

PROCEDIMENTO DE AFERIÇÃO DE AMOSTRA BIOLÓGICA EM ÁGUA POR ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA

P. D. Mendonça*, M. T. Bezerra**, L. K. B. Santos, M. Yaseen**, R. G. Lima-Neto***, P. S. Lessa**, F. D. Nunes**

*Departamento de Engenharia Biomédica/UFPE, Recife, Brasil

**Departamento de Eletrônica e Sistemas/UFPE, Recife, Brasil

***Departamento de Medicina Tropical/UFPE, Recife, Brasil

e-mail: priscadm07@gmail.com

Resumo: A Bioimpedância é um método para caracterizar materiais por meio de sua resposta à aplicação de tensão elétrica, utilizando uma ou diferentes frequências. Este trabalho tem a finalidade de determinar se a existência de uma suspensão de células (micro-organismos) pode ser detectada em amostras com a técnica de Espectroscopia de Bioimpedância. Os resultados obtidos mostraram que soluções salinas isotônicas contendo suspensão de micro-organismos diferem em suas respostas elétricas em relação à amostra de solução salina estéril. De fato, o método pode identificar se uma amostra de solução salina, um meio com alta condutividade elétrica, contém ou não micro-organismos.

Palavras-chave: Bioimpedância, Solução Salina, Detecção de Micro-organismos, LabVIEW.

Abstract: *The bioimpedance is a method to characterize materials by its response to the application of electrical voltage, using one or different frequencies. This study aims to determine if the existence of a suspension of cells (microorganisms) could be detected in samples with the Bioimpedance Spectroscopy technique. The obtained results showed that isotonic saline solutions containing microorganism suspensions differ in their electrical responses with respect to the sterile saline solution sample. In fact, the method can identify whether or not the saline solution sample, a high electrical conductivity medium, contains microorganisms.*

Keywords: *Bioimpedance, Saline solution, Detection of Micro-organisms, LabVIEW.*

Introdução

Os tecidos biológicos são constituídos por células com propriedades semelhantes. As células são formadas pela união de moléculas organizadas de forma fixa e compostas por diversos elementos químicos. Dentre esses elementos, existem os inorgânicos como a água e os sais, e os orgânicos, como os ácidos, carboidratos, proteínas e lipídios. Aproximadamente 80% desse total corresponde a água e 3% a sais inorgânicos [1]. O estudo de materiais biológicos causam um impacto, a curto prazo, à qualidade da vida humana, e tem uma ampla variedade de aplicações clínicas, farmacológicas e terapêuticas [2].

A água é de vital importância para a sociedade, pois participa de quase todos os processos bioquímicos. Como ela é abundante em seres vivos, constitui um importante veículo de propagação de contaminantes biológicos ou físico-químicos. Além disso, a água é uma das mais importantes substâncias no desenvolvimento e fabricação de alta tecnologia, como insumo utilizado na preparação de medicamentos [3] [4].

A bioimpedância é aplicada regularmente para estudar materiais biológicos desde o início do século passado (século XX) [2]. Ela é um método de análise que caracteriza materiais por sua resposta elétrica à aplicação de tensão, utilizando uma ou diferentes frequências excitatórias. A impedância elétrica é a propriedade de um material que cria oposição a passagem da corrente elétrica sob a aplicação de uma determinada voltagem [5] [6]. O diagrama de Bode é uma forma mais prática de exibir dados obtidos por circuitos elétricos, que é bastante utilizado por engenheiros eletrônicos. Este diagrama apresenta as respostas do sistema em magnitude e em fase, ambas em função da frequência da tensão aplicada [7].

De maneira geral, a técnica de medida consiste em colocar a amostra do material sob investigação entre dois eletrodos, aplicar um estímulo elétrico e observar a resposta resultante. O estímulo mais comum é a tensão alternada, pois permite medir as partes reais e imaginária da resposta elétrica. Com os dados obtidos, calcula-se a impedância elétrica da amostra [7] [8]. A pesquisa teve o objetivo de elaborar um procedimento de medição para compostos de amostra biológica em água por espectroscopia de impedância, e avaliar se o sistema é capaz de determinar que uma amostra está contaminada ou não.

Materiais e métodos

Preparação das amostras – Foram utilizadas pipetas automáticas, tubos de ensaio, ponteiros, alça em “O” (descartável), *swab*, tubos *Eppendorf*, algodão, álcool a 70% e água destilada esterilizada. Para o preparo da solução salina isotônica foi utilizada água destilada e cloreto de sódio a uma concentração 0,85g/l. A solução salina isotônica foi escolhida para evitar a lise das células durante as medições. Parte dessa solução foi separada como amostra de referência. Amostras-base

(suspensões) foram criadas ao adicionar três a cinco Unidades Formadoras de Colônia de dois tipos de micro-organismos: leveduras do gênero *Candida albicans* 99 e a bactéria *Escherichia coli* k-12; a 1ml de solução salina atingindo uma concentração na faixa entre $2,5 \times 10^8$ a 5×10^8 células/ml confirmada pela Espectrofotometria (UV-Visível GENESYS 10S Thermo Scientific). Desta suspensão com células foi retirada uma alíquota de 200uL e adicionado ao *ependorf*.

Foram feitas 3 amostras em duplicata de cada suspensão e realizada duas medições consecutivas destas amostras, conforme representado na Figura 1.

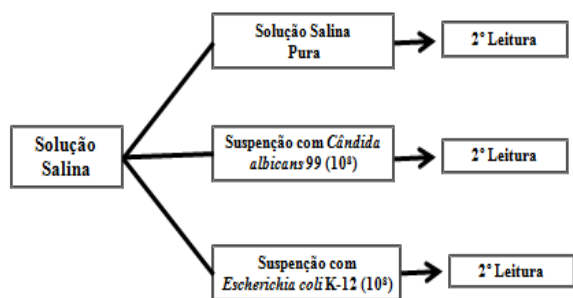


Figura 1: Diagrama de preparação das amostras do experimento.

Preparação da medição – Antes de cada nova medição, foi realizada a limpeza dos eletrodos com álcool-70% e água destilada em abundância. As amostras aquosas foram acondicionadas em tubos *Eppendorf* e foram descartadas após cada medição.

Equipamento de Medição – O sistema de medição é baseado no sistema *MyDAQ*, da *National Instruments*. O *MyDAQ* é um dispositivo portátil de aquisição de dados de baixo custo, capaz de medir e analisar sinais elétricos. Seu sistema eletrônico é multifunção, definido pela necessidade do experimento e com a programação do dispositivo. O programa é escrito em linguagem *LabVIEW*.

O equipamento de medição, descrito na Figura 2, foi projetado para medir dados de tensão elétrica e convertê-los em dados digitais, que por sua vez são enviados para o computador onde se realiza a etapa de processamento [8].

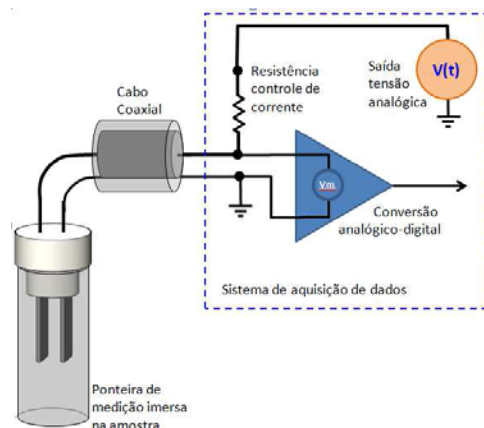


Figura 2: Diagrama esquemático do circuito de medição[8].

A Figura 3 mostra o sistema construído em funcionamento.

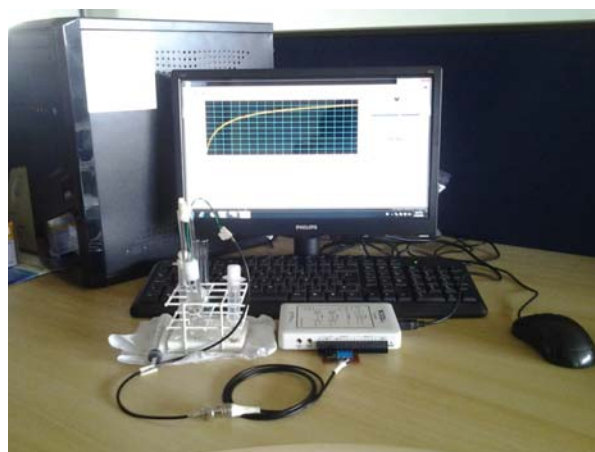


Figura 3: Sistema de medição construído com base em Bezerra [8].

Experimento Proposto – Foi construído um sistema de medição de bioimpedância. O equipamento mede a tensão elétrica em uma amostra conectada a um circuito simples, conforme exposto na Figura 2. O circuito é composto por duas impedâncias. Uma delas é um resistor de controle de corrente, com valor conhecido para que seja possível calcular a corrente elétrica que flui pelo circuito. A outra impedância é a amostra com micro-organismos. Ao medir a tensão elétrica entre os eletrodos da amostra, é possível calcular a corrente do circuito e as grandezas elétricas características da amostra.

Espera-se que diferentes amostras tenham diferenças na quantidade de íons e sais dissolvidos, também em função do tipo e da quantidade de células em cada amostra. A quantidade de íons dissolvidos tem relação com a resistência elétrica da amostra. E a mobilidade desses íons pelo líquido determina quanto tempo à amostra leva para reagir à aplicação de tensão externa. Realizou-se o experimento com a aplicação de tensão elétrica alternada, com frequência e amplitude

controladas, sobre as amostras. Mediu-se o ganho de tensão na amostra, uma grandeza adimensional expressa em decibel (dB), para o caso em que a razão entre a tensão medida e a tensão aplicada tem valor muito pequeno, dado pela expressão

$$\text{Ganho (dB)} = 20 \cdot \log_{10} \left(\frac{V_{\text{medido}}}{V_{\text{aplicado}}} \right) \quad (1)$$

Onde V_{medido} é a tensão elétrica medida pelo equipamento e V_{aplicado} é a tensão elétrica aplicada à amostra.

Mediu-se também a diferença de tempo entre o início do ciclo da tensão elétrica aplicada e o início do ciclo da tensão medida na amostra. Essa diferença de tempo é mais conhecida como diferença de fase, dada em graus [7]. Dessa maneira simplifica-se a discussão já que o período da onda é a referência de tempo.

Resultados

A Tabela 1 destaca valores numéricos de ganho e diferença de fase para a frequência de 8 kHz, dos dados obtidos na medição de bioimpedância nessas amostras.

Tabela 1: Valores medidos de ganho e fase das amostras.

Frequência: 8kHz	Ganho (dB)	Diferença de Fase (graus)
Solução salina pura	-61,458	-44,333
Solução salina + 10^8 células/ml (bactérias)	-64,189	-46,086
Solução salina + 10^8 células/ml (fungos)	-64,208	-47,145

Os resultados obtidos com o sistema proposto encontram-se na Figura 4, que condensam os dados de medição de ganho de tensão Figura 4(A) nas amostras e a respectiva diferença de fase Figura 4(B).

Discussão

A interpretação informal do gráfico de ganho de tensão elétrica é que amostras com maior condutividade elétrica têm menor valor de ganho. Como os valores de tensão elétrica medidos são menores que o valor de tensão elétrica aplicada à amostra, os valores de ganho são negativos, de acordo com a Equação (1).

Os dados da Tabela 1 mostram que o sistema diferenciou as soluções com suspensão de células da solução salina quanto ao ganho de tensão. Essas soluções com suspensões de células têm maior condutividade elétrica do que a solução salina de referência.

Este comportamento manteve-se em todas as frequências utilizadas, como visto na Figura 4(A).

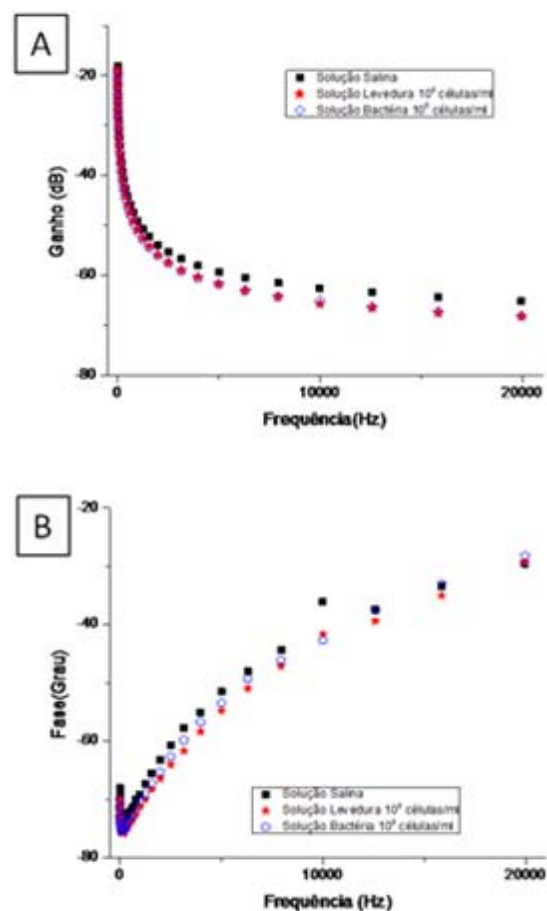


Figura 4: Dados obtidos das grandezas elétricas de ganho (A) e fase (B) obtidas na medição.

Utilizando a Equação (1), os valores medidos de tensão elétrica para a solução salina e para as soluções com suspensões de células estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores medidos de tensão elétrica das amostras.

Frequência: 8kHz	Tensão elétrica medida (mV)
Solução salina pura	1,691
Solução salina + 10^8 células/ml (bactérias)	1,234
Solução salina + 10^8 células/ml (fungos)	1,232

A especificação técnica do equipamento utilizado tem resolução de medição de 16 bits, o que equivale a $61\mu\text{V}$ [9]. Como a diferença entre os valores de tensão elétrica medidos na solução salina e nas soluções com

suspensões de células foi de $460\mu\text{V}$, é suficiente para categorizar as amostras como distintas da solução salina, porque é significativamente maior que a resolução de medição do equipamento.

O mesmo não pode ser afirmado ao comparar as duas amostras com suspensões de células. Como visto na Tabela 2, se houver alguma diferença de tensão medida nas soluções, é inferior à resolução do equipamento.

A medição da diferença de fase foi feita simultaneamente com a medição de ganho de tensão. Mudanças na diferença de fase são provocadas por alterações na concentração total de íons dissolvidos. O acréscimo de células de bactérias e de fungos aumentou a concentração total de íons nas soluções, e tornou mais negativo a diferença de fase. Esse comportamento também se manteve em todas as frequências, como visto na Figura 4(B).

Conclusão

Pelos resultados expostos neste estudo, conseguiu-se observar que o sistema foi capaz de diferenciar as amostras com suspensão de células da amostra de solução salina de referência.

Verifica-se pelo gráfico da Figura 4(A) e pela Tabela 2, que o método de medição por Espectroscopia de Bioimpedância é capaz de diferenciar e detectar a presença de alta concentração de células em meios com alta condutividade.

Experimentos adicionais estão sendo realizados sobre esse estudo. Uma das principais dificuldades encontradas na pesquisa é a escassa literatura sobre essa abordagem.

A partir dos resultados encontrados, observa-se que será possível estabelecer um modelo de circuito elétrico equivalente para cada tipo de amostra. A teoria que será utilizada para fazer essa correspondência entre resposta de ganho e fase com o modelo de circuito elétrico equivalente é a de síntese de filtros passivos, como encontrado em Nilsson e Riedel [7], para ter uma maneira quantitativa de caracterizar diferentes amostras.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo financiamento e Gabriela Maria Ferreira de Oliveira pelo suporte nos experimentos realizados.

Referências

- [1] Pereira RM. Desenvolvimento de um Sistema de Espectroscopia de Impedância Elétrica Multicanal [dissertação]. Joinville. Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- [2] Cabrera FH, Salazar CAG, Alvarado JDJB. Determinación de las Propiedades Eléctricas en Tejido Sanguíneo. *Ingenierías*. 2005; 8(29):7-13.

- [3] Marinho LS. Abastecimento d'água em pequenos aglomerados urbanos do Estado da Paraíba [Dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2006.
- [4] Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira [internet] novembro de 2010 [citado em 16 de janeiro de 2014]; Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopea/pdf/volume2.pdf.
- [5] Macdonald JR, Barsoukov E. Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications. 2ª ed. New York: John Wiley and Sons; 2005.
- [6] Chinaglia DL, Gozzi G, Alfaro RAM, Hessel R. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. *Revista Brasileira de Ensino de Física*. 2008; 30(4): 4504-1 – 4504-9.
- [7] Nilsson J, Riedel S. Circuitos Elétricos. 6ª Ed. Rio de Janeiro: LTC; 2003.
- [8] Bezerra MT. Análise de Efeitos em Interface entre Soluções Aquosas e Metal e a Influência sobre as Propriedades Ópticas das Soluções [dissertação]. Recife. Universidade Federal de Pernambuco, 2013.
- [9] National Instruments. User Guide and Specifications NI My DAQ. [internet] 2011 Dec [cited 2014 Apr 22]. Available from: <http://www.ni.com/pdf/manuals/373060e.pdf>