

# APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO FATORIAL EM DESENVOLVIMENTO DE BIOSENSOR PARA HEPATITE C.

Carolina Venturini Uliana, Hideko Yamanaka, João Olímpio Tognolli. – Química – Departamento de Química Analítica – Instituto de Química – Campus de Araraquara.

Modificações específicas de superfície de eletrodo são importantes, uma vez que promovem um alto grau de seletividade possibilitando o desenvolvimento de sensores de fácil manipulação e construção, baixo custo, potencial de miniaturização e detecção rápida<sup>1</sup>. Desta forma, a utilização de agentes modificadores representa uma alternativa aos eletrodos clássicos. Um exemplo de eletrodo quimicamente modificado é o biossensor. O biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecido animal e vegetal, células, organelas, etc.) imobilizado junto a um transdutor adequado (dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) o qual converte um sinal biológico em sinal elétrico<sup>2</sup>.

No desenvolvimento de novos métodos analíticos e no melhoramento/adaptação dos métodos já estabelecidos, estudam-se fatores que exibem efeitos significativos sobre a resposta do sistema e que podem ser ajustados para melhorar os resultados do método, por exemplo, aumentar a sensibilidade, diminuir reações paralelas e melhorar separações entre sinais analíticos. Técnicas envolvendo a otimização multivariada, atualmente vêm sendo aplicadas em química analítica por permitirem, dentre outras vantagens, a otimização simultânea de todos os fatores envolvidos no sistema com menor número de experimentos, maior rapidez e principalmente maior eficiência. Entre os métodos de planejamento experimental disponíveis na literatura, o mais recomendado é o planejamento fatorial. O planejamento fatorial é classificado como um método simultâneo, no qual as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo.

De um modo geral, o planejamento fatorial pode ser representado por  $b^k$ , onde “k” é o número de fatores e “b” é o número de níveis escolhidos<sup>3</sup>. Planejamentos fatoriais do tipo  $2^k$  são os mais comuns<sup>4</sup>. O número de ensaios necessário para a execução de um planejamento fatorial completo  $2^k$  aumenta rapidamente com k, o número total de fatores investigados. Deste modo, pode-se aplicar um planejamento fatorial fracionado, fazendo-se um número de ensaios bem menor, correspondente a uma fração do número de ensaios do planejamento completo. Neste caso, utiliza-se um planejamento  $2^{(k-p)}$ , em que k é o número de variáveis e p é o tamanho da fração.

A imobilização de DNA em superfícies sólidas é de grande interesse em aplicações biotecnológicas e biologia molecular. Diferentes suportes sólidos, como vidro, cerâmicas, silício, pérolas magnéticas, nylon, polímeros e membranas são de interesse para a construção de formatos miniaturizados. Biossensores de DNA têm sido desenvolvidos para análise e determinação de seqüências de bases de DNA com o intuito de diagnósticos de doenças, sendo que no presente trabalho desenvolveu-se um biossensor para detecção do vírus da Hepatite C.

Para obtenção das medidas eletroquímicas, empregou-se um Potenciostato-Galvanostato EG&G modelo 263. Uma célula eletroquímica de compartimento único de volume de 5 mL foi utilizada para as medidas, juntamente com um sistema de três eletrodos: eletrodo de trabalho (grafite modificado, perfazendo uma área de 0,00318 cm<sup>2</sup>), eletrodo de referência (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar (Pt, área de 1 cm<sup>2</sup>). A técnica utilizada foi a amperometria a potencial controlado.

Os eletrodos de grafite foram modificados de acordo com a seqüência: 1) deposição de filmes sol-gel por método dip-coating; 2) adsorção da proteína estreptavidina (STA); 3) bloqueio da superfície eletródica com albumina de soro bovino (BSA); 4) imobilização das sondas de DNA biotinizadas específicas para Hepatite C (b-DNA); 5) reação de hibridização com amostras de soro de pacientes positivos para Hepatite C (c-DNA); 6) adsorção do conjugado avidina-peroxidase (A-HRP), marcador da reação de hibridização.

A cada etapa, os eletrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato pH 7,0. O monitoramento da atividade da enzima HRP, marcadora da reação de hibridização, foi realizado empregando-se peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ácido 5-aminossalicílico (5-ASA), sendo que as soluções foram preparadas, imediatamente antes do uso, em água deionizada, nas concentrações de 0,07 e 0,001 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. O sistema operou a -0150V vs. Ag/AgCl.

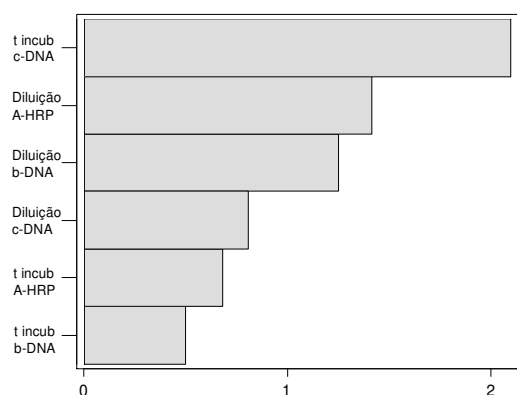
Estudos preliminares estabeleceram alguns dos parâmetros como: tempo de incubação dos eletrodos em solução de STA 0,01 mg mL em pH 7,0 por 1 hora; bloqueio da superfície eletródica com BSA 1,0% por 30 minutos. Deste modo, as variáveis a serem definidas compreendem: a diluição e tempo de incubação das sondas de DNA biotinilado específicas para Hepatite C; diluição e tempo de incubação da amostra positiva de VHC e, diluição e tempo de incubação do conjugado avidina-peroxidase.

Sendo seis as variáveis a serem otimizadas, compreendendo dois níveis para cada uma, um planejamento fatorial completo constaria de  $2^6$  experimentos, ou seja, 64 experimentos. Daí a necessidade de se realizar um planejamento fatorial fracionado, optando-se pelo  $2^{6-3}$ , ou seja, oito experimentos, que é o número mínimo de experimentos a serem realizados. A Tabela 1 mostra os níveis alto e baixo para as diferentes variáveis. Estes valores foram escolhidos tendo como base os estudos prévios realizados em outro projeto de biossensor para detecção da Hepatite C.

**Tabela 1:** Planejamento Fatorial de seis variáveis e dois níveis

Variável	Nível alto	Nível baixo
<b>Diluição b-DNA</b>	1:40	1:80
<b>t<sub>incubação</sub> b-DNA</b>	30 minutos	15 minutos
<b>Diluição c-DNA</b>	1:4	1:8
<b>t<sub>incubação</sub> c-DNA</b>	60 minutos	30 minutos
<b>Diluição A-HRP</b>	1:100	1:1000
<b>t<sub>incubação</sub> A-HRP</b>	30 minutos	15 minutos

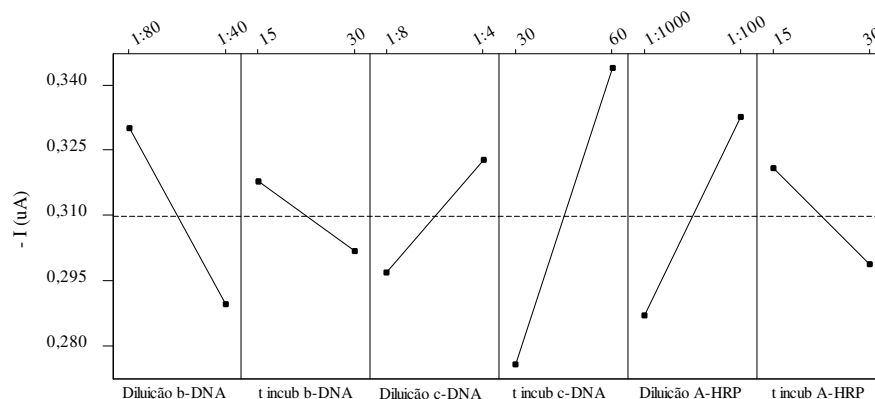
Obtidas as combinações entre os níveis, os experimentos foram realizados, obtendo-se as intensidades de corrente. Por meio do programa computacional Minitab™ Statistical Software foi possível verificar os efeitos de cada termo, que podem ser observados no Gráfico de Pareto (Fig. 1).



**Figura 1:** Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros no sistema do genossensor para Hepatite C.

O parâmetro mais importante, ou seja, que exerce maior influência sobre o sistema, é o tempo de incubação dos eletrodos na solução das amostras positivas de Hepatite C, seguido pela diluição do conjugado avidina-peroxidase e diluição da sonda de DNA biotinilado.

Foi possível determinar também as influências dos níveis alto e baixo de cada variável. As retas apresentadas na Fig.2 expressam a tendência em termos de intensidade de corrente quando altera-se o parâmetro do nível baixo para o alto. A variável 'tempo de incubação do c-DNA', por exemplo, tende a resultar em maior I quando  $t_{incub} = 60$  min. Quanto mais inclinada for a reta, maior a influência do parâmetro sobre o sistema. Desta maneira, confirma-se que o tempo de incubação dos eletrodos na solução das amostras positivas de Hepatite C, diluição do conjugado avidina-peroxidase e diluição da sonda de DNA biotinilado são os parâmetros mais importantes e deverão ser estudados mais profundamente. As demais variáveis, por terem menor influência sobre o sistema, foram assim fixadas:  $t_{incubação}$  b-DNA = 15 minutos; diluição c-DNA = 1:4;  $t_{incubação}$  A-HRP = 15 minutos.



**Figura 2:** Tendência da intensidade de corrente para os níveis alto e baixo para cada variável.

Por meio do planejamento fatorial aplicado aos experimentos de otimização das etapas de construção do biossensor para Hepatite C, pode-se observar a influência de cada variável sobre o sistema. Os parâmetros com menores influências foram fixados de acordo com a melhor resposta em termos de intensidade de corrente e os parâmetros que são mais importantes serão analisados mais profundamente em estudos posteriores. Os resultados mostraram-se promissores, indicando que a aplicação de planejamento fatorial é importante no desenvolvimento de biossensores.

## Referencias Bibliográficas

- <sup>1</sup> WANG, J.; Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications, VCH Publishers; Deerfield Beach, 1985.
- <sup>2</sup> FATIBELLO FILHO, O., CAPELATO, M. D.; Biossensores. *Quím. Nova*, v. 15, n. 2, p 28-39, 1992.
- <sup>3</sup> [www.chemkeys.com/bra/md/peeo\\_6/mdpf\\_3.htm](http://www.chemkeys.com/bra/md/peeo_6/mdpf_3.htm), acessado em Julho de 2006.
- <sup>4</sup> PEREIRA, A.C.; KUBOTA, L.T. Otimização da preparação de eletrodo de pasta de carbono contendo riboflavina imobilizada em suporte inorgânico. *Quim. Nova*, v.27, n.5, p.725-729, 2004.

**Bolsa:** FAPESP