

Produção de sensores automontados para detecção de *Doença de Alzheimer*

Production of self-sensing sensors for detection of Alzheimer's Disease

Tayna Carvalho Bitencourt de Souza
bitencourttayna@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Adriano Lopes Romero
adrianoromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

Rafaelle Bonzanini Romero
rbromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil

RESUMO

No presente trabalho buscou-se estudar algumas variáveis (espessura do suporte, tratamento da superfície do suporte e condições de secagem das bicamadas) envolvidas na produção de sensores para diagnóstico da Doença de Alzheimer, que resultassem em uma melhor linearidade em relação ao crescimento das bicamadas. Para isto, foram estudados cinco sistemas formados por um total de 10 bicamadas de QT/FTC. O acompanhamento da formação das bicamadas foi feito por espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível, em seguida os valores obtidos foram expressados graficamente em número de bicamada por absorbância. Observou-se boa linearidade ($0,92524 \leq R \leq 0,99492$) para o aumento do número de bicamadas em todos os testes realizados. Concluiu-se que o melhor sistema foi produzido utilizando suporte de menor espessura, sem tratamento da superfície do suporte e secagem das bicamadas utilizando ventilação forçada. Em etapas futuras, para a produção do biossensor, será necessário a adesão de uma monocamada de acetilcolina na última camada de FTC do filme automontado.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Alzheimer. Biossensor. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

In the present work, we searched for some variables (thickness of the support, treatment of the surface of the support and conditions of drying of the bilayers) involved in the production of sensors for the diagnosis of Alzheimer's Disease, which resulted in a better linearity in relation to the growth of the bilayers. For this, five systems were studied formed by a total of 10 QT/FTC bilayers. The monitoring of the formation of the bilayers was done by ultraviolet-visible absorption spectroscopy, then the values obtained were expressed graphically in number of bilayer by absorbance. Good linearity ($0.92524 \leq R \leq 0.99492$) was observed for the increase in the number of bilayers in all tests performed. It is concluded that the best system was produced using a support of smaller thickness, without treatment of the surface of the support and drying of the bilayers using forced ventilation. In future steps, for the production of the biosensor, will require the adhesion of an acetylcholine monolayer in the last FTC layer of the automated film.

KEYWORDS: Alzheimer's disease. Biosensor. Acetylcholinesterase.

Recebido: 02 set. 2018.

Aprovado: 14 set. 2018

Direito autorial:

Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira de Alzheimer, a Doença de Alzheimer é um distúrbio cerebral que se agrava ao longo dos anos no paciente, ou seja, aumenta sua incidência em pessoas idosas. A Doença de Alzheimer causa morte de células cerebrais, tornando-se responsável pela perda de funções cognitivas. Atualmente estima-se haver cerca de 46,8 milhões de pessoas com demência no mundo. Este número praticamente irá dobrar a cada 20 anos, segundo o Relatório de 2015 da Associação Internacional de Alzheimer (ABRAZ, 2018). Essa doença ainda não possui cura, mas possui tratamento, e o diagnóstico precoce é de suma importância para a eficácia do tratamento. Ultimamente tem se buscado meios de diagnosticar a Doença de Alzheimer com alta precisão a partir de métodos menos invasivos, para isto uma alternativa é o uso de biossensores (LENIGK *et al.*, 2000; KAUSHIK *et al.*, 2016).

Segundo o laboratório de Materiais Eletroativos do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, "Um biossensor consiste em um dispositivo analítico que contém um componente biológico que garante a especificidade e produz uma resposta que é traduzida pelo componente físico em um sinal óptico ou elétrico. Podemos citar como componentes biológicos: antígenos, anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos, receptores, células e suas organelas. Todos estes materiais biológicos são capazes de produzir respostas específicas a vários analitos. Os componentes físicos são diversos, como fibras ópticas, dispositivos acústicos, cristais piezoelétricos além de diversos tipos de eletrodos modificados quimicamente. Já os sensores químicos se diferenciam dos biossensores no fato de que os mesmos não utilizam componentes biológicos na transdução do sinal físico emitido. Para tanto, tem-se amplamente desenvolvido compostos que mimetizam as principais características de biocomponentes. Uma grande vantagem destes sensores reside no fato que os mesmos podem ser produzidos com maior economia, e aplicado em sistemas onde os biocomponentes não têm alcance, como por exemplo, modificações bruscas de pH e temperatura".

Dentre as formas de obtenção de sensores, destaca-se a técnica *layer-by-layer*, um método que possibilita a produção de filmes ultrafinos organizados em nível nanométrico, por meio de diferentes tipos de materiais, de maneira simples e de baixo custo (GREGOURT, 2012). Nesta técnica, as diferentes camadas se mantêm unidas por interações eletrostáticas.

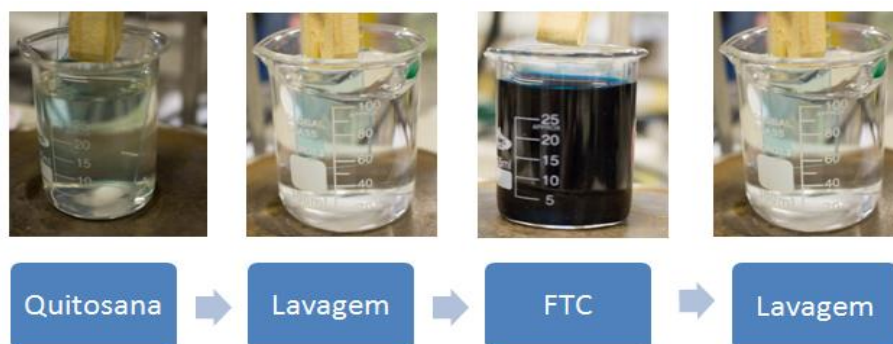
Dando continuidade aos nossos projetos de obtenção de biossensores para detecção de substâncias bioativas, no presente trabalho buscou-se estudar algumas variáveis (espessura do suporte, tratamento da superfície do suporte e condições de secagem das bicamadas) envolvidas na produção de sensores para diagnóstico da Doença de Alzheimer, que resultassem em uma melhor linearidade em relação ao crescimento das bicamadas.

MÉTODOS

Os filmes automontados, base para a produção dos sensores, foram produzidos a partir de metodologia adaptada de Rehotnek *et al.* (2017) utilizando o biopolímero quitosana (QT, poliacatiôn) e o composto ftalocianina tetrassulfonada de níquel (FTC, poliânion), ambos da marca Sigma-Aldrich, nas concentrações de 10 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente. Em cada estudo

obteve-se a formação de 10 bicamadas de QT e FTC, a partir da técnica *layer-by-layer* (Figura 1), alterando as seguintes variáveis: espessura do suporte, tratamento da superfície do suporte e condições de secagem das bicamadas (Tabela 1). Para a obtenção dos filmes automontados, o suporte modelo foi inicialmente submergido na solução aquosa de QT por 3 min. e depois submergido em água durante 2 min. para retirar QT não adsorvida. Após a secagem completa do suporte o mesmo foi submergido na solução de FTC. Este processo foi repetido dez vezes. Os materiais produzidos foram analisados em espectrofotômetro ultravioleta-visível (T70+, marca *PG Instruments*), utilizando comprimento de onda de 623 nm (máxima absorvidade molar do FTC).

Figura 1 - Etapas envolvidas na técnica *layer-by-layer* utilizada neste estudo.



Fonte: Autoria Própria (2018).

Espessura do suporte. Utilizou-se dois tipos de suporte modelo: placas de vidro com 0,13 mm (suporte 1) e 1,0 mm (suporte 2) de espessura.

Tratamento da superfície do suporte. Para o tratamento da superfície do suporte, o mesmo foi submergido em solução de $H_2SO_4:H_2O_2$ (3:1) por 20 minutos, em seguida o suporte foi lavado com água ultrapura e submergido em solução de $H_2O:H_2O_2:NH_4OH$ (5:1:1) durante 30 min. a 70 °C.

Secagem das bicamadas. Para a secagem dos filmes utilizou-se ventilação forçada em dessecador, Arsec DCV040, no qual foi instalado internamente dois coolers, Storm modelo MVDC003, ou ventilação natural.

Tabela 1 - Sistemas estudados neste trabalho.

Sistema	Espessura Suporte (mm)	Tratamento	Ventilação
1	1,0	Não	Natural
2	1,0	Não	Forçada
3	1,0	Sim	Forçada
4	0,13	Não	Forçada
5	0,13	Sim	Forçada

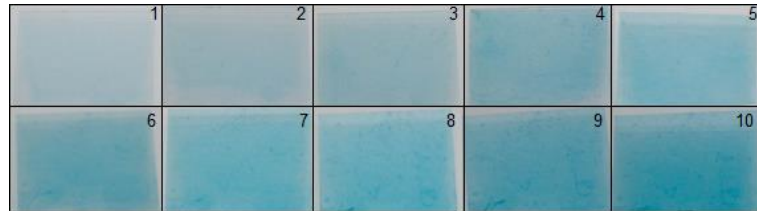
Fonte: Autoria própria (2018).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para todos os sistemas produzidos observou-se, a partir de constatação visual, que as deposições feitas nos suportes são uniformes, formando filmes homogêneos e sem manchas, com intensificação da coloração azul à medida que aumenta o número de bicamadas. Essa constatação pode ser observada na figura

2, na qual apresenta-se o aspecto visual, para o sistema 4, obtido após cada preparação de bicamada.

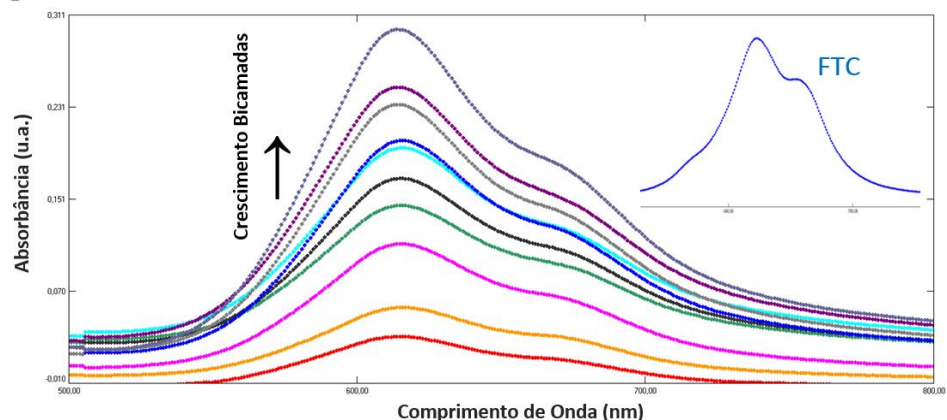
Figura 2 - Relação do aspecto visual do sistema 4 com o número de bicamadas.



Fonte: Autoria própria (2018).

A formação e crescimento das multicamadas foram acompanhadas pela intensidade da coloração azul, que é acentuada em função do crescimento das bicamadas. Esses resultados também foram monitorados por espectroscopia de absorção no UV-Vis (Figura 3). Os espectros de absorção em função do comprimento de onda foram obtidos a cada deposição do FTC sobre os filmes de quitosana. A partir das varreduras pode-se observar o aumento da banda de absorção máxima do FTC em 623 nm, *inset* da Figura 3, em função do número de bicamada depositada.

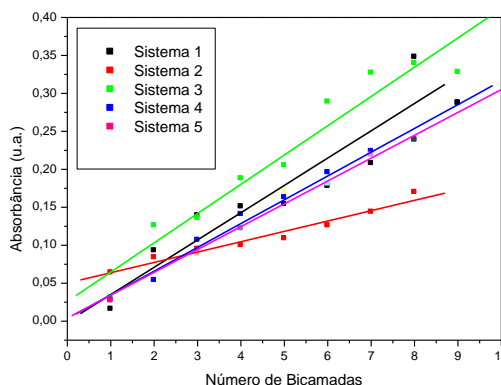
Figura 3 - Espectros de absorção no UV-Vis do sistema 4 em função do número de bicamadas de QT/FTC. *Inset*: Espectro de absorção no UV-Vis da solução de FTC.



Fonte: Autoria própria (2018).

A linearidade referente à formação de bicamadas de QT/FTC sobre os suportes foram analisadas a partir dos gráficos de absorbância em função do números de bicamadas (Figura 4).

Figura 4 - Curva de crescimento dos filmes de QT/ FTC para os cinco sistemas estudados.



Fonte: Autoria própria (2018).

Os valores de linearidades de formação de bicamadas para os cinco sistemas estudados são apresentados na Tabela 2. Observou-se uma boa linearidade ($0,92524 \leq R \leq 0,99492$) para a formação das bicamadas nos cinco sistemas estudados. Ao comparar a linearidade de formação das bicamadas nos filmes relativos aos sistemas 1 e 2, observou-se que a ventilação forçada contribuiu para um crescimento mais linear das bicamadas em relação a secagem natural, além de diminuir o tempo envolvido no processo de obtenção dos filmes.

Tabela 2 – Valores de linearidade relacionada à formação de bicamadas nos sistemas estudados.

Sistema	Linearidade (R)
1	0,92251
2	0,98747
3	0,97656
4	0,99416
5	0,99492

Fonte: Autoria própria (2018).

Em relação à espessura do suporte é possível observar que o uso do suporte de menor espessura resultou em filmes com melhores linearidades de crescimento das bicamadas.

Em relação a variável tratamento da superfície do suporte observou-se, ao comparar os resultados dos sistemas 2 e 3, que a linearidade de obtenção das bicamadas é menor em relação ao processo sem tratamento. Esse resultado indica que o tratamento químico na superfície mostra-se dispensável pois, tornando-se apenas um gasto de recursos materiais e tempo desnecessário

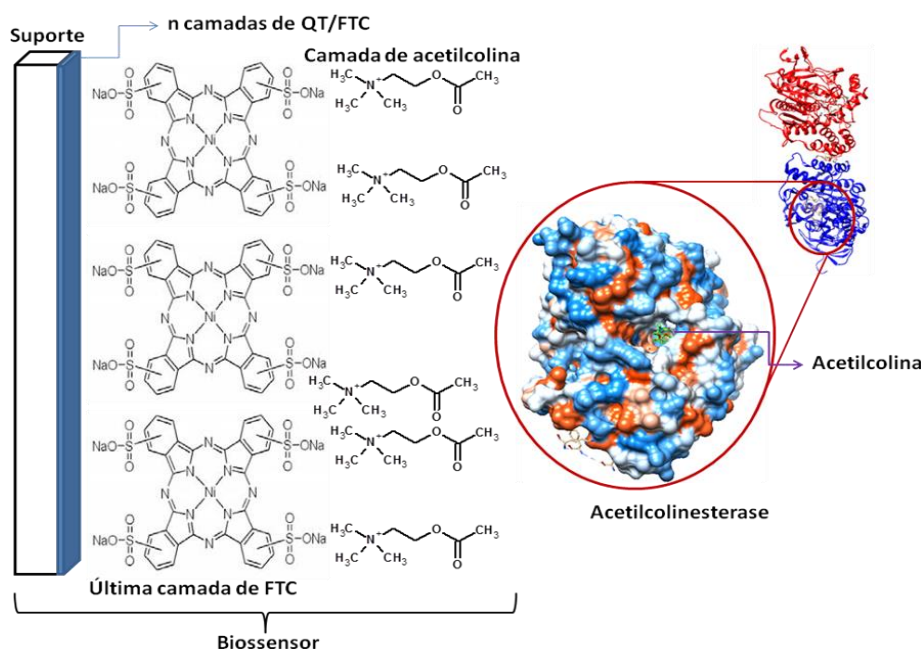
Atualmente, a técnica de automontagem permite a fabricação de filmes ultrafinos a partir de diferentes tipos de materiais, de maneira rápida e barata, com um elevado controle da espessura dos filmes depositados, o que resulta em eficiência em diferentes aplicações. A seguir será apresentado discutido o mecanismo de preparação dos filmes automontados, que são base para a produção do biossensor.

No presente estudo utilizou-se a quitosana como polieletrólito catiônico, que se adsorve na superfície do vidro por interações eletrostáticas. A formação da bicamada ocorre pela deposição de polieletrólitos aniônico, FTC, sobre a

superfície do polímero. As multicamadas são formadas pela imersão alternadas em soluções com espécies de carga oposta (tal como apresentado na figura 1), as atrações eletrostáticas permitirão a adsorção sequencial de multicamadas dessas espécies carregadas. A agregação de mais de uma monocamada de uma espécie dissolvida sobre a superfície é evitada por repulsão eletrostática.

Para continuidade do trabalho a última camada, constituída pelo poliânion FTC, será funcionalizada com acetilcolina, substância catiônica, que atua como substrato da enzima acetilcolinesterase, uma das enzimas que estão associadas à Doença de Alzheimer. Uma representação ilustrando a interação existente entre a última camada de FTC e acetilcolina na proposta de biossensor para diagnóstico da Doença de Alzheimer está esquematizada na Figura 5.

Figura 5 - Representação ilustrando a interação existente entre a última camada de FTC e acetilcolina na proposta de biossensor para diagnóstico da Doença de Alzheimer.



Fonte: Autoria própria (2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível compreender a influência de diferentes variáveis na obtenção de bicamadas de QT/FTC em filmes automontados, que são a base para a produção do biossensor para diagnóstico da Doença de Alzheimer representado na figura 5.

Para a produção do biossensor, na próxima etapa será avaliada a interação de uma monocamada de acetilcolina na última camada de FTC. Acredita-se que a partir das interações estabelecidas entre as moléculas de acetilcolina, aderidas na última camada do filme automontado, e as enzimas acetilcolinesterase livres presente no líquido cefalorraquidiano será possível diagnosticar a possibilidade da Doença de Alzheimer.

AGRADECIMENTOS

Tayna Carvalho Bitencourt de Souza agradece a Universidade Tecnológica Federal do Paraná pela bolsa de Inovação.

REFERÊNCIAS

ABRAZ. Associação Brasileira de Alzheimer. O que é Alzheimer. Disponível em: <<http://abraz.org.br/alzheimer>>. Acesso em 20 ago. 2018.

GREGORUT, C. **Avaliação do desempenho de uma língua eletrônica na identificação de cultivares de soja**. 2010. 105f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) - Universidade de São Paulo, São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3140/tde-10012011-091647/pt-br.php>>. Acesso em: 20 ago. 2018.

KAUSHIK, A.; JAYANT, R. D.; TIWARI, S.; VASHIST, A.; NAIR, M. Nano-biosensors to detect beta-amyloid for Alzheimer's disease management. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 273-287, jun. 2016.

LABORATÓRIO DE MATERIAIS ELETROATIVOS DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Sensores / Bio-sensores**. Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/rtorresi/portugues/interesse/Sensores.htm>>. Acesso em: 26 ago. 2018.

LENIGK, R.; LAM, E.; LAI, A.; WANG, H.; HAN, Y.; CARLIER, P.; RENNEBERG, R. Enzyme biosensor for studying therapeutics of Alzheimer's disease. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, n. 9-10, p. 541-547, 2000.

RECHOTNEK, F.; SANTOS, B. C. S; ROMERO, A. L.; ROMERO, R. B. Obtenção e caracterização de filmes poliméricos ultrafinos automontados com violeta cristal. **Colloquium Exactarum**, v. 9, n.4, p. 56-62, out./dez. 2017. Disponível em: <<http://revistas.unoeste.br/revistas/ojs/index.php/ce/article/view/2269/2096>>. Acesso em: 20 ago. 2018.