



# SÍNTESE DE SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS COMO PLATAFORMAS BIOSSENSORAS PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Ítalo Gustavo de Lira Moura<sup>1\*</sup>, Liandra Roberta Pinho da Cunha Coutinho<sup>1</sup>, Gabriel Galdino Gadelha<sup>1</sup>, Rosa Amália Fireman Dutra<sup>1</sup>, Washington Andrade da Cunha Coutinho Filho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Diagnósticos em Saúde, UFPE;

\*italo.moura@ufpe.br

## INTRODUÇÃO

Um recente aumento na carga de doenças cardiovasculares, principalmente em países subdesenvolvidos, reflete o aumento da expectativa de vida e, consequentemente, do maior tempo de exposição aos fatores de risco para as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte nos países em desenvolvimento, e espera-se que continue sendo a causa de mortalidade mundial mais importante durante a próxima década. Atualmente, no Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 27,7% dos óbitos (WHO, 2016; MASSA; DUARTE; CHIAVEGATTO FILHO, 2019).

Métodos diagnósticos imediatos para doenças cardiovasculares são essenciais para promover cuidados terapêuticos adequados e aumentar a qualidade de vida dos indivíduos. Não obstante, a identificação de lesão cardiovascular ainda permanece como um desafio, tendo em vista que para seu diagnóstico rápido e preciso, faz-se necessária uma análise para além dos sintomas, necessitando assim de outros meios que auxiliem no diagnóstico final. A detecção de tais doenças demanda a busca por dispositivos de baixo custo, com respostas rápidas, sensíveis e seletivas, e que possam ser usados fora de laboratórios especializados (*point-of-care*). Isso é possível por meio do uso de imunossensores eletroquímicos eficazes no reconhecimento de biomoléculas (biomarcador) de relevância clínica. Tais dispositivos constituem uma interface composta por um elemento de reconhecimento biológico, denominado biorreceptor, associado a uma plataforma que promove a amplificação de sinal, que por meio de um transdutor, converte a interação formada pelo complexo antígeno-anticorpo em um sinal elétrico mensurável (FARZIN et al., 2018; PICOLLI; CILLI, 2019).

A utilização de imunossensores eletroquímicos vem ganhando destaque na área da saúde e eletrônica, medem as alterações elétricas do meio de acordo com propriedades como corrente, potencial, condutividade, resistência elétrica entre outras. Das muitas características que favorecem a utilização de um imunossensor, destacam-se a especificidade, a alta sensibilidade, a capacidade de resposta que conduz a curto tempo de análise, capacidade de inclusão do mesmo em sistemas integrados, facilidade de automação, capacidade de trabalho em tempo real, a versatilidade e o baixo custo. A fim de alcançar a fabricação de filmes ultrafinos para a construção desses nanodispositivos bem como sua caracterização, as pesquisas em eletrônica orgânica têm crescido nos últimos anos graças às promessas de vantagens referentes a um especial comportamento químico e elétrico dos materiais orgânicos. Dentre tais materiais, os polímeros condutores acabam por encontrar-se em um lugar de destaque por sua flexibilidade e, em especial seu baixo custo. Podem ser

sintetizados eletroquimicamente a partir de um maior controle dos parâmetros de síntese, dentre estes polímeros condutores, destacam-se entre outros o Poliacetileno, Polipirrol, Politiofeno, Poli (p-fenileno) e a Polianilina (GOSH et al., 2016).

A polianilina é um polímero linear conformado de monômero de anilina, o qual pode existir em um número de estados de oxidação, os seus anéis podem existir nas formas benzenóides e quinóides (Figura 1). A PANi pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, dos quais a forma esmeraldina (50 % oxidada) é a mais estável e é a única forma redox que se torna condutiva no estado dopado. Esta forma base esmeraldina (isolante) pode reagir com ácidos fortes resultando assim na forma sal esmeraldina condutora (Figura 2).

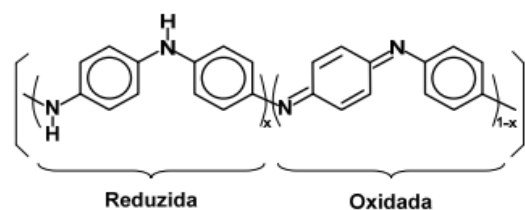


Figura 1. Estrutura geral da Polianilina (PANi), mostrando as unidades reduzidas (ganha elétrons) e oxidadas (perde elétrons).

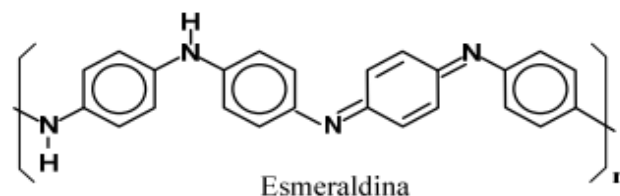


Figura 2. Esquema da composição geral da PANi indicando a unidade Esmeraldina.

A constante busca por materiais cada vez menores e com características específicas como resistência, biocompatibilidade e condução elétrica tem sido um dos principais objetivos na área tecnológica. Como resultado, nos últimos anos, novas técnicas foram descobertas e aplicadas para fabricação de materiais em escala nanométrica. O uso de nanomateriais na plataforma sensora como nanopartículas de prata, ferro, ouro, ou outro metal, quantum dots, alótropos de carbono, fulerenos, dentre outros, aumentam a área da superfície de contato e transferência de elétrons, proporcionando uma maior interação entre a biomolécula

de interesse e o biorreceptor, e assim favorecendo um aumento da sensibilidade e reprodutibilidade do biossensor/imunossensor (SOARES; DUTRA, 2016; FARZIN et al., 2018).

Estudos indicam a necessidade de expansão de pesquisas com biossensores com foco na melhoria da confiabilidade e sensibilidade, que denotam um grande potencial de replicação e utilização no auxílio diagnóstico de doenças cardiovasculares (LIU et al., 2016). Diante do exposto, emerge a necessidade de pesquisas que investiguem métodos mais eficazes que auxiliem no diagnóstico de doenças cardiovasculares. Para tanto, se faz necessário um aprimoramento das tecnologias já existentes, ampliando os estudos na área de biossensores, buscando uma melhor sensibilidade e quantificação do sinal gerado. Com base nisso, o presente estudo objetivou desenvolver superfícies nanoestruturadas para aplicação em imunossensores “point-of-care” visando o diagnóstico em saúde, particularmente marcadores de doenças cardiovasculares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A formação e caracterização do filme condutor foi realizado de acordo com as seguintes etapas: Limpeza do eletrodo de trabalho; Deposição do filme PANI e estudo de pH; Preparo de solução tampão; Estudo de concentração e deposição do filme PANI. Todas as etapas descritas adiante foram realizadas a partir de um rigor metodológico baseado nas principais literaturas da área e análises prévias do polímero. Para realização do experimento foram utilizados Eletrodos de Carbono Vítreo (ECV), Anilina (Sigma-Aldrich), Tampão Fosfato a 2 mM e Ácido Sulfúrico (P.M. 98,079 g/mol) a 1 mM.

### 1. Limpeza do eletrodo de trabalho

Antes de efetuar a deposição do filme polimérico na superfície do eletrodo, se faz necessário submeter à superfície do ECV ao procedimento de limpeza mecânica a partir de protocolo padrão. Neste procedimento, a superfície do eletrodo foi polida em um tecido aveludado embebido em alumina, o processo foi repetido em diferentes concentrações de alumina (0,5  $\mu$ , 0,3  $\mu$  e 0,1  $\mu$  respectivamente) utilizando movimentos em forma de infinito ( $\infty$ ) durante 2 minutos. Para verificação da remoção de resíduos da superfície sensora foram registrados voltamogramas cíclicos em sonda de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  à 0,005 M. Nos voltamogramas cíclicos obtidos foram analisadas as diferenças entre as voltagens de pico e valor da corrente anódico e catódico ( $I_{pa}$  e  $I_{pc}$ , respectivamente).

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um sistema tri-eletródico composto por eletrodo de trabalho (eletrodo de carbono vítreo, diâmetro= 2 mm), pelo eletrodo de referência (eletrodo de  $\text{Ag}/\text{AgCl}$ ) e pelo eletrodo auxiliar ou contra-eletrodo (fio helicoidal de platina). Todas as aquisições eletroquímicas foram realizadas utilizando o potenciostato Autolab PGSTAT204 (Metrohm), controlado pelo software NOVA 2.1. Para estudo da plataforma sensora, foram utilizadas a Voltametria Cíclica (VC), analisando a construção e o funcionamento por meio das técnicas. Na VC foi utilizada janela de potencial de -0,2 a 0,6 V, velocidade de varredura de 50  $\text{mV.s}^{-1}$  e passo de 10 mV.

### 2. Deposição do filme de polianilina (PANI) e estudo de pH's (ácido, neutro e alcalino)

Após a limpeza do ECV, um filme PANI foi polimerizado eletroquimicamente sobre a superfície sensora. Afim de se obter a forma mais condutora do filme polimérico, que consiste na forma sal esmeraldina (SE), foram feitas soluções com diferentes valores de pH: ácido (pH = 4), básico (pH = 9) e neutro (pH = 7), com o intuito de reagir com anilina e através da eletropolimerização efetuar a deposição do filme sobre o eletrodo.

### 3. Preparo da solução tampão

As soluções com diferentes pH's foram obtidas por meio de solução tampão fosfato. Para o pH 4, a preparação do tampão foi realizada a partir de um protocolo padrão obtendo-se uma solução final de 200ml. Desses, 90 ml consistiu em solução monofásica e 10 ml solução bifásica, seguida da adição de 100ml de água desionizada, resultando em uma solução com pH = 5,9. Com o objetivo de alcançar o pH ácido (pH 4), adicionou-se à solução preparada, ácido sulfúrico a 0,1M de modo gradativo e acompanhado pelo phgmetro (medidor de pH de bancada - pH PLUS) até se atingir o pH = 4. Para a solução com pH = 7 com 200 ml de solução, foi realizada uma mistura contendo 39 ml de solução monofásica e 61 ml de solução bifásica, em seguida 100ml de água desionizada foram adicionados. Neste pH não foi necessário ajustes uma vez que o valor fixo de 7 é conseguido a partir dessas medidas já estabelecidas em protocolo. Na solução com pH=9 foi adicionado 5,3 ml de solução monofásica e 94,7 ml de solução bifásica, adicionado a 100 ml de água desionizada, dessa maneira obteve-se uma solução final de pH = 8, a partir disso a solução foi alcalinizada com hidróxido de sódio de 0,1 M até se atingir um pH alcalino (pH 9).

Após obter as soluções, adicionou-se anilina a cada uma delas para realização da eletropolimerização. Foi constatado que o filme polimérico que apresentou melhor condutância referiu-se à solução com o pH mais baixo, ou seja, pH = 4. Consequentemente a esse resultado a confecção e estudo de estabilidade do filme polimérico passou a ser realizado em meio ácido, mais precisamente em ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) devido a sua eficácia verificada em outros estudos de polimerização com o PANI.

### 4. Deposição do filme de polianilina (PANI) e estudo de concentração

Uma vez estabelecido o meio mais condutor para formação do filme, realizou-se a eletropolimerização da PANI em diferentes concentrações. Com base em estudos pré-estabelecidos, utilizou-se as diferentes concentrações de 56 mM, 76 mM, 97 mol/L e 117 mM. As influências dos métodos eletroquímicos de polimerização e dos meios de polimerização foram analisadas para otimização da construção do filme polimérico de PANI. Sendo assim, foram investigados a eletropolimerização em diferentes concentrações em meio ácido, tal como o os valores da voltametria cíclica da superfície após a deposição do filme. Os seguintes métodos de eletropolimerização foram investigados: (1) Através da voltametria cíclica realizou-se a leitura do eletrodo após limpeza, para isso foi colocado o ECV imerso em uma sonda de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  à 0,005 M e foi submetido a uma janela de potencial de -0,2 a 0,6 V, com velocidade de varredura de 50  $\text{mV.s}^{-1}$  durante 3 ciclos; (2) Após verificar, por valores obtidos na literatura, que o eletrodo estava limpo, foi feito a deposição do filme PANI por eletropolimerização com as diferentes concentrações da seguinte forma: ECV foi imerso em uma solução 56 mM de anilina preparada em solução de 18,1 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e submetido à 8 ciclos voltamétricos na janela de potencial de -0,2 a 0,8 V, com velocidade de varredura de 20  $\text{mV.s}^{-1}$  (CHEN; YAU, 2014). O procedimento (2) foi repetido com solução de diferentes concentrações de anilina e verificamos uma concentração que apresentava maior condutividade, como mostraremos nos resultados mais adiante.

Utilizando o método de eletropolimerização, o ECV modificado com PANI foi submetido a um estudo de transferência de elétrons através da variação da velocidade de varredura voltamétrica (10 a 150  $\text{mV.s}^{-1}$ ) em sonda de  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$  à 0,005 M. Para verificação do comportamento difusional do filme de PANI sobre o ECV, os valores do pico anódico  $I_{pa}$  e do pico catódico foram plotados em relação a raiz quadrada da velocidade de varredura. A estabilidade do filme de PANI foi avaliado através da polimerização no ECV, executando VC em 30 ciclos em uma janela

de potencial de -0,2 V a 0,6 V, a uma velocidade de varredura de 50 mV.s<sup>-1</sup>. O coeficiente de variação (CV%) dos picos de corrente de cada eletrodo foi calculado com o objetivo de avaliada sua estabilidade e reprodutibilidade operacional. O coeficiente de variação para o I<sub>pa</sub> foi de 4% e para o I<sub>pc</sub> foi de 2%. Como os valores de corrente catódico e anódico estão abaixo de 5%, infere-se que o filme encontra-se estável.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção são apresentados os resultados obtidos para o trabalho, abordando discussões e análises/avaliação dos métodos empregados para a obtenção dos resultados do sistema em estudo. Com base nos dados resultantes experimentalmente, infere que em relação à comparação do perfil eletroquímico de síntese do filme de PANI submetidos a diferentes valores de pH, o voltamograma demonstrativo do gráfico na Figura 3 analisa a altura dos picos de corrente anódica (*inset*), pelo qual observa-se que o filme de PANI polimerizado em pH = 4 (ácido) apresentou uma melhor condutividade comparado aos meios básicos e neutros (pH 9 e pH 7, respectivamente). Diante do resultado a apresentado, foi escolhido e estudado uma solução ácida capaz de tornar o perfil apropriado para a síntese do polímero. Desse modo, o ácido selecionado para a eletropolimerização da PANI e realização dos experimentos subsequentes foi o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

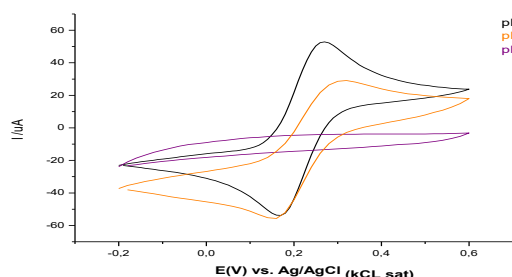


Figura 3. Voltamograma demonstrativo das medidas em pH 4, pH 7 e pH 9. Medidas realizadas em K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0.005 mol L<sup>-1</sup>) solução preparada em KCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>) com velocidade de varredura de 0.05 V s<sup>-1</sup>.

Quanto ao estudo da formação do filme em meio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para diferentes concentrações do monômero de Anilina, no voltamograma demonstrativo da Figura 4, pode-se inferir que na concentração de 97,7 mM obtivemos um valor ótimo com característica capacitiva, tendo em vista que a área da curva em rosa apresenta maior valor comparada as demais curvas. Os valores de picos anódicos e catódicos se mostram maiores também quando comparados as demais curvas (78 mM; 97,74 mM; 119,46 mM), que mostra uma maior condutividade na concentração em questão.

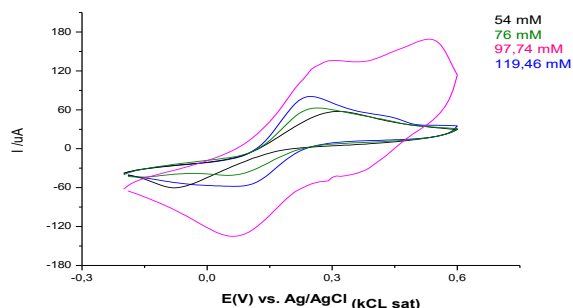


Figura 4. Voltamograma demonstrativo do uso da PANI com 54mM - 76mM - 97,7mM - 119,4mM em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Medidas realizadas em K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0.005 mol L<sup>-1</sup>) solução preparada em KCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>) com velocidade de varredura de 0.05 V s<sup>-1</sup>.

Em relação ao estudo da estabilidade do filme PANI, demonstrado no voltamograma da Figura 5, onde submeteu-se o ECV modificado com PANI a 30 ciclos voltamétricos consecutivos

para verificar sua estabilidade em sonda de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3+/4-</sup>, observa-se a repetição de um padrão entre as sucessivas medidas voltamétricas do ECV modificado com PANI, não existindo deslocamento considerável dos picos de oxidação e redução. O CV% calculado para o pico anódico (I<sub>pa</sub>) e pico catódico (I<sub>pc</sub>) foi de 4% e 2%, respectivamente, comprovando-se estabilidade do filme produzido, uma vez que os valores ideal/ótimo como resultado final é abaixo de 5% por pico.

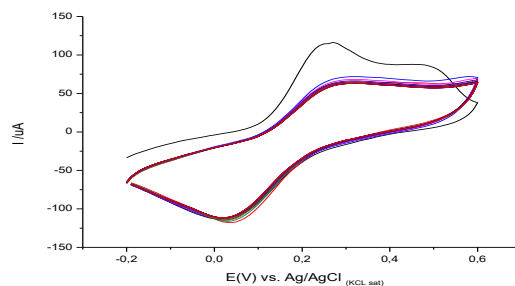


Figura 5. Teste de Estabilidade PANI. Medidas realizadas em K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0.005 mol L<sup>-1</sup>) solução preparada em KCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>) com velocidade de varredura de 0.05 V s<sup>-1</sup> em 30 ciclos. O coeficiente de variação para o I<sub>pa</sub> foi de 4% e para o I<sub>pc</sub> foi de 2%.

Já na Figura 6, referente ao estudo de velocidade de varredura no intervalo de 10 mV.s<sup>-1</sup> a 150mV.s<sup>-1</sup> a cada 10 mV.s<sup>-1</sup>, observa-se que foram obtidos resultados dos coeficientes de correlação linear de 0,9857 e 0,993 para os picos de corrente anódica e catódica, respectivamente (*inset*). Tal resultado é satisfatório e desejável para um sistema reversível, pelo qual a intensidade do pico anódico aumenta linearmente com o aumento da velocidade conforme com a equação de Randles Sevcik (equação 1).

Equação 1.

$$i_p = 0.4463 n F A C \left( \frac{n F v D}{RT} \right)^{1/2}$$

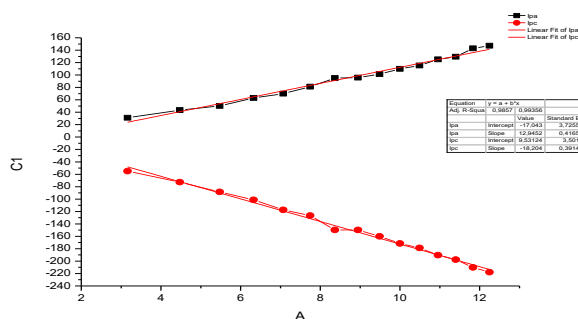


Figura 6. Velocidade de varredura de 10 mV a 150 mV em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Medidas realizadas em K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] (0.005 mol L<sup>-1</sup>) solução preparada em KCl (0.1 mol L<sup>-1</sup>).

## CONCLUSÕES

Conclui-se com o estudo que a formação do filme polimérico de polianilina (PANI) em solução de Ácido Sulfúrico (pH4) possibilita o desenvolvimento de uma plataforma sensora altamente condutiva, vislumbrando a sua utilização em futuros dispositivos capazes de quantificar marcadores cardíacos para um diagnóstico rápido, prático e acessível aos profissionais e usuários. Além disso, também como perspectiva futura, a adição de nanomateriais como coadjuvantes na condução elétrica proporcionada pelo filme, irá impor novas e melhores formas de condutância e reconhecimento nos dispositivos.

## REFERÊNCIAS

FARZIN, L. et al. Recent advances in designing nanomaterial based biointerfaces for electrochemical biosensing cardiovascular

biomarkers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018.

GHOSH, S. et al. Nanostructured Conducting Polymers for Energy Applications: Towards a Sustainable Platform. *Nanoscale*, 2016.

LIU, P. et al. Two-dimensional polyaniline nanostructure to the development of microfluidic integrated flexible biosensors for biomarker detection. *Biomed Microdevices*. v. 18, n. 113, 2016.

MASSA, K.H.C. et al. Análise da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos, 2000-2010. *Ciência e saúde coletiva*. v.24, n. 1, jan., 2019.

PICOLLI, J.P.; CILLI, E.M. Validação de monocamadas peptídicas auto-organizadas com marcador redox no desenvolvimento de imunossensores capacitivos [tese]. Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista: 2019

SOARES, E.C.L.; DUTRA, R.A.F. Desenvolvimento de testes diagnósticos para Hepatite B baseados em imunossensores [tese]. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências: Biotecnologia, 2016.

World Heart Federation. The Brazil Declaration. 2016. [Cited in 2019 Abr 12]. Available from: <http://www.world-heart-federation.org/wcc-2016/theBrazil-declaration/United Nations>.