para o imunoensaio em papel utilizando classificação a binária simples, classificou-se 70 amostras positivas e 30 amostras negativas. Ao traçarmos um gráfico utilizando-se o teste em papel no eixo X e o teste ELISA comercial no eixo Y (Figura 3.6), foi possível observar a presença de resultados falsos positivos e falsos negativos.

Figura 3.6 - Correlação diagnóstica entre ELISA comercial x ELISA em papel para observação de resultados falsos positivos e falsos negativos. (+) Resultados positivos confirmados pelo teste ELISA comercial. (-) Resultados negativos confirmados pelo teste ELISA comercial. (o) Resultados incertos (zona cinza) classificados pelo teste ELISA comercial.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

Na intenção de diminuir o número de amostras classificadas como falsos positivos (4 amostras) e falsos negativos (2 amostras) resolvemos criar uma zona cinza. Escolhemos um modelo que consiste na aplicação de uma tolerância em porcentagem (10%, 12%, 15% e 20%) sobre o valor de *cut-off* (21,73 U.A.) (Figura 3.7).

Figura 3.7 - Correlação diagnóstica entre ELISA comercial x ELISA em papel com aplicação de níveis variados de tolerância (em porcentagem) sobre o cut-off (21,73 U.A.). A) $\pm 10\%$ de tolerância. B) $\pm 12\%$ de tolerância. C) $\pm 15\%$ de tolerância. D) $\pm 20\%$ de tolerância. (+) Resultados positivos confirmados pelo teste ELISA comercial. (-) Resultados negativos confirmados pelo teste ELISA comercial. (o) Resultados incertos (zona cinza) confirmados pelo teste ELISA comercial.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

Os dados da Figura 3.7 mostram que o aumento da porcentagem de tolerância aplicado sobre valor de *cut-off* foi capaz de diminuir o número de falsos negativos para zero. A tabela 3.3 apresenta a quantidade de falsos positivos, falsos negativos e amostras classificadas dentro da zona cinza para cada porcentagem de tolerância aplicada sobre *cut-off*.

Tabela 3.3 - Aplicação de níveis variados de tolerância (em porcentagem) sobre o cut-off para o teste de ELISA em papel para detecção de toxoplasmose

Tolerância sobre o <i>cut-off</i>	Falsos positivos	Falsos negativos	Amostras na zona cinza
$\pm 10\%$	4	2	6
$\pm 12\%$	4	2	8
$\pm 15\%$	3	0	16
$\pm 20\%$	3	0	23

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

Diante disso, é possível perceber que as porcentagens menores de tolerância $\pm 10\%$ e $\pm 12\%$ não conseguiram eliminar os resultados falsos negativos e não diminuíram os falsos positivos. Já quando aplicamos $\pm 15\%$ foi possível eliminar todos os falsos negativos, classificando apenas 3 amostras como falsos positivos. Enquanto que, a aplicação de $\pm 20\%$ não apresentou vantagem sobre $\pm 15\%$, além de aumentar consideravelmente o número de amostras dentro da zona cinza.

Portanto, fica claro que a tolerância de $\pm 15\%$ sobre o *cut-off* é a que melhor se adequa a esse método. Cabe ressaltar que embora 3 amostras foram classificadas como falsos positivos isso terá pouco impacto sobre o teste desenvolvido sobre a plataforma de papel, uma vez que os testes em papel devido ao seu baixo custo são utilizados em testes de triagem, e esses tipos de testes precisam ter uma alta sensibilidade, resultado que nosso teste apresentou.

Testes sensíveis são ideais para serem aplicados em locais distantes, permitindo identificar um grupo de pessoas “possivelmente doentes” e encaminhá-las para centros clínicos. Nos casos dos falsos positivos, para toxoplasmose, no centro clínico seria confirmada a ausência da doença, não afetando a saúde do

paciente. Há problemas quando os testes apresentam resultados falsos negativos, pois pessoas doentes podem passar pela triagem e não serem conduzidas a um tratamento adequado, podendo levar a sequelas irreversíveis. Nessa classificação de $\pm 15\%$ de tolerância, não tivemos nenhum resultado falso negativo.

A acurácia (proporção de predições corretas) de um ensaio de diagnóstico é determinada pela sua sensibilidade e especificidade [24]. A *Receiver Operating Characteristic* (ROC) *Curve* aparece como um método padrão para fornecer uma precisão de testes de diagnóstico [22,24,29]. A curva ROC é obtida traçando um gráfico de sensibilidade (eixo y) por $1 - \text{especificidade}$ (eixo x) [29]. Para construir uma curva ROC é necessário classificar as amostras de uma forma dicotomizada (0 = não doente, 1 = doente). Essa classificação é feita utilizando um método padrão ouro, nesse caso o ELISA comercial comparando com o novo ensaio diagnóstico [24], para essa situação é o ELISA em papel. Como é preciso dicotomizar os resultados para gerar curva, as 5 amostras classificadas na zona cinza pelo ELISA comercial foram excluídas, sendo utilizadas 95 amostras para o cálculo da acurácia. Nós usamos a pacote-R pROC [15] para calcular a curva ROC, representada na Figura 3.8.

Figura 3.8 - Curva ROC aplicada ao ELISA baseado em papel, utilizado para calcular a acurácia do imunoensaio em papel para detecção de toxoplasmose.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

A acurácia do teste corresponde à área sob a curva (AUC) da Figura 3.8. O valor máximo de acurácia (100%) corresponde a toda a área de um quadrado 1×1 , então subtraindo a área gerada pela curva obtemos a acurácia do novo teste diagnóstico. O imunoensaio baseado em papel para detecção de toxoplasmose apresentou AUC = 0,97. Um valor de AUC = 0,97 representa uma alta precisão para um teste de diagnóstico, aproximando-se do valor de acurácia máxima [24].

A curva ROC é dependente dos pontos de corte, ou seja, cada ponto da curva ROC representa um ponto de corte diferente que possui uma sensibilidade (eixo y) e especificidade (eixo x), respectivamente. Embora aqui o eixo x é formado por $1 - \text{especificidade}$, está assim representado para que os valores partam de 0 para 1.

3.4.2.1.1 Cálculo da acurácia por análise comparativa pelo Excel

Na intenção de criar uma nova ferramenta para calcular a acurácia, cuja análise que não seja dependente do *cut-off* por um teste não-paramétrico proposto por Obuchowski *et al.* (2004) [24], desenvolvemos em colaboração com o grupo do professor Gustavo E.A.P.A. Batista (ICMC – USP – São Carlos) uma macro no Excel que realiza tal análise. Além disso, essa ferramenta não necessita a dicotomização dos resultados, o que permite uma análise mais precisa dos dados. Basicamente, os resultados do teste para cada paciente são comparados com os resultados de todos os outros pacientes, analisando pares de amostras, ou seja, verifica se uma variação que ocorre no teste padrão-ouro também ocorre no novo teste diagnóstico. Diferentes pesos são atribuídos de acordo com o evento que ocorre. Por exemplo, atribui-se peso = 1 quando a amostra com o maior valor no resultado padrão-ouro também é o valor mais alto no novo método. O peso = 0,5 será atribuído quando não houver diferença de valores entre um par específico de amostras. Por fim, será atribuído peso = 0 se nenhum desses eventos ocorrerem, uma vez que o método considerará esse evento como um “resultado errado”. Assim, para estimar a precisão do teste, esses valores são somados e divididos pelo número de pares comparados. A precisão estimada pelo teste não-paramétrico é definida pela Equação 3.5 [24].

$$\theta = \frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n w(p_{it}, p_{js}) \sigma(i, j) \quad (3.5)$$

n : Número de resultados disponíveis no estudo

w : Peso atribuído ao teste

p_{it} : Resultado do i -ésimo paciente com o padrão de ouro

p_{js} : Resultado do j -ésimo paciente com novo teste diagnóstico

A função $\sigma(i,j)$ garante que o peso w só é atribuído se $j \neq i$, por exemplo, se $j = i$, $\sigma(i,j) = 0$, caso contrário $\sigma(i,j) = 1$. Os pesos (w) são distribuídos da seguinte forma:

- $w = 1$, caso $t > s$ e $p_{it} > p_{js}$ ou $t < s$ e $p_{it} < p_{js}$;
- $w = 0,5$, caso $t = s$ e $p_{it} = p_{js}$;
- $w = 0$, nenhuma das outras opções.

Diante disso, esse teste não-paramétrico foi utilizado para se criar uma macro no Excel para estimar a acurácia do teste em papel. Nomeamos essa Macro que calcula a acurácia de “*m-Accuracy*”, e todo o cálculo é realizado através de um único comando (Ctrl+Shift+T), tornando a análise bastante simples, eficiente e menos suscetível a erros humanos. A *m-Accuracy* é formada por 2 colunas: na 1ª coluna são inseridos os valores obtidos pelo teste padrão ouro, nesse caso os 100 resultados (média das triplicatas) obtidos pelo ELISA comercial (densidade óptica), enquanto que na 2ª coluna são inseridos os valores obtidos pelo novo teste diagnóstico (para as mesmas amostras), o qual se deseja calcular a acurácia, nesse caso, as médias de intensidade de pixel obtidas pelo ELISA em papel (média das triplicatas). Foi calculada uma acurácia de 0,88 utilizando o *m-Accuracy*. A Figura 3.9 ilustra como funciona a *m-Accuracy* no formato de um tutorial.

Figura 3.9 - Esquema envolvendo todos os passos para o cálculo da acurácia de um novo teste diagnóstico pela *m*-Accuracy. A) Macro sem a inserção dos dados. B) Inserção dos dados, 1ª coluna (ELISA comercial), 2ª (ELISA em papel). C) Seleção das 2 colunas contendo os valores dos resultados. D) Comando Ctrl+Shift+T pressionado, e cálculo da acurácia realizado, resultando em 0,88.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* (Submetido) Improved assessment of accuracy and performance indicators in paper-based ELISA. **Analytical Methods**, 2017.

Ao observar os passos descritos acima, nota-se a simplicidade da ferramenta criada, bem como a grande importância que a *m*-Accuracy agregará para clínica médica. Essa é a primeira vez que esse tipo de análise é incorporada em uma

Macro, e todo o desenvolvimento dessa ferramenta, juntamente com o teste em papel para detecção de toxoplasmose, o que auxilia no desenvolvimento de ferramentas analíticas de baixo custo para regiões necessitadas.

3.4.3 Imunoensaio de captura em papel para detecção de marcadores tumorais

As microplacas utilizadas aqui para ensaio ELISA do tipo “sanduíche” para detecção de marcadores tumorais - antígeno carcinoembrionário (CEA) - são as mesmas microplacas de papel utilizadas para os ensaios para detectar toxoplasmose. O tempo total para realização do ensaio é de ~2 horas, utilizando 5µL por etapa.

Fica claro que os tempos e os volumes requeridos pelos ensaios em papel em todas as etapas são bastante inferiores aos ensaios convencionais. Essas qualidades impactam diretamente no preço dos dispositivos e na possibilidade de utilizá-los como ferramentas de triagem de doenças.

3.4.3.1 Determinação do *Cut off*, sensibilidade, especificidade e acurácia do ELISA em papel para detecção de CEA

Foram utilizadas 33 amostras de pacientes, as quais foram também testadas por quimiluminescência (padrão-ouro) que determina o valor de 9 ng mL⁻¹ de CEA como valor limiar de classificação. Dessa forma, valores acima de 9 ng mL⁻¹ são considerados como resultados positivos, e abaixo desse valor são considerados resultados negativos. Diante disso, foram classificadas 24 amostras como positivas, e 9 amostras foram classificadas como negativas. Cabe salientar, que os testes de quimiluminescência não utilizam zona cinza, havendo apenas a classificação

quantitativa de CEA, cabendo ao clínico interpretar tais valores.

Utilizamos as 2 formas anteriormente descritas para calcular o ponto de corte (gráfico da sensibilidade e especificidade em função do *cut-off*, e o índice de Youden). A Figura 3.10, mostra os gráficos obtidos. Usando o gráfico da sensibilidade e especificidade em função do ponto de corte, obtivemos um *cut-off* = 65,78 U.A. (unidades arbitrárias, obtida a partir da intensidade média de pixel), resultando em uma sensibilidade = especificidade = 0,86 (Figura 3.11A). Quando aplicamos o índice de Youden obtivemos um *cut-off* = 68,28 U.A., uma sensibilidade = 0,86 e uma especificidade = 1 (Figura 3.11B).

Figura 3.10 - Métodos para determinação do *cut-off* para o ELISA em papel para detecção de marcadores tumorais. A) Gráfico da sensibilidade e especificidade em função do ponto de corte (*cut-off* = 65,78 U.A.). B) Gráfico utilizando o índice de Youden (*cut-off* = 68,28 U.A.).

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Development and statistical assessment of a paper-based immunoassay for detection of tumor markers. **Analytica Chimica Acta**, v.950, p.156-161, 2017.

Novamente optamos em escolher um valor de *cut-off* que apresentasse maiores valores para sensibilidade e especificidade (*cut-off* = 68,28 U.A.). Quando escolhemos esse critério, o índice de Youden fornece uma especificidade máxima

para o método. É importante destacar que a escolha do *cut-off* dependerá dos critérios adotados pelo analista. Todas as decisões estatísticas são arbitrárias, e irão depender de quais características se pretendem priorizar. O índice de Youden soma a sensibilidade e especificidade subtraindo o valor obtido por 1. Esse tipo de cálculo maximiza ambos os valores ao mesmo tempo, por isso apresentará valores superiores aos resultados obtidos pelo gráfico sensibilidade x especificidade. Poderia também ser acrescentando um fator numérico a um dos critérios, sensibilidade ou especificidade, na geração do gráfico pelo índice de Youden. Por exemplo, um teste para detectar HIV é interessante possuir elevada especificidade, enquanto que um teste para detecção de algum patógeno mais comum é recomendável alta sensibilidade, para identificar os pacientes e encaminhá-los para centros clínicos para confirmação e início do tratamento.

Ao observar a Figura 3.10A, nota-se que o método da sensibilidade e especificidade em função do *cut-off* possui uma região linear depois do ponto de corte entre 65 e 70 U.A. em que a linha da sensibilidade permanece inalterada, enquanto que a linha da especificidade apresenta um aumento acentuado. Fica claro que se escolhido um valor superior a 65 U.A. haverá um ganho de especificidade, tal como apresentado pelo índice de Youden. Dessa forma, o método sensibilidade x especificidade também não é o melhor método para o cálculo de *cut-off* para o referido teste diagnóstico.

Das 33 amostras sorológicas testadas por quimiluminescência, foram classificadas 24 amostras como positivas, 9 como negativas. Já para o imunoensaio em papel utilizando classificação binária, classificaram-se 21 amostras positivas e 12 amostras negativas. Ao traçar um gráfico utilizando a intensidade média de pixel obtida pelo teste em papel (eixo X) e quimiluminescência (eixo Y) (Figura 3.11), foi

possível observar a presença de 3 resultados classificados como falsos negativos.

Figura 3.11 - Correlação diagnóstica entre quimiluminescência x ELISA em papel para observação de resultados falsos positivos e falsos negativos. (+) Resultados positivos confirmados por quimiluminescência. (-) Resultados negativos confirmados por quimiluminescência.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Development and statistical assessment of a paper-based immunoassay for detection of tumor markers. **Analytica Chimica Acta**, v.950, p.156-161, 2017.

No intuito de eliminar as amostras classificadas como falsos negativos (3 amostras) criamos uma zona cinza, variando-se uma tolerância sobre uma porcentagem (10%, 12%, 15% e 20%) do valor de *cut-off* (68,28 U.A.) como mostra a Figura 3.12.

Figura 3.12 - Correlação diagnóstica entre quimiluminescência x ELISA em papel com aplicação de uma tolerância variável em porcentagem sobre o cut-off ($J = 68,28$ U.A.). A) $\pm 10\%$ de tolerância. B) $\pm 12\%$ de tolerância. C) $\pm 15\%$ de tolerância. D) $\pm 20\%$ de tolerância. (+) Resultados positivos confirmados por quimiluminescência. (-) Resultados negativos confirmados por quimiluminescência.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Development and statistical assessment of a paper-based immunoassay for detection of tumor markers. **Analytica Chimica Acta**, v.950, p.156-161, 2017.

Ao analisar os dados da Figura 3.12, nota-se que o aumento da porcentagem de tolerância aplicado sobre valor de *cut-off* foi capaz de eliminar os resultados falsos negativos. A tabela 3.4 apresenta a quantidade de falsos positivos, falsos negativos e amostras classificadas dentro da zona cinza para cada porcentagem de tolerância aplicada sobre *cut-off*.

Tabela 3.4 - Aplicação de níveis variados de tolerância (em porcentagem) sobre o cut-off para o teste de ELISA em papel para detecção de CEA

Tolerância sobre o <i>cut-off</i>	Falsos positivos	Falsos negativos	Amostras na zona cinza
$\pm 10\%$	0	1	8
$\pm 12\%$	0	0	8
$\pm 15\%$	0	0	9
$\pm 20\%$	0	0	10

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Development and statistical assessment of a paper-based immunoassay for detection of tumor markers. **Analytica Chimica Acta**, v.950, p.156-161, 2017.

Ao aplicar uma porcentagem de $\pm 10\%$ sobre *cut-off* apenas 1 amostra apresentou resultado falso negativo, sendo incluídas 8 amostras na zona cinza. Quando se aplicou $\pm 12\%$ foram eliminados todos os resultados equivocados que a classificação binária forneceu, mantendo-se as mesmas 8 amostras na zona cinza. Enquanto que as tolerâncias de $\pm 15\%$ e $\pm 20\%$ apenas incluíram um número maior de amostras na zona cinza (9 e 10 amostras respectivamente).

Portanto, fica claro que a tolerância de $\pm 12\%$ sobre o *cut-off* foi a que melhor se adequou a esse teste diagnóstico, não havendo nenhum resultado falsos positivo ou falso negativo.

Novamente utilizamos a curva ROC para calcular a acurácia do teste, que nos forneceu um acurácia de 0,97 (Figura 3.13), que reflete um valor muito próximo de um teste considerado perfeito (100% preciso).

Figura 3.13 - Curva ROC aplicada ao ELISA baseado em papel, utilizado para calcular a acurácia do imunoensaio em papel para detecção do marcador tumoral CEA.

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Mazzu-Nascimento, T. *et al.* Development and statistical assessment of a paper-based immunoassay for detection of tumor markers. **Analytica Chimica Acta**, v.950, p.156-161, 2017.

Analisando o perfil da curva gerada, percebe-se que há menos recortes do que a curva ROC gerada para o ensaio de toxoplasmose. Como já mencionado, cada ponto da curva representa um *cut-off* diferente, e como o número de amostras para o CEA (33 amostras) é menor que o número de amostras para o ensaio de toxoplasmose (100 amostras) haverá bem menos pontos na curva, refletindo em um perfil diferente, embora ambas curvas resultem no mesmo valor de acurácia. Quanto maior o número de amostras mais suave será a curva gerada. Há também a possibilidade de se aplicar ferramentas que suavizam a curva, porém, embora a curva pareça mais harmônica, pode haver a perda de informações e fornecer um resultado diferente do real.

Calculamos também a acurácia das 33 amostras utilizando média das triplicatas pela *m-Accuracy*, o que forneceu uma acurácia de 0,90, como mostrado na Figura 3.14.

Figura 3.14 - *m*-Accuracy aplicada para calcular a acurácia do ELISA em papel para detecção de marcadores tumorais.

Fonte: Autoria própria.

Cabe ressaltar, que *m*-Accuracy embora seja análoga a curva ROC, independe do valor de *cut-off* escolhido, e assim fornece um resultado mais próximo da realidade. Mais do que isso, *m*-Accuracy traz grande inovação para a clínica médica.

3.5 CONCLUSÃO

Os imunoensaios em papel se mostraram extremamente versáteis, capazes de detectar diferentes analitos. O primeiro ensaio foi capaz de detectar toxoplasmose (IgG contra *T. gondii* presente nas amostras). O *cut-off* calculado para esse teste foi de (21,73 U.A.) utilizando o índice de Yonden, com sensibilidade = 0,96 e uma especificidade = 0,87. A tolerância em porcentagem sobre o *cut-off* que mais se adequou para a criação da zona cinza foi de 15%, classificando apenas 3 amostras como falsos positivos. A acurácia calculada pela curva ROC forneceu um valor de 0,97, enquanto que *m-Accuracy* calculou uma acurácia de 0,88. O segundo dispositivo permitiu a detecção do marcador tumoral CEA, através de um ensaio do tipo sanduíche. O *cut-off* calculado para esse teste foi de (68,28 U.A.) utilizando o índice de Yonden, com sensibilidade = 0,86 e uma especificidade = 1. A tolerância em porcentagem sobre a o *cut-off* que mais se adequou para a criação da zona cinza foi de 12%, e nenhuma amostra foi classificada com resultado falso positivo ou falso negativo. A acurácia calculada pela curva ROC forneceu um valor de 0,97, enquanto que *m-Accuracy* calculou uma acurácia de 0,90. Pela primeira vez, foi aplicada essa completa avaliação estatística em testes em papel. Mais do que isso, trazemos com a *m-Accuracy* uma nova forma de calcular a acurácia, com grande inovação na área de testes diagnósticos de baixo custo, podendo também ser aplicada em outras áreas.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 LEQUIN, R.M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415–8, 2005.
- 2 NAOT, Y.; REMINGTON, J.S. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 142, n. 5, p. 757–66, 1980.
- 3 CHENG, C.M.; MARTINEZ, A.W.; GONG, J.; MACE, C.R.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; MIRICA, K.A.; WHITESIDES, G.M. Paper-based ELISA. **Angewandte Chemie**, v. 49, n. 28, p. 4771–4, 2010.
- 4 MARTINEZ, A.W.; PHILLIPS, S.T.; CARRILHO, E.; THOMAS, S.W.; SINDI, H.; WHITESIDES, G.M. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699–707, 2008.
- 5 JONES, J.L.; PARISE, M.E.; FIORE, A.E. Neglected parasitic infections in the united states: toxoplasmosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 794–799, 2014.
- 6 RORMAN, E.; ZAMIR, C.; RILKIS, I.; BENDAVID, H. Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 4, p. 458–472, 2006.
- 7 YOKOTA, K. Congenital anomalies induced by *Toxoplasma* infection. **Congenital Anomalies**, v. 35, n. 2, p. 151–168, 1995.
- 8 CARME, B.; BISSUEL, F.; AJZENBERG, D.; BOUYNE, R.; AZNAR, C.; DEMAR, M.; BICHAT, S.; LOUVEL, D.; BOURBIGOT, A.M.; PENEAU, C.; NERON, P.; DARDE, M.L. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in french guiana. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 4037–4044, 2002.
- 9 HOFGÄRTNER, W.T.; SWANZY, S.R.; BACINA, R.M.; CONDON, J.; GUPTA, M.; MATLOCK, E.; BERGERON, D.L.; FLORDE, J.J.; FRITSCH, T.R.; SWANZY, S.R.; BACINA, R.M.; CONDON, J.; HOFGA, W.T. Detection of immunoglobulin g (igg) and igm antibodies to *Toxoplasma gondii*: evaluation of four commercial immunoassay systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3313–3315., 1997.
- 10 SORENSEN, T.; SPENTER, J.; JALIAHVILI, I.; CHRISTIANSEN, M.; NORGAARD-PEDERSEN, B.; PETERSEN, E. Automated time-resolved immunofluorometric assay for *Toxoplasma gondii*-specific igm and iga antibodies: study of more than 130 000 filter- paper blood-spot samples from newborns. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 1981–1986, 2002.

- 11 SU, B.B.; SHI, H.; WAN, J. Role of serum carcinoembryonic antigen in the detection of colorectal cancer before and after surgical resection. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 17, p. 2121–6, 2012.
- 12 GOLDSTEIN, M.J.; MITCHELL, E.P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. **Cancer Investigation**, v. 23, n. 4, p. 338–351, 2005.
- 13 BENCHIMOL, S.; FUKS, A.; JOTHY, S.; BEAUCHEMIN, N.; SHIROTA, K.; STANNERS, C.P. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. **Cell**, v. 57, n. 2, p. 327–334, 1989.
- 14 DUFFY, M.J. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. **European Journal of Internal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 175–184, 2007.
- 15 DELONG, E.R.; DELONG, D.M.; CLARKE-PEARSON, D.L. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a non parametric approach. **Biometrics**, v. 44, n. 3, p. 837–845, 1988.
- 16 CARRILHO, E.; MARTINEZ, A.W.; WHITESIDES, G.M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–5, 2009.
- 17 SWETS, J.A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. **Science**, v. 240, n. 4857, p. 1285–1293, 1988.
- 18 XU, H.; LOHR, J.; GREINER, M. The selection of ELISA cut-off points for testing antibody to Newcastle disease by two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, n. 1, p. 61–64, 1997.
- 19 SCHISTERMAN, E.F.; PERKINS, N.J.; LIU, A.; BONDELL, H. Optimal cut-point and its corresponding Youden Index to discriminate individuals using pooled blood samples. **Epidemiology**, v. 16, n. 1, p. 73–81, 2005.
- 20 GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 1, p. 123–32, 1995.
- 21 SHARMA, B.; JAIN, R. Right choice of a method for determination of cut-off values: A statistical tool for a diagnostic test Balkishan. **Asian Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 30–34, 2014.
- 22 GREINER, M.; PFEIFFER, D.; SMITH, R.D. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 45, n. 1–2, p. 23–41, 2000.

- 23 COSTE, J.; POUCHOT, J. A grey zone for quantitative diagnostic and screening tests. **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 2, p. 304–313, 2003.
- 24 OBUCHOWSKI, N. A; LIEBER, M.L.; WIAN, F.H. ROC curves in clinical chemistry: uses, misuses, and possible solutions. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1118–25, 2004.
- 25 COSTE, J.; JOURDAIN, P.; POUCHOT, J. A gray zone assigned to inconclusive results of quantitative diagnostic tests: Application to the use of brain natriuretic peptide for diagnosis of heart failure in acute dyspneic patients. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 2229–2235, 2006.
- 26 KIM, W.H.; LEE, J.H.; KIM, E.; KIM, G.; KIM, H.J.; LIM, H.W. Can we really predict postoperative acute kidney injury after aortic surgery? Diagnostic accuracy of risk scores using gray zone approach. **The Thoracic and Cardiovascular Surgeon**, 2015.
- 27 ICARDI, G.; ANSALDI, F.; BRUZZONE, B.M.; DURANDO, P.; LEE, S.; LUIGI, C.D.E.; CROVARI, P. Novel approach to reduce the hepatitis c virus (hcv) window period : clinical evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for hcv core antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3110–3114, 2001.
- 28 MUÑOZ, J.C.P.; OLIVEIRA, L.G.; CARVALHO BRAGA, A.; TREVISOL, I.M.; ROEHE, P.M. Development and standardization of an indirect ELISA for the serological diagnosis of classical swine fever. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 19, n. 3–4, p. 123–127, 1999.
- 29 AKOBENG, A.K. Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. **Acta paediatrica**, v. 96, n. 5, p. 644–647, 2007.

ANEXOS

Anexo1 - Número de internações de pacientes com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016.

		Ano										
CID-10	Tipo de Neoplasia	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
C00-C14	Neoplasia maligna do lábio, cavidade oral e faringe	15067	25629	26147	27656	27766	25985	27678	26495	24439	25873	12483
C15	Neoplasia maligna do esôfago	7788	12914	11478	14064	15187	15343	16467	17003	17393	17554	8727
C16	Neoplasia maligna do estômago	10861	19154	15075	16841	18047	19609	20768	21980	23486	24992	12812
C18	Neoplasia maligna do cólon	12635	22054	22014	22877	25933	30135	33323	37108	38400	41632	21124
C21	Neoplasia maligna do ânus e do canal anal	6645	13034	13033	15110	17077	18970	20240	23258	24272	26165	13371
C22	Neoplasia maligna do fígado e das vias biliares intra-hepáticas	2243	3946	3779	4740	4948	5862	6863	7901	8074	8808	4355
C25	Neoplasia maligna do pâncreas	2034	4069	3758	4780	5130	5414	6279	7437	7923	8819	4656
C26	Outras neoplasias malignas de órgãos digestivos	6199	10135	14272	10623	10501	9821	9390	9845	9229	10420	4698
C32	Neoplasias malignas de laringe	4258	7521	8339	8732	9397	9504	9945	11419	11723	12380	5957
C33-C34	Neoplasia maligna de traqueia, brônquios e pulmões	8513	15446	13553	14935	16176	16953	18444	19697	21219	22386	11058
C39	Outras neoplasias malignas de órgãos respiratórios e intratorácicos	2084	3838	3582	3747	4038	4612	5056	4886	5281	4806	2277
C40-C41	Neoplasia maligna dos ossos e cartilagem articulares	8458	13941	11247	10926	10660	10756	10783	11206	11505	11784	5737
C43	Neoplasia maligna da pele	6589	10964	7023	8179	7801	6656	6715	7096	6611	7164	3608
C44	Outras neoplasias malignas da pele	14036	24269	13772	15980	18773	20874	22799	25409	28552	31569	16671
C45-C49	Neoplasia maligna do tecido mesotelial e tecidos moles	4743	9185	10000	12898	13913	15823	16650	19949	22316	22975	11567
C50	Neoplasia maligna da mama	22571	41424	37875	40754	43011	44024	49446	53947	55916	59574	30347
C53	Neoplasia maligna do colo do útero	16793	27153	24976	24375	23778	22533	22608	21953	20366	20307	9800
C55	Neoplasia maligna do útero, porção não especificada	12075	20212	11714	10243	10213	9265	9505	9411	9483	10185	4861
C57	Outras neoplasias malignas de órgãos genitais femininos	8606	14049	12758	12059	11635	11728	12595	13094	13956	15144	7207
C61	Neoplasia maligna da próstata	7719	14459	16913	19515	21644	23586	25314	26238	27331	29561	14192
C63	Outras neoplasias malignas de órgãos genitais masculinos	3484	5636	4400	4642	5090	4916	5139	4893	5050	5291	2594
C67	Neoplasia maligna da bexiga	4301	7876	7277	8558	9781	10133	11340	12521	13445	14386	7128
C68	Outras neoplasias malignas do trato urinário	2582	4765	4374	4947	5252	5760	6172	6619	7075	8170	4241
C69	Neoplasia maligna dos olhos e anexos	1001	1829	1706	1712	1657	1705	1609	1719	1834	2159	918
C71	Neoplasia maligna do encéfalo	7454	12812	10094	11106	11287	12081	12505	12870	12869	13440	6896
C72	Neoplasia maligna de outras partes sistema nervoso central	1596	1760	1922	2095	2145	2228	2311	2713	2455	2700	1334
C76-C80	Neoplasia maligna de localizações mal definidas, secundárias e de localizações não especificadas	29329	54036	34213	35022	38547	41110	42245	43596	46103	47209	22824
C81	Doença de Hodgkin (sistema linfático)	1251	2270	1897	2984	3169	3594	4047	4207	4140	3910	2180

C82	Linfoma não-Hodgkin	4476	8463	9475	9811	10297	11387	12450	12751	13708	15004	7108
C91-C95	Leucemia	11447	19559	19546	21593	22429	25244	26827	28602	30458	33110	17061
C96	Outras neoplasias malignas de tecidos linfóides e hematopoiéticos e tecidos correlatos	1993	3824	4335	4050	4297	4642	4918	5456	5994	6294	3196
D06	Carcinoma in situ de colo do útero	5344	9281	8844	9584	7470	5137	5325	5309	5658	6022	2784
D23	Neoplasia benigna da pele	6504	11108	4536	4897	5874	5617	6434	6795	8310	9015	4539
D24	Neoplasia benigna da mama	4636	7588	4863	5173	4764	3629	3566	4105	4630	4106	1606
D25	Leiomioma do útero	25754	44415	57349	63548	68989	69638	69779	69923	75982	73119	34245
D27	Neoplasia benigna do ovário	1029	1728	2235	2113	2126	2058	2249	1710	1840	1907	923
D30	Neoplasia benigna dos órgãos urinários	828	1603	875	773	668	645	598	646	528	420	216
D33	Neoplasia benigna do encéfalo e outras partes do sistema nervoso central	1467	2615	2360	2391	2417	2550	2484	2669	2972	2765	1402
D37-D48	Outras neoplasias in situ benignas de comportamento incerto ou desconhecido	72491	125761	84254	81338	82922	84508	88922	89107	95159	94349	45606
TOTAL		366884	640325	545863	575371	604809	624035	659788	691543	725685	755474	372309

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Acesso em: 26 Ago. 2016. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926>

Anexo 2 - Número de óbitos de pacientes internados com neoplasias de junho de 2006 a junho de 2016.

		Ano										
CID-10	Tipo de Neoplasia	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
C00-C14	Neoplasia maligna do lábio, cavidade oral e faringe	1868	3221	2665	2973	3020	2862	3067	2890	2882	3084	1559
C15	Neoplasia maligna do esôfago	1148	2005	1818	2263	2390	2447	2583	2748	2768	2965	1496
C16	Neoplasia maligna do estômago	1852	3273	2759	3254	3387	3437	3767	3993	4098	4260	2278
C18	Neoplasia maligna do cólon	987	1956	1942	2078	2362	2591	2815	3111	3273	3419	1800
C21	Neoplasia maligna do ânus e do canal anal	573	1068	1047	1251	1431	1526	1639	1810	1910	2044	1102
C22	Neoplasia maligna do fígado e das vias biliares intra-hepáticas	444	895	843	1209	1222	1354	1562	1763	1879	2135	1005
C25	Neoplasia maligna do pâncreas	511	1077	1024	1353	1380	1559	1709	2011	2001	2267	1223
C26	Outras neoplasias malignas de órgãos digestivos	813	1437	1743	1491	1588	1504	1652	1792	1932	2047	991
C32	Neoplasias malignas de laringe	402	727	777	815	976	942	1004	1082	1062	1198	623
C33-C34	Neoplasia maligna de traqueia, brônquios e pulmões	1970	3738	3388	3977	4161	4397	4786	5238	5588	5875	3042
C39	Outras neoplasias malignas de órgãos respiratórios e intratorácicos	190	324	350	388	429	554	550	536	686	623	323
C40-C41	Neoplasia maligna dos ossos e cartilagem articulares	246	449	449	486	486	482	503	521	552	637	300
C43	Neoplasia maligna da pele	188	311	283	336	427	386	396	448	480	485	259

C44	Outras neoplasias malignas da pele	132	270	206	263	329	320	299	344	353	397	216
C45-C49	Neoplasia maligna do tecido mesotelial e tecidos moles	226	503	554	772	738	827	887	917	945	1073	504
C50	Neoplasia maligna da mama	1457	2672	2861	3277	3572	3799	4101	4516	4611	4905	2740
C53	Neoplasia maligna do colo do útero	694	1477	1416	1790	1916	2020	2021	2096	2080	2278	1194
C55	Neoplasia maligna do útero, porção não especificada	216	430	382	522	556	616	625	761	778	868	446
C57	Outras neoplasias malignas de órgãos genitais femininos	381	721	742	953	974	1023	1119	1137	1243	1408	723
C61	Neoplasia maligna da próstata	645	1367	1288	1601	1784	1984	2086	2321	2480	2668	1382
C63	Outras neoplasias malignas de órgãos genitais masculinos	121	213	256	255	282	300	282	276	262	326	167
C67	Neoplasia maligna da bexiga	255	539	466	615	666	651	762	873	879	1005	518
C68	Outras neoplasias malignas do trato urinário	219	441	406	509	509	536	603	722	658	765	410
C69	Neoplasia maligna dos olhos e anexos	18	39	88	43	38	33	61	39	45	48	19
C71	Neoplasia maligna do encéfalo	1015	1751	1385	1514	1583	1653	1688	1724	1815	1837	974
C72	Neoplasia maligna de outras partes sistema nervoso central	72	140	228	235	224	263	286	341	330	325	164
C76-C80	Neoplasia maligna de localizações mal definidas, secundárias e de localizações não especificadas	3564	7055	4237	4063	4215	4443	4183	3988	4324	4596	2526
C81	Doença de Hodgkin (sistema linfático)	62	140	150	199	188	178	232	199	201	200	116
C82	Linfoma não-Hodgkin	473	904	1003	1007	1038	1068	1238	1176	1316	1331	684
C91-C95	Leucemia	936	1815	1791	1926	1951	1983	2072	2212	2157	2458	1345
C96	Outras neoplasias malignas de tecidos linfóides e hematopoiéticos e tecidos correlatos	194	473	512	517	554	527	616	639	760	820	437
D06	Carcinoma in situ de colo do útero	4	10	5	9	6	3	5	6	7	5	7
D23	Neoplasia benigna da pele	17	16	10	16	11	3	3	3	2	3	2
D24	Neoplasia benigna da mama	5	3	0	1	1	0	1	3	1	2	0
D25	Leiomioma do útero	16	28	49	26	39	46	37	44	45	55	21
D27	Neoplasia benigna do ovário	3	0	5	0	2	3	2	1	2	0	0
D30	Neoplasia benigna dos órgãos urinários	16	25	21	17	11	7	5	8	4	14	3
D33	Neoplasia benigna do encéfalo e outras partes do sistema nervoso central	99	226	202	176	164	172	154	197	180	182	93
D37-D48	Outras neoplasias in situ benignas de comportamento incerto ou desconhecido	1223	2253	1817	1949	2327	2527	2583	2854	3108	3539	1752
TOTAL		23255	43992	39168	44129	46937	49026	51984	55340	57697	62147	32444

Fonte: Adaptação de Mazzu-Nascimento (2016) a partir de Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS). Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=6926>> Acesso em: 26 Ago. 2016.