

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS**

**Dissertação de Mestrado**

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTRATOS PLÁSTICOS**  
**PARA O TESTE ELINOR**

**POLIANA CRISTIANA DA SILVA**

**Recife**  
**2014**

**POLIANA CRISTIANA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTRATOS PLÁSTICOS  
PARA O TESTE ELINOR**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciência de  
Materiais para obtenção do Grau de  
Mestre em Ciência de Materiais na  
Universidade Federal de Pernambuco.

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador - UFPE)  
Prof. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira (UNIVASF)  
Prof. Dr. Severino Alves Júnior (UFPE)

**Recife**

**2014**

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Joana D'Arc L. Salvador, CRB 4-572

Silva, Poliana Cristiana da.

Caracterização de substratos plásticos para o teste  
ELINOR / Poliana Cristiana da Silva. – Recife: O Autor,  
2014.

91 f.: fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Pernambuco. CCEN. Ciências de Materiais, 2014.

Inclui referências.

1. Polímeros condutores. 2. Diagnóstico.  
3. Leishmaniose visceral. 4. Química de superfície.  
I. Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

620.192

(22. ed.)

FQ 2014-35

POLIANA CRISTIANA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTRATOS PLÁSTICOS PARA O TESTE  
ELINOR**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós - Graduação em  
Ciência de Materiais da  
Universidade Federal de  
Pernambuco, como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestra  
em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 23/05/2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profº. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Profº. Dr. Helinando Pequeno de Oliveira (Examinador Externo)  
Universidade Federal do Vale do São Francisco

---

Profº. Dr. Severino Alves Junior (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Aos órgãos financiadores CAPES e CNPq, por suportarem o presente trabalho.

Ao Prof. Celso Pinto de Melo por orientar e compartilhar seus conhecimentos comigo sempre com muita serenidade e paciência.

Ao meu orientador externo Prof. César Augusto Souza de Andrade, por seus ensinamentos, ajuda e sugestões a respeito do meu trabalho. Ao senhor, minha profunda admiração pela sua competência e dedicação ao trabalho científico.

À Professora Adriana Fontes do Laboratório de Biofísica-Química/CCB/UFPE que disponibilizou o Microscópio de Fluorescência, e a Paulo Euzébio Cabral Filho pela paciência e disponibilidade em ajudar na captura de imagens fluorescentes.

Ao Laboratório de Análises de Combustíveis (LAC/UFPE) pela disponibilidade na utilização do espectrômetro de Infravermelho, e a Ana Carolina Maia por sua paciência e ajuda na obtenção dos espectros de ATR.

Ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE – Departamento de Genética/UFPE, coordenado pelo Prof. Valdir de Queiroz Balbino, por gentilmente ceder amostras de DNA utilizadas neste trabalho. Agradeço, também, as ajudas de Lidiane Gomes, Sérgio Paiva e Manuela Souza pela ajuda.

Aos meus co-orientadores extraoficiais, e amigos, Renata Santos e Roberto Cao Milán por ter compartilhado seus conhecimentos com muita paciência e boa vontade.

Um agradecimento especial ao Jarib Alcaraz, que conseguiu me ajudar nos momentos mais difíceis do meu trabalho de pesquisa. Agradeço por sua amizade, paciência, atenção, serenidade e excelente didática.

Ao Isaac Morales, o mexicano mais brasileiro que tive o prazer de conhecer, que contribuiu diretamente para realização deste trabalho. Além disso, agradeço por nossas muitas discussões construtivas e por sua amizade.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Jéssica Miranda, Etelino de Melo, Juan Medina, Sandro Vagner, Henrique Sugahara, Manuela Souza, Rodrigo Silva e Aristides Valdes (Camilo) pela ajuda e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Física da UFPE Sérgio, Tarcyla Andrade, Claudésio e Maria Virgínia pela disponibilidade e gentileza.

Ao Prof. Ricardo Emmanuel pelas nossas conversas pelos corredores do DF que foram bastante motivadoras e, agradeço, também, por sua amizade.

Aos meus amigos Jurandi Neves, Ângela Mesquita, Cintya Barbosa (Dodja), Cláudio Abreu e Frederico Revoredo (Tonho) pela profunda amizade.

Às minhas amigas Cláudia Rocha, Verônica Marinho e Quésia Ramos pela amizade e apoio sempre.

Um agradecimento especial aos meus amigos, e companheiros de batalha, Thaíses Lima e Felipe Elan pelo apoio, amizade e por todos nossos momentos passados dentro e fora da universidade. Amo vocês.

À minha família, pois sem ela eu não teria chegado até aqui. Em especial à minha Avó/Mãe Augusta Silva, à minha irmã Ana Paula Nascimento e ao meu primo Bruno Luiz. Amo muito vocês.

Agradeço a Deus por ter colocado uma pessoa tão linda e especial na minha vida, meu esposo Fábio Novaes, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, com sua sabedoria, amor, dedicação, paciência e serenidade. Minha vida, amo você.

E, por último, mas não menos importante, agradeço às minhas filhinhas de quatro patas Zoe, Zae, Pretinha, Branquinha e Lila que amo muito e que me deram muito amor incondicionalmente.

## RESUMO

Neste trabalho, foram avaliados três substratos poliméricos (polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS) e policarbonato (PC)) com o intuito de estabelecer qual o plástico mais adequado (em termos de adesão, geração de grupos carboxílicos, fluorescência e topografia) para ser usado no teste ELINOR. Esse é um teste diagnóstico de doenças, onde um nanocompósito catiônico de polianilina e nanopartículas de ouro (PANI/AuNPs) é utilizado como marcador fluorescente por interagir com as cadeias aniônicas do DNA, que foi por sua vez capturado por curtas sequências características de nucleotídeos (*primers*) do agente infeccioso. A ideia chave é melhorar a adesão através de modificação de superfície e ligar covalentemente os grupos carboxílicos (COOH) criados aos *primers*. Para isso, os polímeros foram tratados por UV/O<sub>3</sub> e plasma de argônio, adotando diversos tempos de exposição. Em seguida, técnicas de ângulo de contato, espectroscopia Raman, espectroscopia de fluorescência, UV/Vis e AFM foram empregadas para a caracterização. Nossos resultados mostraram que o PMMA tratado por UV/O<sub>3</sub> apresentou as melhores condições para ser aplicado no teste, por exibir menor autofluorescência e facilidade de geração COOH. Dessa maneira, foram realizados, em PMMA tratados com UV/O<sub>3</sub>, o teste ELINOR para *Leishmania infantum* (agente infeccioso causador da leishmaniose visceral) em amostras de DNA de cães. A sensibilidade e a especificidade obtidas foram 87,15% e 39%, respectivamente. A sensibilidade do teste está na média dos valores obtidos na literatura, no entanto, apresentou uma especificidade muito baixa. Duas possíveis razões podem explicar a causa da baixa especificidade. Primeiramente, a fixação de nanocompósitos nas nanoestruturas formadas pelo tratamento de UV/O<sub>3</sub> pode gerar testes falsos positivos. Outra possibilidade para explicar testes pouco específicos são ligações entre nanocompósitos e COOH que se mantêm após a lavagem.

Palavras-chave: Teste ELINOR. Diagnóstico de doenças. Nanopartículas metálicas. Fluorescência. Polímeros condutores.

## ABSTRACT

In this work, three polymeric substrates (polymethylmethacrylate (PMMA), polystyrene (PS) and polycarbonate (PC)) were studied in order to establish which of these plastics would be the most suitable (in terms of adhesion, generation of carboxylic groups, fluorescence and topography) substrate to be used in ELINOR tests. The ELINOR test is a method of disease diagnosis which uses a nanocomposite formed by cationic gold nanoparticles and polyaniline (PANI/AuNPs) as a fluorescent marker that can interact with infected anionic DNA chains. These chains are captured by short characteristic sequences of nucleotides (primers) from the infectious agent to be investigated. The key idea of this work is to improve biomolecular adhesion through polymeric surface modification treatments and, in turn, link carboxylic groups covalently to amines belonging to the primers. To this end, the polymers were treated by UV/O<sub>3</sub> and air plasma, during different exposure times. We have used contact angle techniques, Raman spectroscopy, fluorescence spectroscopy, UV/Vis spectrophotometry and AFM to characterize the changes imposed on substrates. Our results showed that the PMMA treated by UV/O<sub>3</sub> presented the best conditions for the test because it has shown less autofluorescence and allows for a simple generation of carboxylic groups. We performed the ELINOR test to detect DNA of *Leishmania infantum* (the infectious agent causing visceral leishmaniasis) in dog DNA samples deposited in PMMA treated by UV/O<sub>3</sub>. The test sensitivity and specificity obtained were 87.15% and 39%, respectively. While the test sensitivity agrees with the mean value available in literature, the test specificity is very low with respect to standard values. Two possible reasons can explain this low specificity. First, fixation of a surplus amount of the nanocomposite on nanostructures formed after UV/O<sub>3</sub> treatment can generate false positive results. Another possible explanation is the formation of extra bonds between the nanocomposite and the carboxylic groups that remain even after the rising process.

Keywords: ELINOR Test. Disease diagnosis. Metallic nanoparticles. Fluorescence. Conducting polymers.



# LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lutzomyia longipapilis</i> fêmea, uma das espécies de vetores causadores das Leishmanioses. Imagem extraída de WILSON (2005). .....	18
Figura 2. Estrutura da PANI e seus possíveis estados de oxidação. Extraída e adaptada de OTROKHOV et al. (2013). .....	22
Figura 3. Modelo de Watson e Crick para o DNA: (a) dupla hélice e (b) orientação antiparalela das fitas. Extraído e adaptado de PEARSON-EDUCATION (2012). .....	25
Figura 4. Exemplo de curva de fusão do DNA. Extraída e adaptada de ATDBIO (2014). .....	26
Figura 5. Reação de conjugação entre grupos carboxílicos e grupos aminas: (1) adição direta do grupo amina; (2) regeneração dos grupos carboxílicos pela adição de água (hidrólise) e (3) uso de NHS para garantir a efetividade nas ligações amidas intermediadas por EDC e formação de éster estável, quando seco. Extraída e adaptada de THERMO-SCIENTIFIC (2014). .....	28
Figura 6. Esquema do teste ELINOR. ....	30
Figura 7. Estruturas químicas dos polímeros: (a) PMMA; (b) PC; (c) PS. ....	34
Figura 8. Processo de formação das moléculas de ozônio. Extraída de BACKER (2014). ....	36
Figura 9. Processos de modificação de superfície por plasma. ....	38
Figura 10. Diagrama esquemático das tensões superficiais atuantes em uma gota séssil de um líquido sobre um substrato sólido. ....	39
Figura 11. Ilustração do ângulo de contato formado entre uma gota séssil de um líquido e um substrato sólido: (a) $\Theta < 90^\circ$ (b) $\Theta = 90^\circ$ (c) $\Theta > 90^\circ$ . ....	40
Figura 12. Esquema das análises de AFM. Extraída e adaptada de WIKIPEDIA (2008). ....	41
Figura 13. Modos de operação de análise de AFM: modo de (a) contato, (b) não contato e (c) contato intermediário. Extraída de WIKIPEDIA (2013). ....	42
Figura 14. Esquema das mudanças de níveis nos espalhamentos Rayleigh e Raman, onde $\nu$ , $E_{em}$ e $E_{abs}$ são as frequências de cada estado, a energia de emissão e a energia de absorção, respectivamente. ....	43

<i>Figura 15. Diagrama esquemático de um espectrômetro Raman. Extraída e adaptada de NOTINGHER (2007).</i>	44
<i>Figura 16. Representação de um espectrograma dos espalhamentos Raman Stokes, Rayleigh e Raman Anti-Stokes de uma determinada amostra. Extraída e adaptada de DIPPEL (2011).</i>	44
<i>Figura 17. Diagrama de Jablonski ou diagrama de transições eletrônicas, onde estão representados alguns tipos de transição entre os estados singletos (<math>S_0</math>, <math>S_1</math>, <math>S_2</math>,...) e tripleto (<math>T_1</math>), como absorção (ABS), conversão interna (CI), supressão colisional (SC), relaxação vibracional (RV), cruzamento entre sistemas (CS), fluorescência (FL) e fosforescência (FO). Extraída e adaptada de HOF et al. (2005).</i>	46
<i>Figura 18. Esquema de um espectrofotômetro. Extraída e adaptada de OUDHIA (2012).</i>	47
<i>Figura 19. Síntese do sistema coloidal de NPs de PANI/Au. Extraída e modificada de NASCIMENTO et al. (2011).</i>	54
<i>Figura 20. Esquema do tratamento da superfície e ligação covalente do primer em substrato polimérico.</i>	56
<i>Figura 21. Espectros Raman dos polímeros comerciais.</i>	59
<i>Figura 22. Gráficos da variação do ângulo de contato dos polímeros em relação ao tempo de exposição ao tratamento de (a) UV/Ozônio e (b) plasma de Ar.</i>	60
<i>Figura 23. Evolução da criação de grupos carboxílicos em relação ao tempo de exposição ao tratamento de (a) UV/Ozônio e (b) plasma de Ar nos polímeros.</i>	62
<i>Figura 24. Imagens topográficas de AFM das superfícies de (a) PMMA pristino; (b) PMMA tratado com plasma por 3min; (c) PMMA tratado com 1 h por UV/O<sub>3</sub>; (d) PC pristino; (e) PC tratado com plasma por 3min; (f) PC tratado com 1 h por UV/O<sub>3</sub>; (g) PS pristino; (h) PS tratado com plasma por 3min; (i) PS tratado com 1 h por UV/O<sub>3</sub>. Todas as varreduras foram variadas de 5 <math>\mu</math>m x 5 <math>\mu</math>m com resolução de 512 x 512 pixels.</i>	64
<i>Figura 25. Evolução de fluorescência dos polímeros quando excitados em 480nm.</i>	66

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1. Representação dos possíveis resultados (tabela de contingência) em um teste diagnóstico. ....</i>	<i>32</i>
<i>Tabela 2. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para amostras de L. infantum.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 3. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para duplicatas das amostras de L. infantum.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 4. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para triplicatas das amostras de L. infantum.....</i>	<i>68</i>
<i>Tabela 5. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para amostras de L. infantum.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 6. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para duplicatas das amostras de L. infantum.....</i>	<i>69</i>
<i>Tabela 7. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para triplicatas das amostras de L. infantum.....</i>	<i>70</i>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – Absorção

AFM – do inglês *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)

ANI – Anilina

AuNPs – Nanopartículas de ouro

CCD – do inglês *Charge Coupled Device* (dispositivo de carga acoplada)

CS – Cruzamento entre Sistemas

DNA – do inglês *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

dsDNA – do inglês *double stranded DNA* (DNA de dupla fita)

ELINOR – do inglês *Enhanced Luminescence of Inorganic-Organic Origin*  
(Luminescência Exacerbada de origem Inorgânica/Orgânica)

ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (Ensaio de Imunoabsorção  
Ligado a Enzima)

FTIR-ATR – do inglês *Fourier Transform Infrared spectroscopy - Attenuated Total  
Reflectance* (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – reflexão  
atenuada total)

HIV – do inglês *Human Immunodeficiency Virus* (Virus da Imunodeficiência Humana)

HOMO – do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital* (orbital molecular ocupado  
mais alto)

ICQ – Imunocitoquímica

IFD – Imunofluorescência Direta

LC – Leishmaniose Cutânea

LED – do inglês *Light Emitting Diode* (diodo emissor de luz)

LV – Leishmaniose Visceral

LVC – Leishmaniose Visceral Canina

LUMO – do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (orbital molecular mais baixo)

PANI – Polianilina

PANI/AuNPs – Compósito de polianilina e nanopartículas de ouro

PC – Policarbonato

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PMMA – Polimetilmetacrilato

PS – Poliestireno

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RV – Relaxação Vibracional

SC – Supressão Colisional

ssDNA – do inglês *single stranded DNA* (DNA de fita simples)

UV/O<sub>3</sub> – Ultravioleta/ozônio

UV/Vis – Ultravioleta/Visível

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Doenças infecciosas .....</b>	<b>17</b>
1.1.1 Leishmaniose.....	17
<b>1.2 Polímeros condutores, Nanopartículas metálicas e Compósitos híbridos .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 Polímeros condutores .....	21
1.2.2 Nanopartículas metálicas.....	23
1.2.3 Compósitos híbridos.....	24
<b>1.3 DNA, Imobilização de DNA e Bioconjugação .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) .....</b>	<b>28</b>
<b>1.5 Teste ELINOR.....</b>	<b>30</b>
<b>1.6 Avaliação de testes diagnósticos .....</b>	<b>31</b>
1.6.1 Tabela de Contingência .....	32
<b>1.7 Substratos poliméricos .....</b>	<b>33</b>
1.7.1 Polimetilmetacrilato, Policarbonato e Poliestireno .....	34
<b>1.8 Tratamentos para Modificação de Superfícies Poliméricas.....</b>	<b>35</b>
1.8.1 Tratamento por Ultravioleta/Ozônio .....	35
1.8.2 Tratamento por Plasma.....	36
<b>1.9 Técnicas de Caracterização.....</b>	<b>38</b>
1.9.1 Ângulo de Contato .....	39
1.9.3 Espectroscopia Raman .....	42
1.9.4 Espectroscopia de Fluorescência.....	45
1.9.5 Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV/Vis) .....	47
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>49</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>49</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>49</b>
<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>50</b>

<b>3.1 Preparação de placas poliméricas para caracterização e teste ELINOR .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2 Espectroscopia Raman .....</b>	<b>50</b>
<b>3.3 Modificação de Superfície para caracterização .....</b>	<b>51</b>
3.3.1 Tratamento por UV/O <sub>3</sub> .....	51
3.3.2 Tratamento por Plasma de Argônio .....	51
<b>3.4 Ângulo de contato .....</b>	<b>51</b>
<b>3.5 Quantificação de grupos COO<sup>-</sup> por adsorção de Toluidina.....</b>	<b>52</b>
<b>3.6 Microscopia de Força Atômica .....</b>	<b>52</b>
<b>3.7 Espectroscopia de Fluorescência .....</b>	<b>53</b>
<b>3.8 Síntese de Nanopartículas de Polianilina/Ouro (PANI/Au) .....</b>	<b>53</b>
<b>3.9 Preparação do substrato e imobilização do primer .....</b>	<b>54</b>
3.9.1 Preparação dos substratos.....	54
3.9.2 Imobilização covalente do primer .....	55
<b>3.10 Amplificação de <i>Leishmania canina</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>3.11 Teste ELINOR.....</b>	<b>57</b>
<b>3.12 Microscopia de fluorescência .....</b>	<b>58</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1 .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Espectroscopia Raman .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Modificação de superfície de PMMA, PS e PC por tratamento de UV/O<sub>3</sub> e plasma de Ar.....</b>	<b>60</b>
<b>4.3 Quantificação de grupos COOH por absorção de Toluidina .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Análise da topografia de superfície dos polímeros antes e depois dos tratamentos utilizando AFM.....</b>	<b>63</b>
<b>4.5 Cinética da autofluorescência dos polímeros analisada por espectroscopia de fluorescência .....</b>	<b>64</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.6 Compósito híbrido de Polianilina/ nanopartículas de ouro (PANI/AuNPs)..</b>	<b>67</b>
<b>4.7 Teste ELINOR.....</b>	<b>67</b>
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>72</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
--------------------------	-----------



## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas graves transmitidas por insetos vetores, atingindo cerca de 350 milhões de pessoas no mundo todo, sendo o Brasil o país onde ocorre o maior número de casos nas Américas. (DESJEUX, 2004) Essas doenças são causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, cujo principal reservatório nas áreas urbanas é o cão doméstico, que mesmo infectado pode exibir ou não sintomas ou apresentar sinais clínicos. Desta forma, a detecção precoce, através de exames sorológicos e parasitológicos, da presença da doença nesses cães é um dos fatores importantes para o controle de sua disseminação. Para isso, há a necessidade de investigar métodos mais precisos e menos invasivos, como testes moleculares. (QUEIROZ *et al.*, 2010)

Um desses testes, o teste ELINOR (*Enhanced Luminescence of Inorganic-Organic Origin* – Luminescência Exacerbada de origem Inorgânica/Orgânica), vem sendo desenvolvido no Laboratório de Polímeros Não Convencionais (PNC/UFPE), onde um nanocompósito de um polímero condutor e nanopartículas de ouro (PANI/AuNPs) é utilizado como um marcador fluorescente que pode servir para identificar DNA infectado capturado por sequências de oligonucleotídeos complementares específicos do parasito ligados em um substrato sólido. Atualmente, os oligonucleotídeos são imobilizados a um substrato de vidro por ligações fracas, do tipo não covalente, o que pode resultar em seu arraste quando submetido a condições severas, como lavagem. Uma possível solução seria a mudança de substrato a fim de utilizar métodos de imobilização de oligonucleotídeos por ligações mais fortes, do tipo covalente, através da ligação entre grupos carboxílicos e aminas, resultando na ligação amida.

Materiais poliméricos, como polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS) e policarbonato (PC), são bons candidatos para esse propósito. Além disso, eles apresentam boas características como baixo custo de fabricação, biocompatibilidade e boa transparência óptica. (NAJMABADI *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2008; MINEO *et al.*, 2013) No entanto, as superfícies desses polímeros são inertes e necessitam de alguma modificação para que seja possível o reconhecimento de moléculas biológicas.

(GODDARD e HOTCHKISS, 2007; SUBEDI *et al.*, 2008) Tratamentos por ultravioleta/ozônio (UV/O<sub>3</sub>) e plasma são processos que podem ajudar a modificar a estrutura química de superfície, promovendo melhor adesão de biomoléculas pela criação de grupos funcionais polares como hidroxilas e carboxílicos. (ROTH-FÖLSCH e LÖDEL, 2011; LE *et al.*, 2012) Além disso, esses tratamentos contribuem com para o aumento na área superficial, melhorando a capacidade de reconhecimento de biomoléculas.

O presente trabalho tem como proposta estudar os três substratos poliméricos modificando-os pelos tratamentos de superfícies, através de diversas técnicas de caracterização, com a intenção de verificar qual o polímero mais adequado para ser utilizado no teste ELINOR. Em seguida, o teste ELINOR será implementado para detectar a leishmaniose em amostras de DNA de cães, e os resultados correspondentes analisados pela realização de uma estatística sobre a sensibilidade e especificidade obtidas, de modo a comparar com a estatística feita para o teste ELINOR em vidro.

Porém, primeiramente, será apresentada uma revisão de literatura sobre o conteúdo necessário para o entendimento deste trabalho, bem como as técnicas de caracterização utilizadas. Serão descritas as metodologias, seguidas pelos resultados e discussão, finalizando com conclusões, perspectivas e referências bibliográficas.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Doenças infecciosas

Doenças infecciosas são aquelas causadas por micro-organismos patogênicos como, por exemplo, bactérias, vírus, protozoários e fungos, que invadem células hospedeiras e se desenvolvem. (GUIDO *et al.*, 2010) No Brasil e no mundo, essas doenças são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade da população. Os fatores que influenciam na dinâmica da transmissão de doenças infecciosas podem ser ambientais (vegetação, clima, hidrologia), sóciodemográficos (migrações e densidade populacional), biológicos (ciclo vital de insetos vetores e agentes infecciosos) e médico-sociais (estado imunológico da população, efetividade de sistemas de saúde, programas de controle de doenças). (BARCELLOS *et al.*, 2009)

A transmissão de infecções acontece quando um micro-organismo deixa seu reservatório (hospedeiro inicial) e infecta outro suscetível à doença. Essa transmissão pode se dar de forma direta, como contato direto pela pele, saliva ou espirros, ou de forma indireta, através de ingestão de alimentos contaminados, pelo ar, ou por vetores (por exemplo, carrapatos, mosquitos e pulgas). (CDC, 2006)

### 1.1.1 Leishmaniose

Um exemplo de doença infecciosa, presente em 88 países na Ásia, África, Europa, África, Oriente Médio e nas Américas, é a Leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, onde existem cerca de 350 milhões de pessoas em risco, onde 500.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) surgem por ano, com mais de 50.000 mortes anuais e 1-1,5 milhões de novos casos de Leishmaniose Cutânea (LC). (DESJEUX, 2004; CAVALCANTI, 2008) Nas Américas, casos da leishmaniose foram estudados em 12 países, a maioria ocorrendo no Brasil, principalmente na região Nordeste. O modo de transmissão ocorre pela picada da fêmea infectada do inseto vetor

(do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*), que enquanto se alimenta leva o parasita a uma vítima sadia. (MS, 2006)

A depender da região de ocorrência no Brasil, esses insetos são conhecidos como mosquito palha (Figura 1), asa dura, asa branca, birigui, anjinho, entre outros. Dependendo da espécie, a *Leishmania* pode se apresentar na forma cutânea/Cutânea-Mucosa causando a Leishmaniose Cutânea (LC) e na forma visceral, ocasionando a Leishmaniose Visceral (LV). (FIOCRUZ, 2013)



**Figura 1. *Lutzomyia longipalpis* fêmea, uma das espécies de vetores causadores das Leishmanioses. Imagem extraída de WILSON (2005).**

As manifestações da LC se apresentam em forma de lesões cutâneas ulceradas crônicas em partes expostas do corpo como face, braços e pernas, que cicatrizam após alguns meses, e podem existir acompanhadas ou não de dor. Em alguns casos, pode ocorrer que, após a cura, indivíduos adquiram imunidade vitalícia contra infecções pelo mesmo parasita. (MURRAY *et al.*, 2005)

A LV (também conhecida como Calazar) pode levar à morte do indivíduo se não for tratada. Nas Américas e na região Mediterrânea, LV é uma zoonose (doença infecciosa transmitida entre espécies de outros animais para humanos) causada pelo parasita *Leishmania infantum* (ou *L. chagasi*), transmitido pelos flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis*. (DANTAS TORRES, 2006) Este tipo de doença pode ocorrer em dois estágios: infecção primária e infecção disseminada. No estágio primário, a *Leishmania* infecta um indivíduo saudável e se multiplica localmente, formando uma protuberância definida. Em alguns casos, o corpo reage de maneira efetiva para destruir o parasita e impedir o progresso da doença. (WHO, 2001)

Caso não haja cura espontânea, a infecção é disseminada, o parasita se espalha por todo o corpo (o que normalmente ocorre em indivíduos com mecanismos de defesas deficientes), iniciando o estágio visceral da infecção. Por exemplo, em algumas áreas, 70% dos casos de LV se dão em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*). (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012) No estágio inicial, o paciente pode apresentar febre e excesso de suor. Com o progresso da doença, algumas vísceras como o baço, medula óssea e fígado são dilatados, o que causa perda de peso e acentuada anemia. Com as defesas do organismo ainda mais baixas, o corpo não é capaz de se defender de outras infecções causadas por bactérias, por exemplo. Essas novas infecções podem ocorrer no trato respiratório e intestinal, como pneumonia e disenteria amebiana, que passam a ser as maiores causas de morte. (HANDMAN, 2001; WHO, 2001; REITHINGER *et al.*, 2007)

Os cães domésticos (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios da *Leishmania infantum chagasi* (agente infeccioso causador da LV no Brasil) em áreas urbanas, por sua proximidade ao homem aumenta o risco de infecção a seres humanos e outros cães. A pele do cão, o órgão onde acontece o primeiro contato com o parasita, poderá manifestar sinais clínicos. Lesões dermatológicas como dermatites são sinais clínicos mais comuns da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). Além disso, é o local onde é encontrado o maior número do parasita em sua forma inicial. (QUEIROZ *et al.*, 2010) Em alguns casos, os cães podem estar infectados, porém a resposta ao parasita pode ser assintomática. Logo, os passos para controlar a leishmaniose visceral são a detecção e tratamento em humanos, controle dos vetores, detecção precoce da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e posterior eutanásia do animal infectado, além do desenvolvimento de métodos para diagnósticos eficazes. (MORENO e ALVAR, 2002; BANETH *et al.*, 2008; RAMOS-JESUS *et al.*, 2011; FARIA e ANDRADE, 2012)

No Brasil, os métodos de diagnósticos utilizados para detecção de LCV se baseiam em análises parasitológicas (citológicas) e sorológicas (Imunofluorescência Direta – IFD, Imunocitoquímica – ICQ, Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e Ensaio Imunoenzimático – ELISA). Os testes sorológicos apresentam, porém um alto número de falsos positivos por causa das reações cruzadas com outros tipos de patógenos. Já os testes parasitológicos, que são mais precisos, são métodos invasivos e dolorosos, que consistem na extração de material de medula óssea, baço ou gânglios

linfáticos, seguida por análises de microscopia do parasita. (WHO, 2001; LIRA *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2010; FARIA e ANDRADE, 2012)

Outros métodos menos invasivos vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico de LVC, como é o caso do diagnóstico molecular através de análises por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que não necessita isolar o parasita em uma cultura. (GOMES *et al.*, 2007 ) Esse método amplifica a sequência de oligonucleotídeos característica do parasita, o que pode ser realizado a partir de diversos tipos de amostra, como sangue, urina, tecidos epiteliais, entre outras. (FARIA e ANDRADE, 2012)

QUEIROZ *et al.* (2010) realizaram um estudo comparativo entre os métodos de diagnósticos comuns como o parasitológico e sorológico, com a PCR. Seus resultados mostraram que a PCR é, de fato, uma técnica mais eficaz detecção de LVC, apresentando um percentual de 100% de positividade, comprovando ser uma técnica muito sensível e que poderia ser a eleita na detecção para esta doença. Porém, este método ainda não foi padronizado pelo Ministério da Saúde no Brasil.

Algumas das desvantagens da PCR são os custos elevados de equipamentos e materiais e complexo processamento de amostras, o qual requer um operador capacitado. Além disso, esta técnica demanda cerca de 5 a 6 horas para obter um resultado confiável. Por conta desses fatores, a PCR ainda não é o método mais adequado para ensaios em larga escala. (OBRADOVIC, 2007)

Um dos testes diagnósticos moleculares que vêm sendo desenvolvidos pelo grupo de Polímeros Não Convencionais (PNC) na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) é um método que utiliza nanocompósitos fluorescentes como marcador de DNA para detectar tanto a leishmaniose quanto qualquer outra doença. Assim como a PCR, esse método utiliza sequências de oligonucleotídeos específicas do agente infeccioso para capturar amostras do DNA do agente patógeno. Estes dois métodos serão descritos ainda neste capítulo, porém antes é preciso entender alguns conceitos como o de DNA e nanocompósitos, que serão descritos nas próximas seções.

## 1.2 Polímeros condutores, Nanopartículas metálicas e Compósitos híbridos

### 1.2.1 Polímeros condutores

Polímeros são macromoléculas compostas por um grande número de unidades repetitivas, denominadas monômeros, ligadas entre si por ligações covalentes. A maioria dos polímeros, como látex, poliestireno, polipropileno, poliamida, proteínas e ácidos nucleicos, são materiais isolantes e possuem qualidades mecânicas como flexibilidade, elasticidade e estabilidade. (PEREIRA, F. S. G., 2009) Uma classe especial de polímeros é formada pelos polímeros condutores (ou *conjugados*), como polipirrol, polianilina, politiofeno, poliacetileno (SATRIJO, 2007), os quais podem encontrar diversas aplicações em células solares, diodos emissores de luz (LEDs, do inglês *Light Emitting Diodes*), transistores, tintas anticorrosivas (SCOTT, 2010), sistemas detectores de DNA (VELUSAMY *et al.*, 2009), sensores de gás (DE SOUZA *et al.*, 1999) e identificação de biomoléculas (SANTOS *et al.*, 2013).

Os polímeros condutores são materiais orgânicos que têm um alto potencial para condução de elétrons. O transporte de elétrons por toda a cadeia polimérica é decorrente das interações entre os orbitais moleculares e as vibrações atômicas ao longo da cadeia, o que pode levar à quebra das ligações fracas do tipo  $\pi$  presentes nas ligações duplas. (DAI, 2004) A polarização dos átomos devido à deslocalização desses elétrons, denominada pólaron, desempenha um papel importante nas propriedades estruturais, elétricas e ópticas em polímeros conjugados. (BREDAS e STREET, 1985; NALWA, 2000)

Os elétrons  $\pi$  podem ser promovidos de um orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO, do seu acrônimo em inglês) para um orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO, do seu acrônimo em inglês) pela absorção de um fóton. Como os polímeros condutores são constituídos por unidades repetidas conjugadas, os orbitais moleculares das ligações podem interagir e formar bandas contínuas de modo a diminuir o gap de energia entre elas, facilitando a transição dos elétrons, fazendo com que suas estruturas sejam análogas às dos semicondutores, onde o conjunto dos orbitais ocupados é comparável à banda de valência e, por sua vez, a energia dos orbitais desocupados é análoga à banda de condução. (SATRIJO, 2007) Além de exibir propriedades eletrônicas semicondutoras, como dopagem que pode causar a mudança na

condutividade, os polímeros conjugados também apresentam características de polímeros convencionais, como propriedades mecânicas e de processabilidade. (KIEBOOMS *et al.*, 2001)

Em meio aos polímeros condutores, um dos mais estudados é a polianilina (PANI), devido a alguns fatores como simplicidade de preparação, baixo custo, alta condutividade, excelente estabilidade ambiental, fácil dopagem/desdopagem e possível mudança nas propriedades optoeletrônicas com a mudança no pH do meio ou influência de um campo elétrico. (CIRIC-MARJANOVIC, 2010; OTROKHOV *et al.*, 2013) Por essas razões, a PANI encontra uma larga gama de aplicação em sensores (DHAWAN *et al.*, 1997; CROWLEY *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2014), eletrônica (DE SOUZA *et al.*, 2014; DOAN *et al.*, 2014), células solares (HE *et al.*, 2014) e coberturas anticorrosivas (ARAUJO *et al.*, 2001; OLAD e NOSRATI, 2013).

A PANI difere de outros polímeros condutores, como polipirróis e politiofenos, por poder assumir diferentes estados de oxidação (Figura 2), como a forma totalmente reduzida (*leucoesmeraldina*), a semioxidada (*esmeraldina*) e a totalmente oxidada (*pernigranilina*). A forma mais condutora da PANI é o sal de esmeraldina. (WALLACE *et al.*, 2009) Existem vários métodos de síntese da PANI, através da polimerização da anilina, tais como processos eletroquímicos, químicos, fotoquímico, além daqueles catalisado por enzimas. (WALLACE *et al.*, 2009; OTROKHOV *et al.*, 2013)

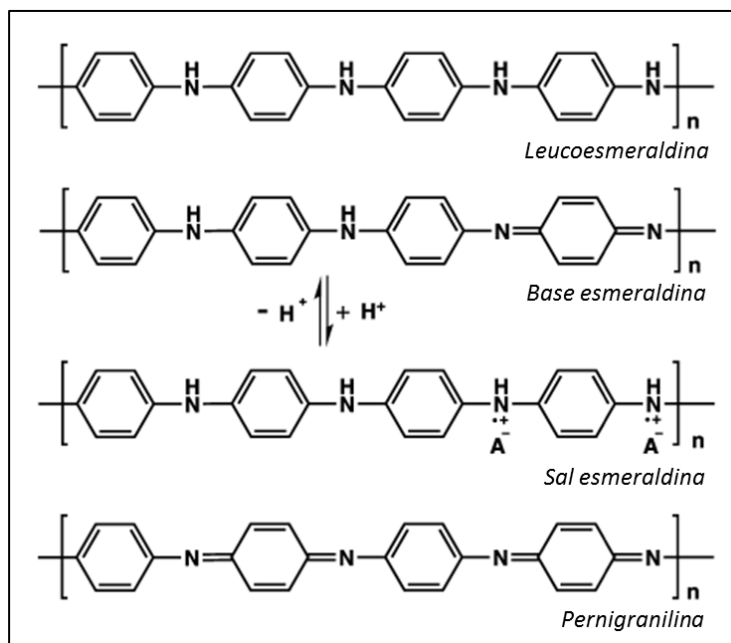


Figura 2. Estrutura da PANI e seus possíveis estados de oxidação. Extraída e adaptada de OTROKHOV *et al.* (2013).



### 1.2.2 Nanopartículas metálicas

A nanotecnologia pode ser definida como o estudo, criação, projeto, manipulação e aplicações de materiais em escala de 1 bilionésimo de metro (1 nm equivale a  $10^{-9}$  m). Muitas aplicações dessa junção de ciência e engenharia já se encontram presentes na agricultura, microeletrônica, medicina, entre outros campos. (DONALDSON e STONE, 2004)

Nos últimos anos, vem crescendo um constante interesse em utilizar ferramentas nanotecnológicas a fim de melhorar processos diagnósticos e terapêuticos, com base em novos métodos inovadores utilizando nanoestruturas como pontos quânticos (quantum dots - QDs) (CHAN e NIE, 1998), nanopartículas metálicas (STORHOFF *et al.*, 2004), poliméricas e magnéticas. (CHAN e NIE, 1998; STORHOFF *et al.*, 2004; ITO *et al.*, 2005; MORNET *et al.*, 2006; HADINOTO *et al.*, 2013) Nanopartículas são materiais com tamanhos entre 1-100 nm, que pode variar de forma e composição. As propriedades físicas e químicas de materiais na forma nanométrica podem diferir em relação àquelas do mesmo material quando em tamanho macroscópico; com o aumento na área superficial podem surgir benefícios como melhoramento na atividade catalítica e/ou aumento na condutividade elétrica e de calor. Devido a essa variedade de propriedades e aumento da sensibilidade, baixo custo de fabricação e velocidade, as nanopartículas têm encontrado uma gama crescente de aplicação na área médica. (AZZAZY e MANSOUR, 2009; SANVICENS *et al.*, 2009)

As nanopartículas metálicas vêm sendo bastante estudadas devido à presença de uma banda de ressonância de plasmons superficiais na região do visível, que tem origem representa a nanodimensionalidade das partículas. Esta banda resulta da interação entre a luz de comprimento muito maior que o diâmetro da partícula e oscilações dos elétrons livres superficiais na banda de condução, o que provoca uma forte absorção na região visível do espectro eletromagnético, e comumente em metais nobres como ouro, prata e cobre. As soluções coloidais contendo algumas dessas nanopartículas podem, também, apresentar uma coloração particular, dependendo da variação de tamanho, forma geométrica e distância entre partículas. (PEREIRA, M. K., 2009; PETRYAYEVA e KRULL, 2011; QIAN *et al.*, 2012; ANAND e JAYALEKSHMI, 2013)

### 1.2.3 Compósitos híbridos

A combinação de diferentes materiais pode fazer surgir propriedades melhores e diferentes daquelas que eram características desses materiais quando utilizados separadamente. O novo material resultado da combinação de dois ou mais componentes é denominada compósito. Em anos recentes, nanocompósitos (materiais que possuem dimensões na escala nanométrica) híbridos de materiais inorgânico/orgânicos vêm sendo fabricados e aplicados tanto no meio acadêmico quanto no meio industrial. (ADHIKARI e MAJUMDAR, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2008; WANG, XIUFANG *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2012; OTROKHOV *et al.*, 2013)

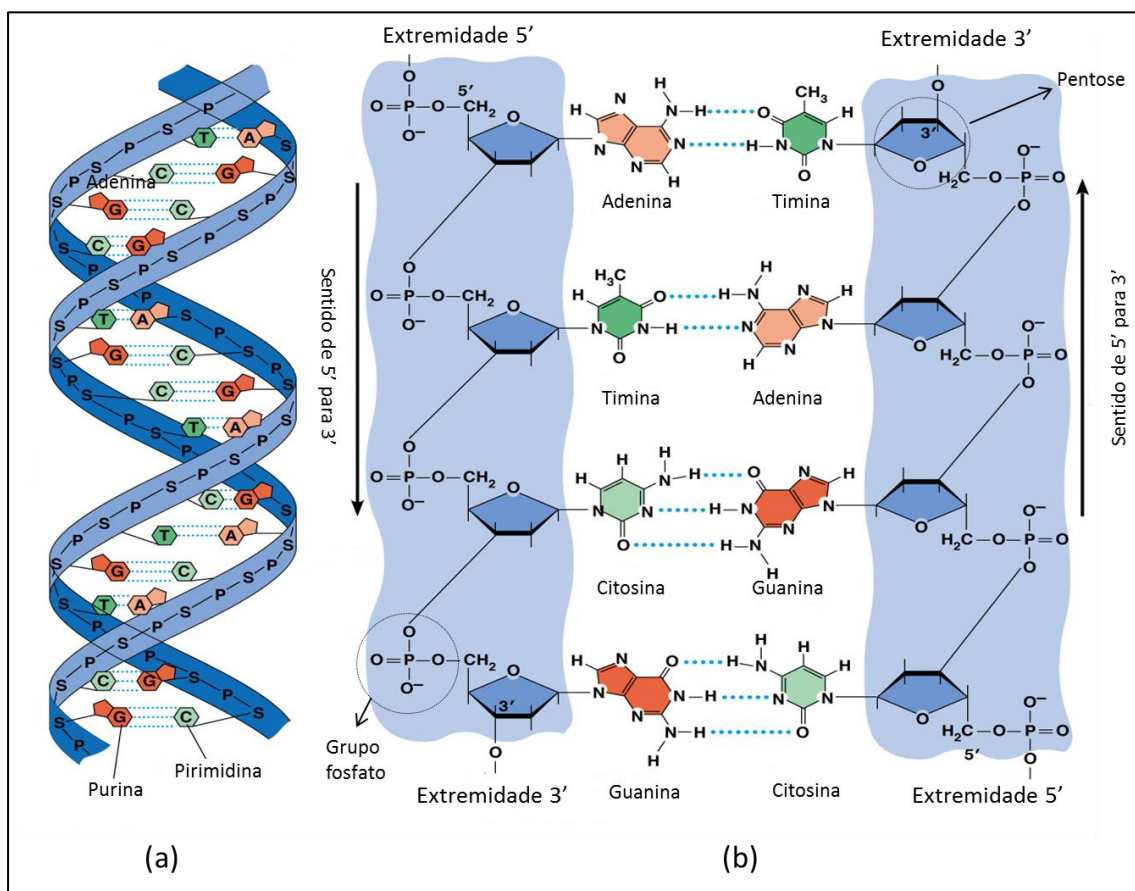
Dentre os compósitos híbridos, atenção especial tem sido dada à junção de polímeros condutores, como polianilina, e nanopartículas metálicas, em particular as nanopartículas de ouro (AuNPs), devido às suas capacidades catalíticas e de sensor, boa processabilidade, boas propriedades mecânicas e condutividade e pela natureza inerte e biocompatível das AuNPs. (BHADRA *et al.*, 2009; PETRYAYEVA e KRULL, 2011) Na síntese de nanocompósitos PANI/AuNPs, o ácido tetracloroáurico faz geralmente, o papel de oxidante da anilina, causando sua polimerização, ao mesmo tempo em que ele é reduzido, levando a formação de átomos metálicos. (ZHANG *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013)

O grupo de pesquisa do laboratório de Polímeros Não Convencionais desenvolveu compósitos de polianilina e nanopartículas de ouro (PANI/Au) e observou a presença de uma inesperada luminescência na região do visível, característica a que foi dada o nome de “Luminescência Exacerbada de Origem Inorgânica/Orgânica” (ou ELINOR, do seu acrônimo em inglês). (DE MELO *et al.*, 2008; DE MELO *et al.*, 2009) Esses nanocompósitos podem ser utilizados como marcadores biológicos, em especial para marcação de DNA. (NASCIMENTO *et al.*, 2011; SANTOS, 2013)

## 1.3 DNA, Imobilização de DNA e Bioconjugação

Em 1953, James Watson e Francis Crick propuseram que a estrutura do DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) seria a de um polímero helicoidal formado por duas fitas simples antiparalelas (Figura 3a), também chamada de hélice dupla (em inglês *double - stranded DNA* ou *dsDNA*), compostas por nucleotídeos ligados por ligações

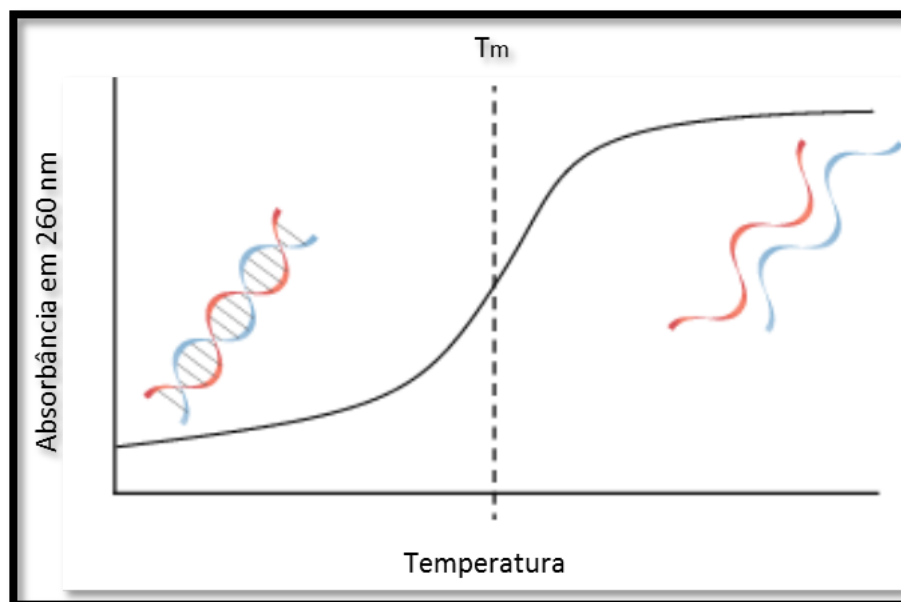
fosfodiéster e enroladas em torno de um eixo comum, com orientação à direita. (LEWIN, 2004) Cada nucleotídeo possui um grupo fosfato carregado negativamente, um açúcar de cinco carbonos (ou seja, uma pentose) denominado desoxirribose, e uma base nitrogenada purinas (Adenina – A e Guanina – G) ou pirimidinas (Timina- T e Citosina - C), como mostra a Figura 3b. (VOET, 2002) A ligação da dupla hélice ocorre porque as bases nitrogenadas se unem em pares através de pontes de hidrogênio, com a adenina emparelhando-se à timina por ligação de hidrogênio dupla e a citosina emparelhando-se à guanina por uma ligação de hidrogênio tripla. (SNEPPEN e ZOCCHI, 2005)



**Figura 3. Modelo de Watson e Crick para o DNA: (a) dupla hélice e (b) orientação antiparalela das fitas. Extraído e adaptado de PEARSON-EDUCATION (2012).**

As ligações que mantêm as bases ligadas podem ser desfeitas se a amostra de DNA sofrer um aquecimento acima de certa temperatura, em um processo denominado desnaturação (dissociação). A dissociação da hélice dupla é chamada de fusão (do inglês, *melting*). A Figura 4 mostra um diagrama que representa essa mudança de

conformação da estrutura do DNA, onde  $T_m$  é a temperatura de dissociação (melting), definida como a temperatura em que metade das estruturas da hélice dupla se encontra dissociada. (BERG *et al.*, 2010) Essa mudança de temperatura afeta diretamente algumas propriedades do DNA, como sua viscosidade e o valor de sua absorbância de luz ultravioleta em 260 nm. Outros fatores também influenciam na desnaturação, como a natureza do solvente e o pH do meio. A temperatura de fusão do DNA pode aumentar, a depender da sequência específica de bases. Quanto maior a concentração de ligações dos pares de base G/C, maior será a temperatura necessária para desfazer a dupla fita, pois são estes os pares formados por uma tripla ligação de hidrogênio. A solução de fitas simples de DNA desnaturado (ssDNA – *Single Strand DNA*) é relativamente estável a temperatura mais altas; porém, se a temperatura for abaixada ou sob condições de pH extremo (abaixo de pH 5 e acima do pH 9) (DOKTYCZ, 2001), as moléculas tendem a se reagrupar (anelar), ou seja, voltar a configuração original de fita dupla. A ligação entre duas ssDNAs é chamada de anelamento ou hibridação. (VOET, 2002) A estabilidade desta hibridação depende da perfeita correspondência das sequências de nucleotídeos em cada cadeia dupla: por exemplo, caso uma ou mais bases de uma cadeia simples não sejam compatíveis com a sequência correspondente, a hibridação pode acontecer, porém a nova estrutura terá menor estabilidade. (ZHAI *et al.*, 1997)



**Figura 4. Exemplo de curva de fusão do DNA. Extraída e adaptada de ATDBIO (2014).**

Sequências curtas de DNA, denominadas de iniciadores (primers), podem ser imobilizadas em superfícies a fim de capturar DNA complementar por meio de hibridização. Algumas técnicas como adsorção, interações do tipo Advin (ou streptavidina) – biotina e imobilização covalente podem ser empregadas. A técnica de adsorção de DNA consiste nas interações eletrostáticas entre as cargas negativas presentes nos grupos fosfatos e uma superfície recoberta por uma camada dotada de cargas positivas. Enquanto a formação do complexo streptavidina – biotina é geralmente utilizada em imobilização de anticorpos, enzimas ou DNA. Essa ligação é formada pela forte afinidade entre uma pequena molécula biotina e uma proteína denominada advin ou streptavidina. (SASSOLAS *et al.*, 2008)

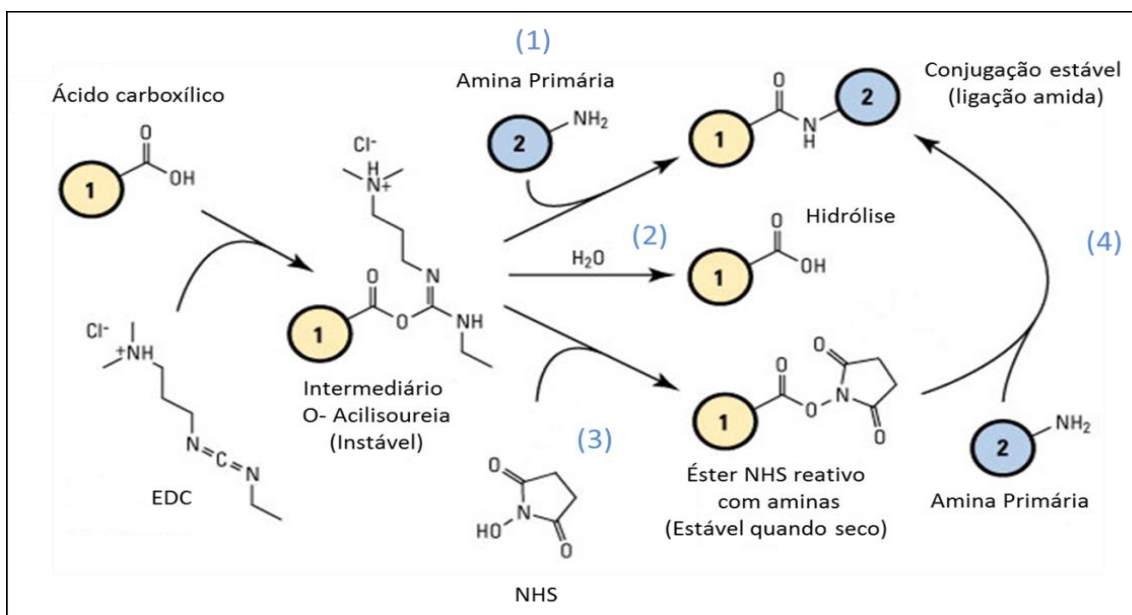
Existem muitos métodos de imobilizar DNA de forma covalente em substratos sólidos. Dois desses métodos são por adsorção química e por fixação de primers modificados em superfícies funcionalizadas. O primeiro consiste nas interações metal – tiol, que normalmente são utilizadas para imobilizar biomoléculas em superfícies de ouro. No segundo método, são utilizados reagentes que intermediam a reação de acoplamento entre grupos ativos em superfícies sólidas, como ácidos carboxílicos, hidroxilas e tióis e sondas modificadas geralmente por aminas primárias. (TAYLOR e SCHULTZ, 1996; SASSOLAS *et al.*, 2008) Em particular, a ligação entre ácidos carboxílicos e aminas, que é chamada de ligação peptídica (amida), tem grande importância neste estudo.

Para a bioconjugação desses tipos de moléculas, existem agentes que intermediam a reação, como carbodiimidas e succinimidas. As carbodiimidas, como o hidrocloreto 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), são reagentes de “comprimento zero” (o que significa que nenhuma estrutura adicional é introduzida entre a conjugação das moléculas para a formação de ligações peptídicas). Carbodiimidas reagem com grupos carboxílicos para a formação de ligações amidas, e com grupos fosfatos para formar fosforamidas. Estas reações geram um éster intermediário bastante instável, que, na presença de uma amina, pode ser atacado. Por ser um intermediário instável, a reação ocorre rapidamente. Na presença de água, as carbodiimidas hidrolisam facilmente, regenerando assim o grupo carboxílico. Como a taxa de hidrólise aumenta em pH ácido, a estabilidade da molécula de EDC é aumentada em pH igual ou acima de 6,5. Porém, alguns estudos mostram que reações envolvendo proteínas ou peptídeos podem formar ligações peptídicas com o auxílio de EDC em pH

entre 4,5 e 7,5, utilizando tampões estabilizantes de reações como MES (ácido 2-(N-morfolino) etano sulfônico) ou fosfato. (HERMANSON, 2010)

Ácidos carboxílicos também podem ser funcionalizados por succinimidas. A ativação por N-Hidroxisuccinimida (NHS) e N-Hidroxisulfosuccinimida (Suffo-NHS) é um dos métodos mais comumente utilizados. Ambos compostos são solúveis em meios aquosos e em solventes orgânicos. O uso de succinimidas aumenta a efetividade no acoplamento nas reações que utilizam EDC. O resultado da reação entre um ácido carboxílico funcionalizado com EDC e NHS é um éster reativo, quando em solução, ou um éster altamente estável, quando seco. Em geral, ésteres NHS têm meia vida de 4 - 5 horas em pH 7, 1h em pH 8 e 10 min em pH 8,6. (CUATRECASAS e PARIKH, 1972; LOMANT e FAIRBANKS, 1976; STAROS *et al.*, 1986)

Os mecanismos de reação de conjugação entre ácidos carboxílicos e grupos aminas, através de prévias reações com EDC e NHS, são mostradas na Figura 5.



**Figura 5.** Reação de conjugação entre grupos carboxílicos e grupos aminas: (1) adição direta do grupo amina; (2) regeneração dos grupos carboxílicos pela adição de água (hidrólise) e (3) uso de NHS para garantir a efetividade nas ligações amidas intermediadas por EDC e formação de éster estável, quando seco. Extraída e adaptada de THERMO-SCIENTIFIC (2014).

#### 1.4 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Nos últimos trinta anos, técnicas de biologia molecular foram de fundamental significância para o avanço no campo das ciências da saúde, por exemplo, no

desenvolvimento de novos meios de diagnósticos e no controle e prevenção de doenças. A Reação em Cadeia pela Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction* – PCR), um método molecular criado por Kary Mullis nos anos 80, é uma das ferramentas mais poderosas na caracterização de bactérias, vírus, parasitas, fungos, assim como na identificação de mutações genéticas. Sua função é amplificar, *in vitro*, uma região alvo específica de DNA. (HERNANDEZ-RODRIGUEZ e RAMIREZ, 2012)

A reação em cadeia ocorre em ciclos, em um recipiente contendo:

- DNA a ser amplificado,
- Um par de iniciadores (primers), um avançado (forward) e um reverso, que são complementares à sequência característica do DNA,
- Uma solução dos quatro nucleotídeos que compõem o DNA e
- Uma proteína termoestável denominada DNA-polimerase, que promove a formação de ligações entre os nucleotídeos e o molde utilizado na amplificação (DNA).

Cada um dos ciclos consiste em três etapas: Desnaturação, Anelamento e Extensão.

Etapa 1: Desnaturação. A desnaturação do DNA, que ocorrerá entre 94°C a 95°C.

Etapa 2: Anelamento. A temperatura é reduzida rapidamente para 60°C de modo a favorecer o anelamento dos primers nas extremidades 3' das sequências complementares no molde. Nesta etapa, o molde não formará a hélice dupla, devido ao excesso de primers presentes na reação.

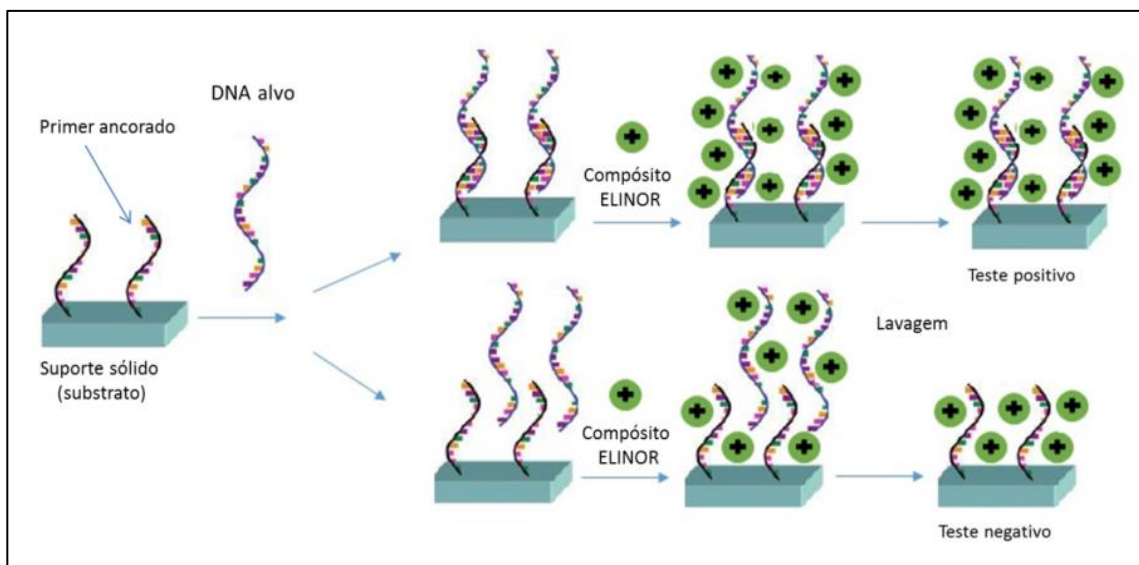
Etapa 3: Extensão. Em seguida, a temperatura é novamente aumentada para 72°C, que é a temperatura ideal para a DNA-polimerase alongar ambos os primers.

Ao fim do primeiro ciclo terá ocorrido a duplicação das fitas originais, formando duas hélices duplas. No segundo ciclo, serão criadas quatro cópias das fitas originais, e assim por diante. O número de cópias cresce exponencialmente ( $2^n$ , onde  $n$  é o número de ciclos) com o número de ciclos. Após o 30º ciclo, um bilhão de cópias serão amplificadas, o que pode ser ocorrer em menos de uma hora. (BERG *et al.*, 2010) Ao final dos ciclos, uma análise por eletroforese (técnica que pode separar proteínas e

outras moléculas carregadas, como DNA, através da movimentação dessas moléculas quando aplicado um campo elétrico) é feita. (JOSHI e DESHPANDE, 2011)

### 1.5 Teste ELINOR

O teste ELINOR é um teste diagnóstico molecular de doenças desenvolvido pelo grupo de Polímeros Não Convencionais da UFPE, que consiste na identificação da interação entre um DNA alvo de fita simples com um primer específico do agente infectante fixado em um suporte sólido, seguida por marcação posterior por PANI/AuNPs catiônicas fluorescentes, que se ligarão às cadeias de DNA por atração eletrostática, devido às cargas negativas presentes nos grupos fosfatos do DNA (Figura 6).



**Figura 6. Esquema do teste ELINOR.**

Após a deposição das nanopartículas e do procedimento de lavagem (necessária para retirar o material genético que não se hibridizou), os substratos podem ser analisados por microscopia de fluorescência. A diferença na resposta de fluorescência emitida em 480 nm pela excitação do conjunto por radiação ultravioleta em 380 nm permite criar um sistema de interpretação do teste. A intensidade de luz observada no teste ELINOR é proporcional à quantidade de nanopartículas adsorvidas, o que, por sua vez, é proporcional à quantidade de DNA presente no teste.



Deste modo, o teste ELINOR pode ser utilizado para detectar vários tipos de doenças (de origem viral, bacteriana ou parasitária) e polimorfismos genéticos, pois depende apenas de uma sequência curta e característica do genoma a ser testado.

## **1.6 Avaliação de testes diagnósticos**

São chamados de testes diagnósticos tanto os exames laboratoriais específicos para a detecção de doenças, quanto procedimentos como interrogatório clínico e exame físico dentre outros métodos. (FLETCHER e FLETCHER, 2006) Idealmente, um teste diagnóstico laboratorial deve ser de fácil administração, relativamente barato, seguro e rápido (SASSOLAS *et al.*, 2007), e, para efeitos comparativos, deve ser avaliado seu grau de precisão (em relação a um teste padrão), seletividade, especificidade e valores preditivos.

Os resultados complexos de um teste geralmente são reduzidos a uma forma simples de modo a serem mais úteis na prática clínica. Um teste diagnóstico efetivo deve ser capaz de ajudar a equipe médica a ponderar as opções de tratamento ou, pelo menos ajudar na decisão se o paciente está ou não doente. Testes feitos em uma determinada população podem apresentar resultados verdadeiros positivos (o teste é positivo e o paciente realmente tem a doença), falsos positivos (o teste resulta positivo, porém o paciente não está doente), verdadeiros negativos (quando o teste é negativo e o paciente realmente não apresenta a doença) e falsos negativos (quando o resultado do teste é negativo para um paciente que possui a doença). (REIS e REIS, 2002)

Parâmetros estatísticos podem ser utilizados para avaliar a qualidade de testes de diagnósticos, como sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivos e valores preditivos negativos. A acurácia ou validade de um teste é um parâmetro que informa se os resultados obtidos representam uma indicação mais próxima do valor real ou o quanto se afasta dele. Acurácia é a proporção de testes verdadeiramente positivos ou verdadeiramente negativos em relação à totalidade do conjunto de resultados. Um teste com o valor máximo de acurácia é denominado *padrão – ouro* (ou teste de referência); por possuir o menor risco de levar a falsas conclusões, ele é o indicador usado para determinar a presença ou ausência da doença no indivíduo. (FLORES, 2005) Geralmente, os testes padrão-ouro são relativamente elaborados, caros ou arriscados.

Como consequência, testes mais simples e que possuam acurácia próxima ao teste de referência vêm sendo desenvolvidos. (*OLIVEIRA, 1995*)

Por sua vez, a sensibilidade é a probabilidade de um teste diagnosticar um indivíduo verdadeiramente doente. Isso significa que se todos os indivíduos de uma população de pessoas doentes apresentarem resultados positivos, o teste em questão tem uma sensibilidade de 100%. Ter sensibilidade alta indica que o teste pode diminuir em muito a porcentagem de resultados falsos negativos. Já a especificidade se refere à capacidade que o teste diagnóstico tem de detectar os indivíduos verdadeiramente sadios. Ou seja, quanto maior a especificidade, melhor o teste é em eliminar o maior número de resultados falsos positivos. (*CARNEIRO, 2001*)

Os testes de sensibilidade e especificidade são aplicados a grupos de indivíduos sabidamente doentes e outro de pessoas não doentes, e não se presta a estimar a probabilidade da doença em um paciente individual. Em estudos epidemiológicos e clínicos, no caso de considerar o resultado de apenas um indivíduo onde o operador do teste não sabe se o paciente está ou não doente, mas apenas possui a informação do resultado do teste para ele, conceitos de valores preditivos são introduzidos. Esses valores representam a probabilidade que um teste tem de prever uma doença. Os valores preditivos podem ser positivos ou negativos. Valor Preditivo Positivo (VPP) é dado pela proporção de resultados positivos para os que estão realmente doentes. Já o Valor Preditivo Negativo (VPN) para um teste refere-se à proporção de resultados negativos para os que não estão realmente doentes. (*SANTOS, 2013*)

#### 1.6.1 Tabela de Contingência

Os resultados de um teste podem ser relacionados com os dados do diagnóstico verdadeiro (Padrão-ouro) pela construção de uma tabela de contingência (Tabela 1), o que facilita a análise. Há quatro inserções possíveis: verdadeiro positivo (teste positivo e o indivíduo está doente), falso positivo (o teste é positivo e o indivíduo não está doente), verdadeiro negativo (o teste é negativo e o indivíduo não está doente) e falso negativo (o teste é negativo, porém o indivíduo está doente). (*ARAGON, 2007*)

**Tabela 1. Representação dos possíveis resultados (tabela de contingência) em um teste diagnóstico.**

Doença			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	Verdadeiro Positivo (A)	Falso Positivo (B)	A + B
NEGATIVO	Falso Negativo (C)	Verdadeiro Negativo (D)	C + D
Total	A + C	B + D	

Com a tabela pronta, pode-se calcular o valor da sensibilidade, especificidade e acurácia de um teste de diagnóstico pelas seguintes equações:

$$\text{Sensibilidade} = \frac{A}{A + C} \qquad \text{Especificidade} = \frac{D}{B + D}$$

$$\text{Acurácia} = \frac{A + D}{A + B + C + D} .$$

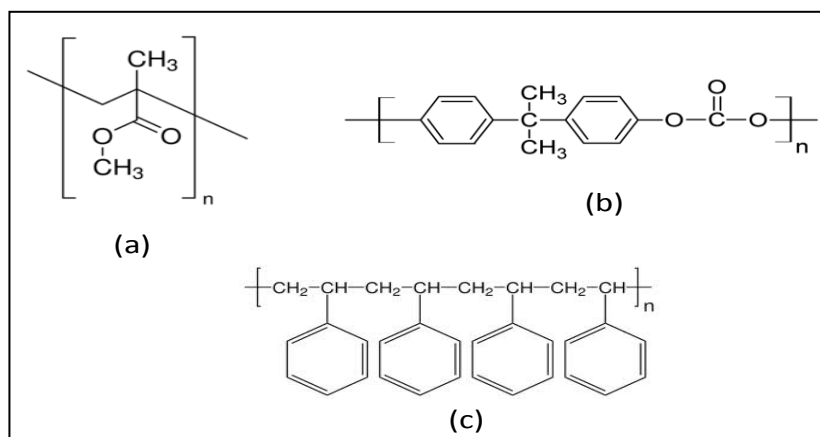
## 1.7 Substratos poliméricos

O teste ELINOR atualmente utiliza o vidro como substrato utilizando a técnica de adsorção para imobilização de primers, e tem mostrado boas percentagens de sensibilidade e especificidade. No entanto, esses valores podem ser aumentados se materiais plásticos forem introduzidos como alternativa ao vidro. (NAJMABADI *et al.*, 2008; MINEO *et al.*, 2013)

Plásticos são materiais apropriados para aplicações em diagnósticos moleculares baseados em DNA, pois além do baixo custo, são adequados para produção em larga escala, possuem boa resistência química, biocompatibilidade, e alta transparência óptica para os comprimentos de onda usuais de excitação e detecção. (OEHR, 2003; ZHAO *et al.*, 2008)

### 1.7.1 Polimetilmetacrilato, Policarbonato e Poliestireno

Neste trabalho foram estudados três materiais poliméricos termoplásticos: Polimetilmetacrilato (PMMA), Policarbonato (PC) e Poliestireno (PS). Suas estruturas são mostradas na Figura 7.



**Figura 7. Estruturas químicas dos polímeros: (a) PMMA; (b) PC; (c) PS.**

O polimetilmetacrilato é um polímero que possui boa estabilidade química, propriedades térmicas excelentes, boa transparência óptica e ótima biocompatibilidade, sendo ainda relativamente inerte e hidrofóbico. (WANG, XUMEI *et al.*, 2011) No entanto, para que sua superfície possa vir a ser utilizada como plataforma para biorreconhecimento de moléculas (oligonucleotídeos e anticorpos, por exemplo), se faz necessária uma modificação específica, a fim de que sejam gerados grupos funcionais capazes de interagir com essas moléculas através de ligações covalentes. (LE *et al.*, 2012) Esse material pode ser utilizado na fabricação de guias de ondas (LEE *et al.*, 2007), barras horizontais (cantilevers) utilizadas em sensores de compostos orgânicos voláteis (SHIRAISHI *et al.*, 2013), hibridação de DNA, engenharia de tecidos, biossensores e microarranjos. (GODDARD e HOTCHKISS, 2007)

O policarbonato, que pode ser facilmente fabricado e moldado, é muito utilizado em dispositivos laboratoriais e clínicos (como substratos em ensaios de detecção de hibridação de DNA e em desenvolvimento de novos medicamentos) (ASLAN *et al.*, 2006) e em indústrias e comércios (grades ópticas, cobertura de farol de automóvel, câmeras e ópticas lentes) devido às suas boas propriedades ópticas, alta resistência a impacto e resistência a altas temperaturas (115- 130°). (NAJMABADI *et al.*, 2008)

Porém, como muitos polímeros orgânicos, ele tem pouca resistência à abrasão e sofre degradação quando exposto à radiação ultravioleta. (VALLON *et al.*, 1996) O PC é um material de baixo custo que pode ser facilmente obtido a partir de discos compactos convencionais (*compact discs* – CDs). (WANG e LI, 2007) Assim como o PMMA, o PC possui superfície inerte, e por isso precisa de tratamento de superfície para que possa vir a ser usado no reconhecimento de moléculas biológicas. (SUBEDI *et al.*, 2008)

Por sua vez, o poliestireno é um polímero sintético transparente produzido a partir da polimerização do monômero estireno. Ele é muito utilizado nas indústrias alimentícias devido a sua resistência térmica, baixa densidade, excelente durabilidade mecânica e fácil processamento e modelagem. Pode ainda ser usado como substrato, ao qual podem ser ligados agentes antibacterianos em sua superfície a fim de combater os microorganismos que apresentam riscos para a segurança e qualidade alimentar. (YAN *et al.*, 2014) Outras aplicações do poliestireno incluem ensaios bioanalíticos e materiais hemocompatíveis. Porém, como a maioria dos polímeros, o PS também sofre degradação quando submetido à exposição à radiação ultravioleta. (GODDARD e HOTCHKISS, 2007)

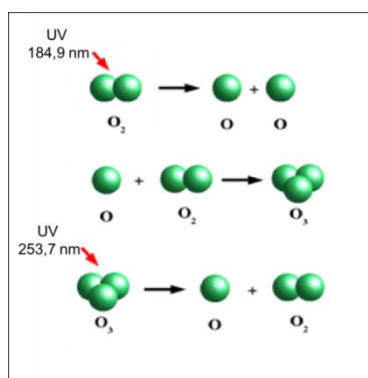
## **1.8 Tratamentos para Modificação de Superfícies Poliméricas**

Como visto na seção anterior, muitos polímeros possuem superfícies inertes e necessitam de alguma modificação de superfície para serem usados como substratos na fixação de biomoléculas. Processos relativamente simples como o tratamento por ultravioleta/ozônio (UV/O<sub>3</sub>), tratamento por plasma ou modificação química podem melhorar a adesão destas superfícies a essas moléculas, devido à criação de grupos funcionais polares. (ROTH-FÖLSCH e LÖDEL, 2011; LE *et al.*, 2012)

### **1.8.1 Tratamento por Ultravioleta/Ozônio**

Uma lâmpada de ultravioleta (UV) de mercúrio de baixa pressão pode emitir radiação em dois comprimentos de onda muito importantes para o tratamento de superfícies: 184,9 nm e 253,7 nm. O oxigênio (O<sub>2</sub>) presente na atmosfera absorve o

comprimento 184,9 nm, o que leva à geração ozônio ( $O_3$ ). Este, por sua vez, pode ser decomposto pela exposição à luz ultravioleta de comprimento de onda de 253,7 nm, transformando-se em uma molécula de oxigênio e um oxigênio atômico muito reativo, como mostra a Figura 8. Este segundo comprimento de onda não contribui para a formação de moléculas de  $O_3$ , pois não é absorvido por moléculas de oxigênio. (VIG, 1985; CLARK *et al.*, 2000) No entanto, os raios UV com comprimento de onda de 253,7 nm podem causar fotólise em compostos orgânicos, gerando íons, radicais livres, moléculas excitadas e neutras. As moléculas excitadas ou os radicais livres podem reagir com o oxigênio atômico, formando outras moléculas, como água ( $H_2O$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ), grupos carboxílicos ( $COOH$ ), hidroxilas ( $OH$ ) e  $O_2$ . (THREE BOND CO., 1987)



**Figura 8. Processo de formação das moléculas de ozônio. Extraída de BACKER (2014).**

Um dos fatores que influenciam na modificação de superfície é a distância entre o substrato e a fonte de luz. Em seus ensaios, VIG (1985) mostrou que para obter uma maior eficiência na modificação de compostos orgânicos é necessário que a amostra esteja o mais próximo possível da fonte ultravioleta.

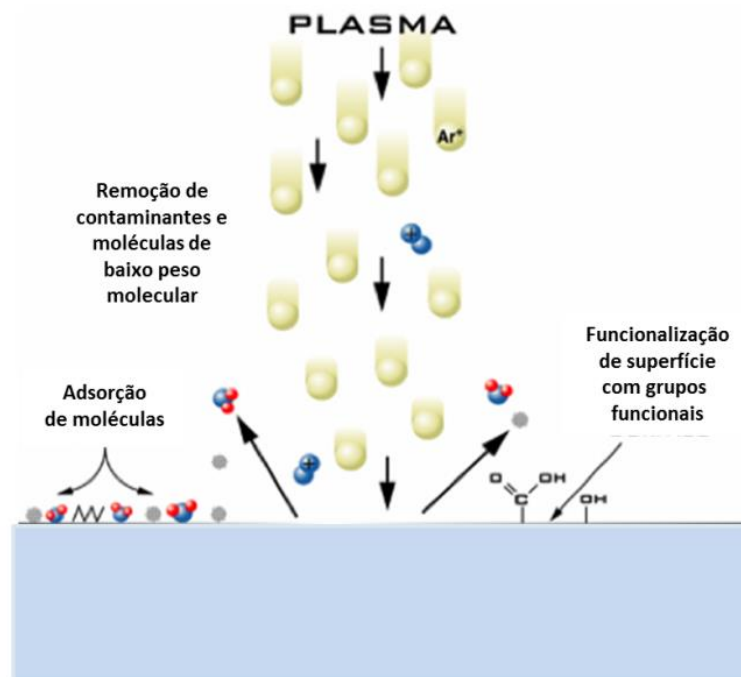
### 1.8.2 Tratamento por Plasma

Plasma, considerado como o quarto estado da matéria, é composto por íons positivos e negativos, elétrons, átomos e moléculas neutras. A energia do plasma é capaz de ionizar átomos neutros, quebrar moléculas para formar radicais reativos, gerar estados excitados em átomos e moléculas. A formação do plasma se dá pela excitação de gases para estados mais energéticos pelas colisões de átomos e moléculas com

elétrons livres, acelerados por um campo elétrico, normalmente gerado por rádio frequência, microondas ou através de uma descarga de elétrons por um filamento quente. (SLEPICKA *et al.*, 2013)

Em ambientes de plasma ocorrem muitas reações químicas. Essas reações primeiramente acontecem com a interação da superfície com grupos ativos no plasma (oxidação), o que é seguido pela reestruturação da superfície (que pode então passar a incorporar átomos, através da formação de grupos funcionais). Superfícies de materiais inertes podem sofrer mudanças devido à alta densidade de íons, átomos excitados e radiação UV. (VALLON *et al.*, 1996) Por exemplo, em superfícies poliméricas, tratadas por plasma de argônio (Ar) podem acontecer separações dos hidrogênios das cadeias e criação de radicais livres. Esses radicais podem se originar devido ao choque de íons  $\text{Ar}^+$  ou elétrons, que rompem ligações do tipo C-C ou C-H. (SLEPICKA *et al.*, 2013) Essas mudanças ajudam a melhorar as propriedades de superfícies como força de adesão, cobertura e biocompatibilidade, bem como limpeza e controle de energia de superfície. (CHU *et al.*, 2002; HARRICK-PLASMA, 2006)

Tratamento por plasma é uma ótima ferramenta, por ser segura e ambientalmente favorável, para limpeza de superfície. Normalmente, plasma de oxigênio é utilizado em muitas indústrias para a remoção da contaminação orgânica superficial de materiais que requer uma limpeza mais rigorosa. Além de remover contaminantes, a adesão às superfícies pode ser melhorada. Para boa adesão aconteça são necessárias fortes forças interfaciais. A depender da compatibilidade química e/ou formação de ligações químicas, o tratamento de plasma pode fornecer grupos funcionais polares, como hidroxilas, carbonilas, carboxílicos e aminas (ver Figura 9). (HEGEMANN *et al.*, 2003; HARRICK-PLASMA, 2006)



**Figura 9. Processos de modificação de superfície por plasma.**

Além disso, um controle na energia superficial pode ser feita, melhorando a molhabilidade do material. Superfícies poliméricas podem adquirir um caráter hidrofílico ou hidrofóbico a depender do tipo do gás usado. Este processo tem sido muito utilizado para melhorar as propriedades superficiais em cateteres feitos de tubos poliméricos. (OEHR, 2003; HARRICK-PLASMA, 2006)

Neste trabalho, por meio de técnicas de caracterização que serão descritas na próxima seção, investigamos a molhabilidade e a geração de grupos funcionais específicos polares em superfícies poliméricas submetidas tanto ao tratamento de plasma quanto ao de UV/O<sub>3</sub>.

## 1.9 Técnicas de Caracterização

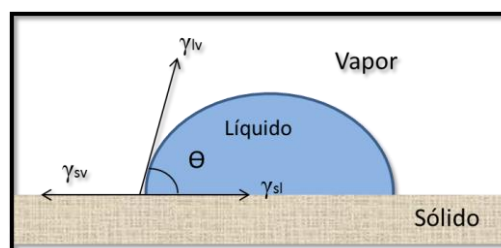
Métodos para caracterização dos substratos, como ângulo de contato, são empregados para estudar a molhabilidade e a facilidade da adesão de biomoléculas em substratos poliméricos. A espectroscopia Raman que pode ser usada para identificar os substratos e espectroscopia de fluorescência serão discutidos nas próximas subseções.



### 1.9.1 Ângulo de Contato

O comportamento da gota de um líquido depositado em uma superfície depende do equilíbrio entre as forças adesivas (que ajudam no espalhamento da gota pela superfície) e as coesivas (que fornecem a retração da gota, levando a seu mínimo contato com a superfície). (LAMOUR *et al.*, 2010)

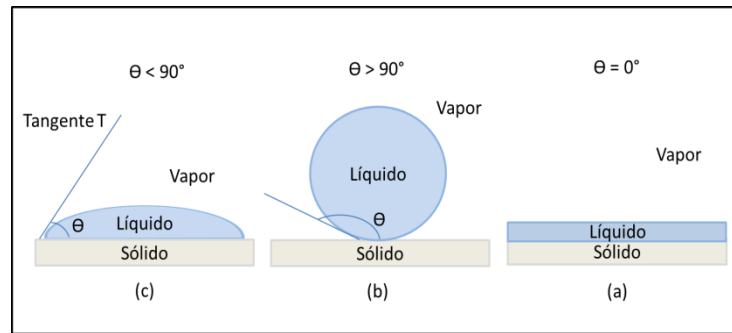
O ângulo de contato entre um líquido e um sólido é definido como sendo o ângulo formado na interface. Sua medida representa uma estimativa quantitativa da molhabilidade da superfície, que depende do equilíbrio termodinâmico de três interfaces: líquido – vapor (lv), sólido – vapor (sv) e sólido – líquido (sl). (LOEB e SCHRADER, 1992) O ângulo de contato do equilíbrio pode ser estimado pela equação de Young (Eq. 1), que depende das tensões superficiais entre as interfaces ( $\gamma$ ) e envolve as energias livres por unidade de área em cada interface (ver Figura 10). (CAM-200, 2001)



**Figura 10. Diagrama esquemático das tensões superficiais atuantes em uma gota sésil de um líquido sobre um substrato sólido.**

$$\gamma_{sl} = \gamma_{sv} - \gamma_{lv} \cos \theta \quad (\text{Eq. 1})$$

O estudo do ângulo de contato é focado nas características de molhabilidade nas interfaces líquido – sólido. Se o ângulo de contato é  $\theta < 90^\circ$ , a molhabilidade é favorecida, e então o substrato sólido é dito hidrofílico (ou seja, ele tem afinidade por água). Quando  $\theta > 90^\circ$ , a superfície não favorece a molhabilidade, sendo hidrofóbica (repele a água). No caso em que esse ângulo seja igual a zero, a superfície apresentar uma completa cobertura pelo líquido, sendo então chamada de superhidrofílica (Figura 11). (DRELICH *et al.*, 2011) Por sua vez, uma superfície é superhidrofóbica se seu ângulo de contato com a água é maior que  $150^\circ$ . (BRACCO e HOLST, 2013)



**Figura 11. Ilustração do ângulo de contato formado entre uma gota séssil de um líquido e um substrato sólido: (a)  $\theta < 90^\circ$  (b)  $\theta = 90^\circ$  (c)  $\theta > 90^\circ$ .**

Goniometria é o estudo da forma de uma gota de um líquido colocada em um suporte sólido. O goniômetro é um dispositivo formado por uma fonte de luz, um suporte para amostra, lentes e um dispositivo de captura de imagens. A gota é iluminada pela fonte luminosa, e sua silhueta é capturada pelas lentes, sendo a imagem gravada pelo computador. O goniômetro utiliza um software que pode fazer um ajuste a partir da equação de Young – Laplace (Eq. 2) (que relaciona as pressões interna e externa ao ângulo de contato), utilizando cada ponto na curva da silhueta da gota que intercepta a linha de base (suporte da amostra), de modo a definir uma tangente (T). (MARMUR, 1992; CAM-200, 2001)

$$\Delta P = \gamma (1/R_1 + 1/R_2) \quad (\text{Eq. 2})$$

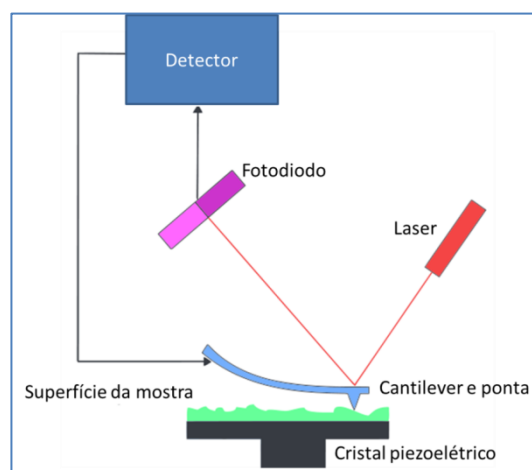
onde  $\Delta P$  é a diferença de pressão interfacial,  $\gamma$  é a tensão superficial e  $R_1$  e  $R_2$  são os raios de curvatura da superfície.

O objetivo de termos utilizado esta técnica neste trabalho é o de verificar a mudança de hidrofiliicidade de placas poliméricas a serem usados como substratos em testes de diagnóstico. Porém, uma limitação desta técnica é a incapacidade de distinguir entre diferentes grupos funcionais hidrofílicos presentes na superfície analisada. (GODDARD e HOTCHKISS, 2007)

### 1.9.2 Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* – AFM) é uma ferramenta muito útil no estudo de superfícies e de micro e nanoestruturas. Esta técnica

de alta resolução de imagem de superfícies, que pode ser aplicada para o estudo da morfologia de cerâmicas, metais, biomoléculas, células ou polímeros, (JANDT, 2001), consiste na análise da superfície de uma amostra pela sua interação com a ponta de uma sonda pontiaguda presa a uma pequena barra horizontal (do inglês, *Cantilever*). As pontas mais utilizadas nas medidas de AFM são geralmente feitas de nitreto de silício ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ), silício (Si) e diamante. (BHUSHAN e MARTI, 2004) Devido às interações (forças de van der Waals) dos átomos com a ponta, o cantilever sofre uma deflexão na direção z, durante o escaneamento pelo cristal no eixo xy, de modo a manter a força constante. A força típica entre a amostra e a ponta está na faixa de  $10^{-11}$  e  $10^{-6}$  N. (MEYER, 1992) Essa deflexão é medida quando o cantilever é atingido por um feixe do laser, redirecionando o raio para um fotodetector (fotodiodo). Com isso, uma imagem bidimensional pode ser obtida pelo mapeamento desta deflexão versus sua posição na amostra. (JANDT, 2001; BUTT *et al.*, 2005) A Figura 12 mostra um esquema do funcionamento das análises de AFM.

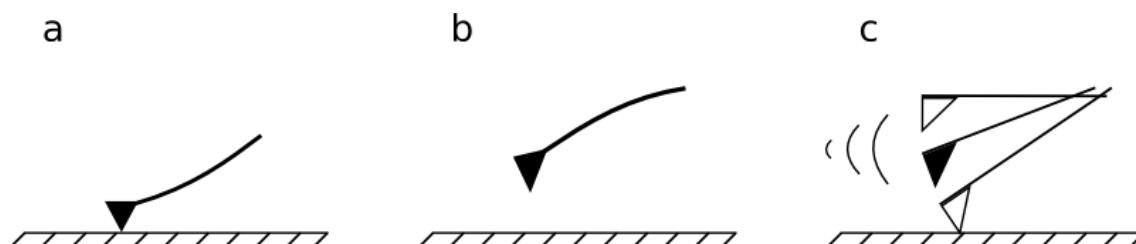


**Figura 12. Esquema das análises de AFM. Extraída e adaptada de WIKIPEDIA (2008).**

Existem três modos de operação para o AFM: contato, não-contato e toques oscilantes (tapping mode). No modo de contato, as deflexões na posição da sonda são causadas pelas forças repulsivas de van der Waals, cujo escaneamento é feito muito rapidamente, o que é excelente para análises em amostras rugosas. A ponta pode ser usada em análises de fricção, e por isso elas podem sofrer danos ou deformar. (WILSON e BULLEN, 2006)

No modo não-contato, as forças atuantes de van der Waals são atrativas e fazem a sonda oscilar próximo da superfície da amostra, porém sem tocá-la. A distância entre amostra e sonda é de centenas de Angstrons (Å) e a posição da sonda oscila com uma frequência ressonante na faixa de (100 - 400 kHz). Por não manter contato direto com a amostra, a sonda pode ter uma vida útil maior. No entanto, algumas das desvantagens deste modo de operação são a baixa resolução e o fato de que contaminantes podem interferir nas oscilações, sendo geralmente necessário que a medida seja feita sob alto vácuo. (VEECO-INSTRUMENTS, 2005; WILSON e BULLEN, 2006)

Outra alternativa de operação, mais utilizada para análises de materiais biológicos, gases e líquidos não corrosivos, é o modo de toques oscilantes (contato intermediário) entre a ponta da sonda e a superfície da amostra. Neste modo, a amplitude de oscilação, que é mantida constante, é tipicamente entre 20 nm e 100 nm. A força exercida é mínima, por isso este método tem um grande potencial para obter imagens de alta resolução. Devido à ausência de forças laterais, as pontas usadas não são danificadas. No entanto, embora esta seja uma boa técnica, há a limitação de uma variação na topografia para imagens de grandes áreas. (HOWLAND e BENATAR, 1996; DUFRÊNE, 2002) Um diagrama esquemático dos modos de operação de um microscópio de força atômica pode ser visto na Figura 13.

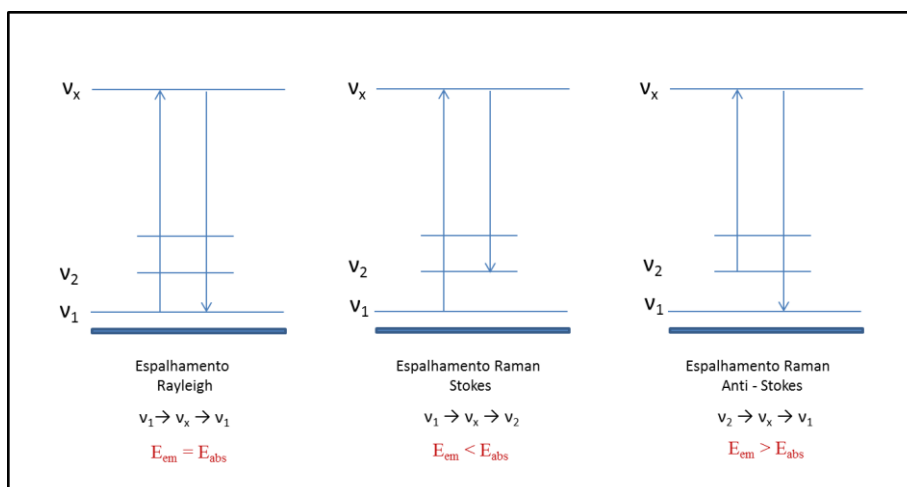


**Figura 13. Modos de operação de análise de AFM: modo de (a) contato, (b) não contato e (c) contato intermediário. Extraída de WIKIPEDIA (2013).**

### 1.9.3 Espectroscopia Raman

Quando moléculas são atingidas pela luz, os fótons podem ser espalhados elasticamente, de modo que suas energia e frequência antes e depois sejam iguais,  $\nu_1 = \nu_2$ . Este é o chamado Espalhamento Rayleigh. (ANTONY, 2013) Em 1928, C. V. Raman estudou um novo tipo de espalhamento da luz, que ficou conhecido como efeito

Raman, em que ocorrem colisões inelásticas. Neste tipo de interação, energia vibracional pode ser transferida dos fótons para a molécula da amostra (intensidades denominadas linhas Stokes no espectro Raman,  $\nu_1 > \nu_2$ ) ou das moléculas para os fótons (intensidades denominadas linhas Anti-Stokes,  $\nu_1 < \nu_2$ ). A frequência da transição vibracional corresponde à diferença entre as frequências da luz incidente e da radiação espalhada, e pode ser analisada por um espectrômetro. (COLTHUP *et al.*, 1975) A Figura 14 mostra um diagrama com as relações de absorção e emissão de energia para os espalhamentos citados anteriormente.

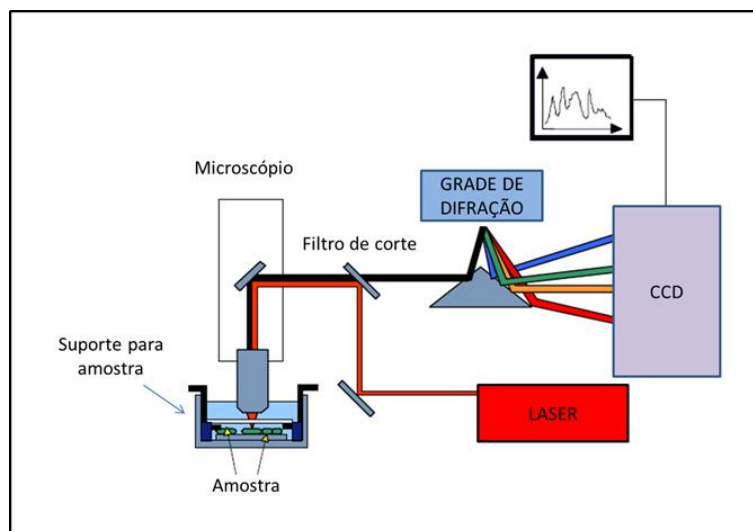


**Figura 14.** Esquema das mudanças de níveis nos espalhamentos Rayleigh e Raman, onde  $\nu$ ,  $E_{em}$  e  $E_{abs}$  são as frequências de cada estado, a energia de emissão e a energia de absorção, respectivamente.

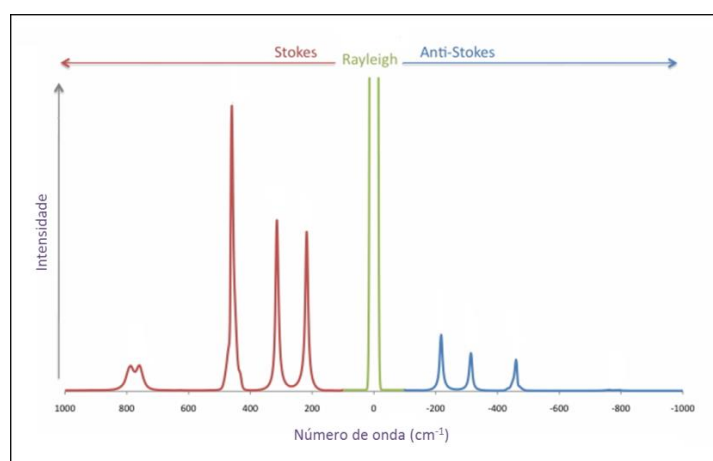
A intensidade espectral das bandas depende da efetividade das trocas de energias entre moléculas e fótons. Quando uma molécula é colocada em um determinado campo elétrico de uma radiação eletromagnética, um dipolo induzido será gerado, ou seja, os elétrons e prótons sofrerão forças opostas, levando, assim, a uma separação de cargas enquanto for mantido o campo. A deformação da nuvem eletrônica devido à ação do campo elétrico é chamada de polarizabilidade. (KOENIG, 2001)

Alguns equipamentos de espectroscopia Raman podem ser compostos por um suporte para amostras, um microscópio confocal (utilizado para diminuir as perdas por espalhamento de luz), um laser que pode emitir no visível ou no infravermelho próximo, um filtro de corte que impede a passagem dos fótons espalhados elasticamente (fótons de Rayleigh) (evitando, assim, um alto ruído de fundo), uma grade de difração para separar todas as frequências características vindas da amostra, e uma câmara CCD

(*Charge-Coupled Device* – Dispositivo de carga acoplada), que irá detectar essas frequências e processá-las transformando-as em um espectro na tela de um computador (Figura 15). (NOTINGHER, 2007) O espectro apresenta apenas as intensidades do espalhamento Raman Stokes; como a probabilidade do espalhamento Anti-Stokes ocorrer é muito baixa, as intensidades das bandas correspondentes são muito fracas, como pode ser observado na Figura 16. (AMER, 2009)



**Figura 15.** Diagrama esquemático de um espectrômetro Raman. Extraída e adaptada de NOTINGHER (2007).



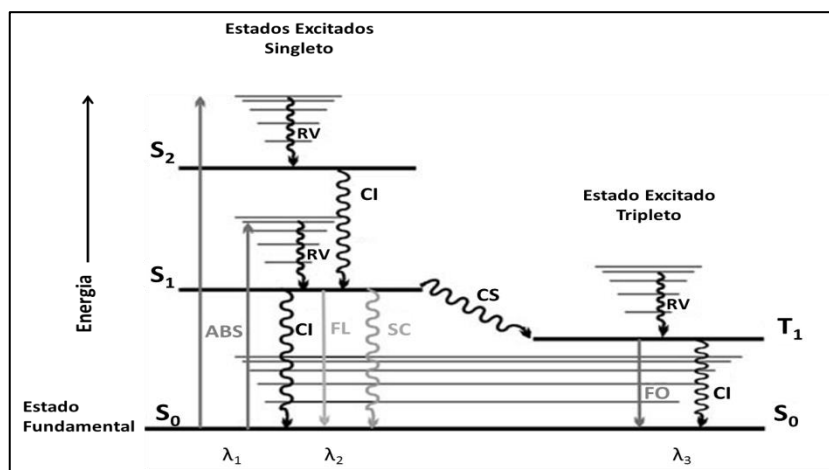
**Figura 16.** Representação de um espectrograma dos espalhamentos Raman Stokes, Rayleigh e Raman Anti-Stokes de uma determinada amostra. Extraída e adaptada de DIPPEL (2011).

A espectroscopia Raman é uma ótima técnica para a identificação de compostos tendo como base uma referência conhecida, pois o padrão de frequência de cada amostra é único. (KOENIG, 2001) Foi por essa característica que este método foi utilizado para identificar os substratos poliméricos usados neste trabalho.

#### 1.9.4 Espectroscopia de Fluorescência

Nos últimos 30 anos, a espectroscopia de fluorescência tem se tornado uma ferramenta muito útil da configuração da molécula, que pode ser aplicada em diversos campos de estudo como bioquímica, biofísica, diagnósticos médicos, ciência forense, sequenciamento de DNA, análises genéticas, ciência de materiais, entre outros. (LAKOWICZ, 2006)

A fluorescência, assim como a fosforescência, é um tipo de luminescência ou fotoluminescência, efeito caracterizado pela emissão de luz devido a uma transição eletrônica entre um estado excitado e outro de baixa energia, dependendo da natureza do estado excitado. (VALEUR, 2001) Além desses tipos de decaimento eletrônico seguido de emissão, outros possíveis tipos de transições como absorção (ABS), relaxação vibracional (RV), supressão colisional (SC), cruzamento entre sistemas (CS), entre outros, podem ser representados em um diagrama de transição eletrônica denominado Diagrama de Jablonski (Figura 18). (HOF *et al.*, 2005) Em um típico diagrama de Jablonski, o estado singlete fundamental, o primeiro estado singlete excitado e segundo estado singlete excitado são representados por  $S_0$ ,  $S_1$  e  $S_2$ , respectivamente. Nos estados singletos excitados, onde ocorre o fenômeno da fluorescência, os elétrons se encontram pareados por spins opostos, permitindo seu retorno ao estado singlete fundamental mais rapidamente. A taxa de emissão de fluorescência é cerca de  $10^8 \text{ s}^{-1}$ , com um tempo de vida próximo a 10 ns. (LAKOWICZ, 2006)



**Figura 17. Diagrama de Jablonski ou diagrama de transições eletrônicas, onde estão representados alguns tipos de transição entre os estados singletos ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,...) e tripleto ( $T_1$ ), como absorção (ABS), conversão interna (CI), supressão colisional (SC), relaxação vibracional (RV), cruzamento entre sistemas (CS), fluorescência (FL) e fosforescência (FO). Extraída e adaptada de HOF *et al.* (2005).**

Por sua vez, a fosforescência acontece pela transição de um elétron do estado tripleto excitado para o estado fundamental. A transição singlete-singlete para elétrons de mesmo spin é proibida, isso faz com que este passe, primeiramente, para o estado tripleto, por meio não radiativo (onde não há emissão de radiação), até decair para o estado fundamental, emitindo um fóton. Devido a essa transição não radiativa inicial, seu decaimento é mais lento que o da fluorescência, com baixas taxas ( $10^3$  a  $10^0$  s<sup>-1</sup>) e tempo de vida de milissegundos a segundos. (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 2006)

Assim como na fosforescência, os processos não radiativos (relaxação vibracional e conversão interna), também podem acontecer antes da fluorescência, o que leva a uma perda de energia, onde o comprimento de onda da radiação emitida é maior que o comprimento de onda de absorção (lei de Stokes). (TURRO, 1991; VALEUR, 2001)

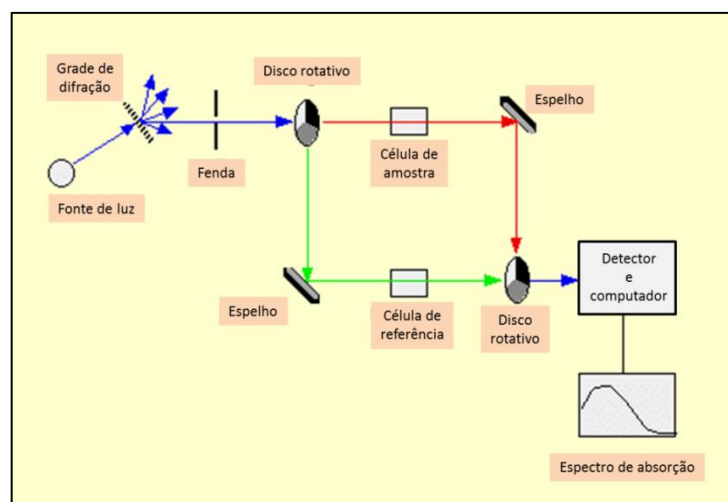
As medidas de fluorescência podem ser realizadas através de um equipamento denominado espectrofluorímetro (ou espectrofluorômetro). Neste equipamento, é possível obter o espectro de absorção e de emissão de uma determinada amostra, que geralmente, são representados pela curva de intensidade de fluorescência como função do comprimento de onda (nm) ou número de onda (cm<sup>-1</sup>), com os dados sendo obtidos a amostra é continuamente irradiada por uma quantidade constante de fótons. (LAKOWICZ, 2006)



### 1.9.5 Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV/Vis)

Espectrofotometria de Ultravioleta-Visível (UV/Vis) é uma técnica que analisa a absorção de luz por uma amostra em função de um comprimento de onda. Ela utiliza luz na faixa visível a UV próximo e do infravermelho próximo. A faixa de análise é de 200 – 900 nm. Com a absorção de radiação, o elétron que se encontra no estado fundamental (camada de valência ou estado de menor energia) salta para um estado de maior energia (estado excitado). Em certo sentido, a UV/Vis é uma técnica complementar à espectroscopia de fluorescência, pois enquanto a primeira mede a transição do elétron do estado fundamental para o estado excitado, a segunda trata da análise da transição do elétron do estado excitado para o estado de menor energia. (OUDHIA, 2012)

Um exemplo de espectrofotômetro UV/Vis é mostrado no esquema da Figura 19. Ele pode ser composto por duas fontes de luz, uma grade de difração e uma fenda (monocromador), dois espelhos, um divisor de feixes, uma célula de referência e outra para a amostra, discos rotativos, detector e computador.



**Figura 18. Esquema de um espectrofotômetro. Extraída e adaptada de OUDHIA (2012).**

As fontes de luz geralmente utilizadas são as lâmpadas de deutério e/ou a lâmpada de tungstênio. A primeira cobre a faixa de luz ultravioleta e a segunda abrange a faixa visível e infravermelho próximo. A radiação passa por uma grade de difração para que os comprimentos de onda que a compõem possam ser separados. Em seguida, o feixe de luz atravessa uma fenda que seleciona o comprimento de onda desejado. Com

isso, a luz monocromática chega a um disco giratório composto por três regiões: uma transparente, outra preta (opaca) e uma espelhada. O feixe que atravessa a região transparente passa pela célula de amostra chegando a um espelho direcionado à região espelhada de um segundo disco rotatório, e coletado por um detector.

Se o feixe que sai da fenda for refletido pela região espelhada do disco, ele será direcionado a outro espelho que o encaminhará à célula de referência, passando, logo após pela seção transparente do segundo disco, chegando assim ao detector. Os sinais vindos da amostra e referência são analisados por um computador e convertidos em um espectro de absorção da amostra. E, por fim, o feixe ao se chocar com a parte opaca preta é impedido de atravessá-la, até que a medida seja realizada. (OWEN, 2000; OUDHIA, 2012) Após os dados da amostra de interesse e o da amostra de referência serem coletados, eles são processados e convertidos em um espectro de absorção.

Esta técnica é utilizada em análises qualitativas de compostos orgânicos (identificação de compostos) e quantitativas (quantificação molecular). A medição quantitativa é regida pela lei de Beer – Lambert, Quando um feixe de luz atravessa uma célula transparente contendo uma substância absorvente, pode ocorrer uma redução na intensidade de luz que a atravessa: a absorbância (A), ou densidade óptica, depende do coeficiente de extinção (ou capacidade de absorção molar -  $\epsilon$ ), do caminho óptico (b) da radiação através da amostra (em cm) e a concentração do soluto (c) na solução, como mostrado na Eq. 5. (LI, Y. *et al.*, 2006; BEHERA *et al.*, 2012)

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c \quad (\text{Eq. 3}).$$

## **OBJETIVOS**

### ***2.1 Objetivo Geral***

1. O objetivo geral deste trabalho é estudar substratos poliméricos a fim de escolher o mais adequado para o uso no teste ELINOR, e posteriormente, realizar o teste ELINOR, comparando os resultados obtidos com aqueles realizados com o teste tradicional no Laboratório de Polímeros Não Convencionais.

### ***2.2 Objetivos Específicos***

1. Utilizar tratamentos de superfícies como UV/O<sub>3</sub> e plasma para melhorar a adesão de biomoléculas.
2. Realizar medidas de espectroscopia Raman para identificar os substratos poliméricos.
3. Estudar a variação ângulo de contato nos substratos tratados.
4. Identificar por técnicas qualitativas e quantitativas os grupos carboxílicos formados.
5. Estudar a morfologia dos polímeros por AFM.
6. Estudo da autofluorescência dos substratos poliméricos.
7. Realizar o teste ELINOR no substrato escolhido, bem como avaliá-lo pela construção de uma tabela de contingência.

## METODOLOGIA

As caracterizações descritas a seguir foram realizadas a fim de escolher o substrato polimérico mais adequado para otimização do teste ELINOR, bem como identificar os substratos plásticos obtidos comercialmente pela técnica de espectroscopia Raman. O método de ângulo de contato foi usado para confirmar a modificação de superfície pelos tratamentos de superfície. Enquanto que as técnicas de ATR, UV/Vis e AFM foram utilizadas para verificar a formação de grupos polares, quantificar grupos carboxílicos e analisar a topografia das superfícies poliméricas, respectivamente, assim como a espectroscopia de fluorescência foi utilizada para analisar a autofluorescência dos substratos. Além dessas caracterizações, o processo de realização do teste ELINOR é descrito e, em seguida, uma estatística é feita a fim de avaliar seus resultados.

### 3.1 Preparação de placas poliméricas para caracterização e teste ELINOR

As lâminas foram inicialmente sonicadas por 15 min em uma solução de detergente Hamilton cleaning solution concentrate (EUA) a 25% e, em seguida, lavadas com água deionizada com ajuda de uma pisseta, e logo colocadas no sonicador com água deionizada por 15min. Elas foram então sonicadas por mais 15min em uma solução de álcool isopropílico ( $C_3H_8O$  - Química Moderna, Brasil) 50%, e finalmente secas por gás nitrogênio por 15 s.

### 3.2 Espectroscopia Raman

Os espectros dos substratos poliméricos foram obtidos utilizando o Analisador ProRaman-L (ProRaman-L Analyzer - Enwave Optronics Inc., USA), com um laser de diodo em 785 nm, cuja distância de trabalho é de 7 mm. A faixa espectral do espectrógrafo está entre  $250\text{ cm}^{-1}$  a  $2000\text{ cm}^{-1}$ , à temperatura ambiente, com a resolução de  $1\text{ cm}^{-1}$ . O software usado foi o EZRaman Reader V8.2.9.

### **3.3 Modificação de Superfície para caracterização**

As lâminas de PMMA, PC e PS (ACRISUL, Brasil), cada uma com dimensões 3 mm de comprimento, 2 mm de largura e 0,2 mm de espessura, foram submetidas a diversos tempos aos tratamentos de ultravioleta/ozônio e plasma de argônio.

#### **3.3.1 Tratamento por UV/O<sub>3</sub>**

PMMA, PS e PC foram tratados por 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min e 60 min na câmara de Ultravioleta (Bioforce Nanosciences Tipcleaner, EUA) hermeticamente fechada.

#### **3.3.2 Tratamento por Plasma de Argônio**

O equipamento de Plasma (Plasma Cleaner PDC – 001 – Harrick Plasma, USA) foi utilizado para tratar os substratos poliméricos. Eles foram expostos a plasma de argônio por 30s, 60s, 120s, 150s e 180s. Segundo HARRICK-PLASMA (2006), 3 min de exposição ao plasma são suficientes para tratar superfícies. Além disso, a pressão usada foi de 1300 mtorr e com alta potência (29,6 W).

### **3.4 Ângulo de contato**

As medidas de ângulo de contato foram realizadas com o uso do instrumento CAM 200 (Optical Contact Angle Meter – CAM 200, KVS Instruments LTD, Finlândia), composto por uma seringa de precisão de 1 mL (Hamilton/Analítica, Brasil), uma câmera de captura de imagens consecutivas, uma fonte de luz de LED monocromático e um suporte regulável para amostras.

Os ângulo de contato com água MilliQ (18,2 MΩ cm) foram medidos em quatro regiões distintas das placas, usando gotas de água deionizada com volume entre 5 e 10 µL. O método para calcular o ângulo entre a gota e o substrato foi o de Young – Laplace em 30 imagens geradas por medida no software KSV NIMA CAM 200. O ângulo formado entre a linha de base e a tangente calculada com o método anterior é o ângulo de contato.

### 3.5 Quantificação de grupos $\text{COO}^-$ por adsorção de Toluidina

Com o objetivo de quantificar a variação de grupos carboxílicos presentes nas placas poliméricas antes e depois dos tratamentos de superfície, foi empregado o método de adsorção de corantes, que tem por base a atração eletrostática entre suas moléculas e os grupos funcionais alvos. O controle do pH da solução do corante utilizada é de suma importância para a diminuição de erros associados à quantificação. (LI, X. *et al.*, 2006) A medida da densidade de grupos que adsorvem o corante pode ser realizada utilizando um espectrômetro de UV-visível (UV/Vis). (KANG *et al.*, 1993)

Azul de toluidina O ((7-amino-8-methyl- phenothiazin-3-ylidene)- dimethyl-ammonium -  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{S}^+$ , Nuclear, Brasil) é um corante que tem afinidades por radicais sulfatos, ácidos carboxílicos e fosfatos. (SRIDHARAN e SHANKAR, 2012) Neste trabalho, ele foi utilizado para fazer a quantificação de grupos carboxílicos ( $\text{COO}^-$ ) nos diferentes substratos com diferentes tipos e tempo de tratamentos para modificação da superfície. Foi feita previamente uma curva de calibração como um controle da absorção da toluidina com diferentes concentrações entre  $3\mu\text{M}$  e  $0,3\mu\text{M}$ .

Foi adicionada uma solução de toluidina ( $0,5\text{ mM}$ , pH 10) a uma região de  $1\text{ cm}^2$  nas placas poliméricas antes e depois de diferentes tempos de exposição aos tratamentos de superfície, e deixada reagir por 5h à temperatura ambiente. O corante não complexado foi removido com NaOH (Reagen, Brasil)  $0,1\text{mM}$ . Após o tempo de incubação, o corante complexado aos grupos carboxílicos foi dissociado pelo uso de uma solução de ácido acético glacial P.A. ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$  - Dinâmica, Brasil) 50% (v/v). A quantificação da toluidina recuperada foi realizada através da determinação da absorção em  $633\text{ nm}$ , utilizando o espectrômetro de UV/Vis (FEMTO Cirrus 80MB, Brasil). Em seguida, a densidade dos grupos  $\text{COO}^-$  (em moles/  $\text{cm}^2$ ) foi calculada a partir da suposição que o corante complexou mol a mol com grupos carboxílicos. (BAQUEY *et al.*, 1999)

### 3.6 Microscopia de Força Atômica

Quatro placas de PMMA, quatro de PS e quatro de PC foram previamente limpas, seguindo o protocolo de limpeza descrito na subseção 3.1. Duas imagens em

diferentes áreas foram feitas nos polímeros sem tratamento (pristinos), expostos a 60 min a UV/O<sub>3</sub> e exposto por 3 min a Plasma de Argônio.

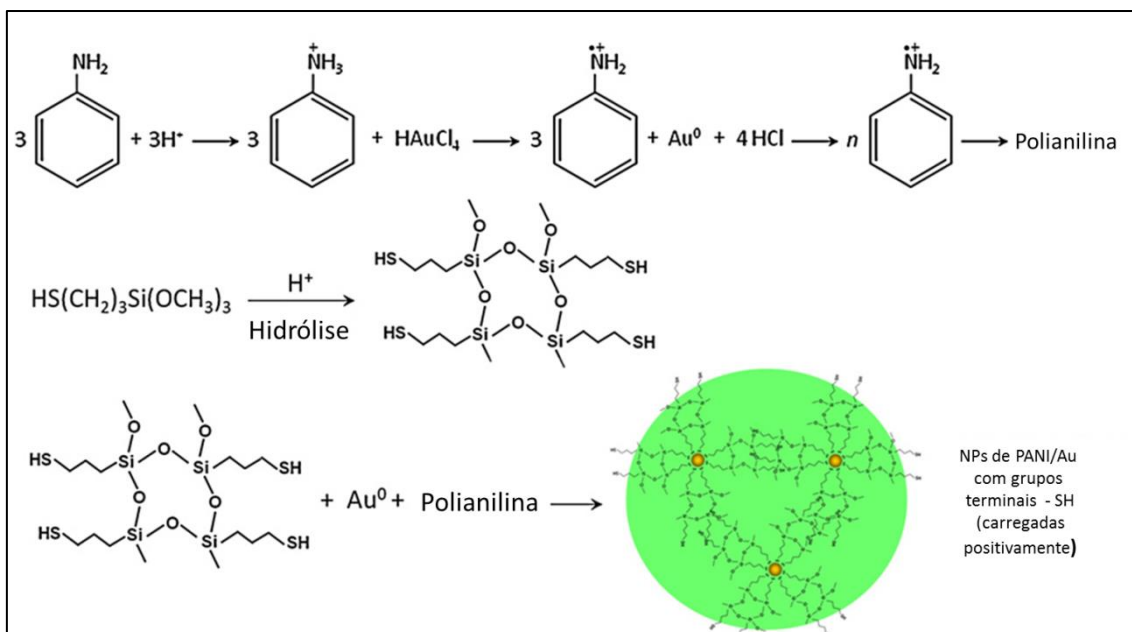
As análises de AFM foram realizadas pelo microscópio de força atômica Pico Scan 2500 (Molecular Imaging, EUA). O cantilever com uma ponta de silicone (PPP-NCHR-50, Nano Sensors,  $F_0 = 330$  Hz, constante nominal da mola =  $42 \text{ N m}^{-1}$ ) foi usado no modo de não-contato em ar à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Imagens com áreas de varredura de  $5 \text{ } \mu\text{m} \times 5 \text{ } \mu\text{m}$ , com uma resolução de  $512 \times 512$  pixels foram obtidas. Para reduzir o erro de observação, para cada amostra foram obtidas pelo menos duas imagens em regiões diferentes nas placas.

### 3.7 Espectroscopia de Fluorescência

As análises de espectroscopia de fluorescência foram realizadas com o uso do espectrofluorímetro (Jobin Yvon Horiba FluoroHub spectrofluorometer, EUA). A fenda usada foi de 1 mm. As amostras foram excitadas em 350 nm e a faixa de emissão de 350 nm a 650 nm, com comprimento de varredura de 1 mm.

### 3.8 Síntese de Nanopartículas de Polianilina/Ouro (PANI/Au)

Anilina P.A. (ANI, C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>N – Nuclear, Brasil), previamente destilada, ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$  – Sigma – Aldrich, USA) e 3-mercaptopropil trimetoxissilano (MPTS, C<sub>6</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>SSi – Sigma – Aldrich, USA) foram acrescentados a 10 mL de etanol P.A. (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O – F. Maia, Brasil) para a obtenção do nanocompósito polianilina e ouro. A solução resultante foi mantida sob agitação magnética com 1100 rpm por 48h à temperatura ambiente. As proporções dos reagentes foram determinadas através de um planejamento fatorial para a otimização da fluorescência das nanopartículas (NPs) de PANI/Au. (SANTOS *et al.*, 2013) A Figura 20 ilustra esta reação.



**Figura 19. Síntese do sistema coloidal de NPs de PANI/Au. Extraída e modificada de NASCIMENTO *et al.* (2011).**

O pH da solução foi ajustado utilizando hidróxido de sódio (NaOH – Reagen, Brasil) e ácido clorídrico (HCl – Quimex, Brasil). Ver patente DE MELO *et al.* (2009).

### 3.9 Preparação do substrato e imobilização do primer

#### 3.9.1 Preparação dos substratos

Para a preparação dos substratos a serem utilizados no teste ELINOR, utilizamos placas poliméricas (ACRISUL, Brasil) com dimensões 76 mm de comprimento, 27 mm de largura e 0,2 mm de espessura e recobertas com uma fita de poliimida, de modo a expor 18 quadrados de 16 mm<sup>2</sup>, espaçados por 3 mm. Adotamos o tratamento por UV/O<sub>3</sub>, para funcionalizar os substratos.

- *Limpeza de lâminas:* As lâminas foram previamente limpas de acordo com a seção 3.1 deste trabalho.

- *Limitação de área de tratamento:* Para o teste ELINOR se fez necessário delimitar a área de teste após a limpeza dos substratos. Para isso eles foram recobertos com uma fita de poliimida (Globaltape, Brasil), colocada de modo a cobrir as regiões onde não deveria ocorrer o tratamento.



- *Modificação da superfície:* As lâminas foram submetidas ao tratamento de ultravioleta e ozônio por 1h na câmara hermeticamente fechada BioForce TipCleaner (BioForce Nanoscience, USA).

- *Remoção da fita:* É necessário que se retire a fita de poliimida após o tratamento de UV/O<sub>3</sub>, o que deixa a área exposta hidrofílica, enquanto a parte que não foi exposta permanece hidrofóbica, limitando assim a área de teste.

- *Funcionalização dos grupos carboxílicos:* A cada quadrado de área de teste foram adicionados 5 µL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida cloridrato (EDC – Sigma – Aldrich, USA) 40 mM e 5 µL de N-Hidroxisuccinimida (NHS – Sigma-Aldrich, USA) 33 mM, ambos diluídos em ácido 2-(N-morfolino) etanesulfônico (MES – Sigma – Aldrich, USA) 0,1 M, pH 6. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1h. Posteriormente, o excesso de solução foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Adaptado de WANG e LI (2007).

### 3.9.2 Imobilização covalente do primer

10µL de um solução 23 ng/µL (contendo  $4 \times 10^{13}$  cadeias de primers) dos primers aminados de *Leishmania infantum* 5′-/5AmMC6/TTA CAC CAA CCC CCA GTT TC-3′ e 5′-/5AmMC6/CAC CTG GCC TAT TTT ACA CCA -3′ (IDT – Integrated DNA Technologies, Brasil), pH 7,2, foram adicionados a cada região funcionalizada com NHS. Os substratos foram incubados à temperatura ambiente por 1h, e em seguida, abundantemente lavados com água deionizada, sendo o excesso retirado com uma pipeta (Figura 21).

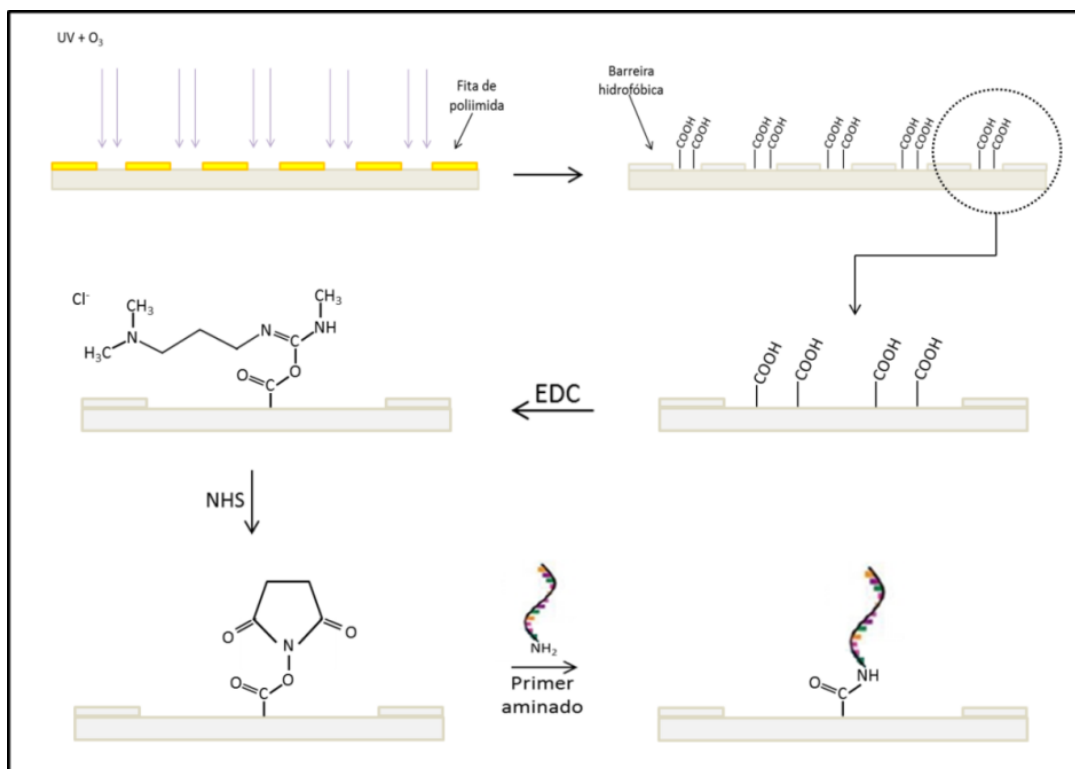


Figura 17. Esquema do tratamento da superfície e ligação covalente do primer em substrato polimérico.

### 3.10 Amplificação de *Leishmania canina*

As amostras genéticas de *Leishmânia canina*, previamente amplificadas e certificadas como positivas ou negativas de acordo com o método de PCR, foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino, do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva – LABBE – UFPE – PE.

Os iniciadores direto e reverso utilizados para a amplificação de um fragmento de 132 pares de bases (pb) de *Leishmania infantum chagasi* foram, respectivamente, Linf.1-23F 5'-TCC CAA ACT TTT CTG GTC CT-3' e Linf.1-154R 5'-TTA CAC CAA CCC CCA GTT TC-3', com temperatura de fusão (*melting*) de 81°C. (DE PAIVA CAVALCANTI *et al.*, 2009) O alvo escolhido para ser amplificado foi a região conservada do DNA cinetoplastidial do complexo *Leishmania donovani*. Previamente foi feita, como controle, uma curva de calibração com sete amostras positivas, com diferentes concentrações entre 1ng a 1fg de *L. infantum* (1ng, 100pg, 10pg, 1pg, 100fg, 10fg, 1fg), para estimar o limite de detecção do sistema. O controle negativo foi feito

sem a presença de DNA de *L. infantum* em meio ao DNA canino, e em duplicata a fim de fornecer confiabilidade à reação.

O equipamento utilizado nas reações foi o ABI PRISM 7500 systems (Applied Biosystems, EUA). O volume final da PCR foi de 50  $\mu$ L, contendo:

- 2  $\mu$ L de DNA com a sequência a ser amplificada
- 21  $\mu$ L de água livre de nuclease (Tipo 1)
- 1  $\mu$ L cada primer (Linf.1-23F e Linf.1-154R) a 3 pmol
- 25  $\mu$ L de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems).

Os passos seguidos para realizar a PCR foram:

- Desnaturação do DNA inicial por 10 min a 95°C;
- Em seguida, a amplificação foi estabelecida por 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 50s e 72°C por 30s.

Os resultados foram analisados pelo software ABI PRISM versão 1.1, de acordo com a curva de amplificação e dissociação.

### 3.11 Teste ELINOR

A desnaturação das soluções de DNA para realização do teste ELINOR foi realizada pelo aquecimento a 94 °C por 3 min. Logo em seguida, foi adicionado 1  $\mu$ L de DNA desnaturado a cada região contendo o primer. A reação de anelamento entre o primer e o DNA alvo deve ocorrer em solução, para que o DNA alvo possa circular por toda a região contendo o primer e aumentar a probabilidade de anelamento com os primers. A reação foi mantida à temperatura ambiente por 30min.

Após esta incubação, os substratos foram lavados abundantemente com água deionizada. Em seguida, eles foram secos com nitrogênio gasoso. Como última etapa, 1  $\mu$ L de nanocompósito PANI/AuNPs foi adicionado a cada área de teste, incubado por 3 min para secar à temperatura ambiente. Em seguida, as áreas foram enxaguadas com etanol 100 % e secas por nitrogênio gasoso por 15 s.

### **3.12 Microscopia de fluorescência**

O microscópio MF500 (HIPOWER, China) com lâmpada de mercúrio foi utilizado nas análises das imagens de microscopia de fluorescência com a magnificação de 10x. O microscópio possui filtros com excitação entre 330 nm e 400 nm, com uma câmera digital (Mshot MC30).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 1

Nesta primeira seção, com o objetivo de selecionar o polímero mais adequado para ser utilizado no teste ELINOR, apresentamos os resultados das caracterizações adotadas para analisar os substratos poliméricos.

### 4.1 Espectroscopia Raman

Polímeros comerciais foram analisados por espectroscopia Raman para confirmar suas identidades (Figura 22). Baseando-se em estudos anteriores (PALM, 1951; STUART, 1996; MATSUSHITA *et al.*, 2000; XIE *et al.*, 2002), foi possível observar que mesmo sendo produtos comerciais, esses plásticos apresentaram um baixo grau de impurezas em suas estruturas.

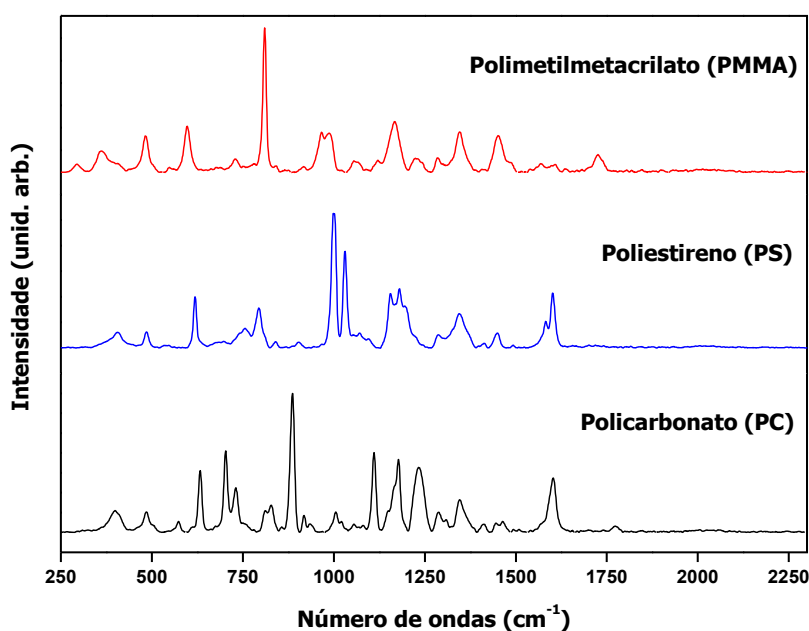


Figura 18. Espectros Raman dos polímeros comerciais.

Pelo espectro Raman do PC, pode-se observar os picos 632, 829 e 1603  $\text{cm}^{-1}$  correspondente à vibração dos anéis fenólicos, e os picos 1110, 1178 e 1233  $\text{cm}^{-1}$  caracterizando o estiramento da ligação C-O-C, e 886  $\text{cm}^{-1}$  assinalando o alongamento

do grupo O-CO-O. (STUART, 1996) Enquanto que o pico que caracteriza do PS se encontra em  $1600\text{ cm}^{-1}$  atribuído ao anel benzeno. (PALM, 1951) E, por fim, as deformações do O-C=O no PMMA são atribuídos pelos picos em  $735\text{ cm}^{-1}$ ,  $597\text{ cm}^{-1}$  e  $559\text{ cm}^{-1}$ , as flexões do grupo metil aparecem nos picos  $1406\text{ cm}^{-1}$  e  $1488\text{ cm}^{-1}$  e as deformações do  $\text{CH}_2$  são atribuídos pelo pico  $1452\text{ cm}^{-1}$ . (MATSUSHITA *et al.*, 2000)

#### 4.2 Modificação de superfície de PMMA, PS e PC por tratamento de UV/O<sub>3</sub> e plasma de Ar

Os ângulos de contato obtidos na interface entre uma gota séssil de água e substratos poliméricos antes e depois de tratamentos de superfície estão relacionados na Figura 23.

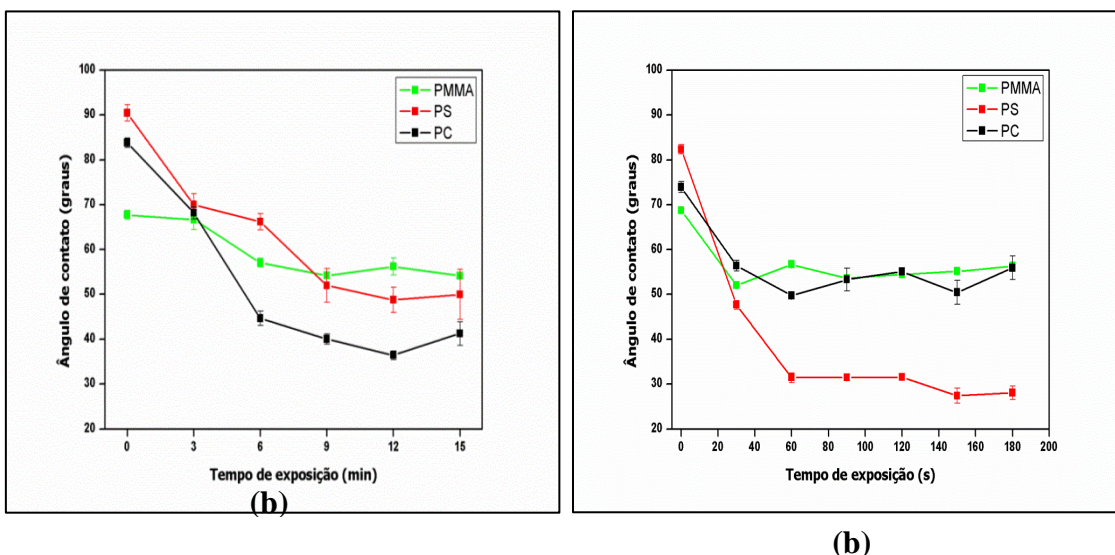


Figura 19. Gráficos da variação do ângulo de contato dos polímeros em relação ao tempo de exposição ao tratamento de (a) UV/Ozônio e (b) plasma de Ar.

As Figuras 23a e 23b mostram uma diminuição no ângulo de contato da superfície dos polímeros, quando suas amostras são submetidas a tratamentos como UV/O<sub>3</sub> ou plasma, confirmando a modificação das superfícies. Isso se deve à criação de grupos funcionais polares, como grupos hidroxilas, carboxílicos, carbonila, entre outros, que fornecem um caráter mais hidrofílico às superfícies poliméricas (antes inertes), melhorando o trabalho de adesão de biomoléculas. (GURUVENKET *et al.*, 2004;

BODAS e GANGAL, 2005; LI, Y. *et al.*, 2006; BHATTACHARYYA e KLAPPERICH, 2007; RIOS *et al.*, 2007; NAGAI *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2011)

O ângulo de contato médio encontrado para o PMMA pristino foi  $68,2^\circ \pm 0,7^\circ$ . Ao passo que após 15 min o tratamento de UV/O<sub>3</sub>, este ângulo diminuiu para  $54,1^\circ \pm 0,5^\circ$ . E com 3 min de tratamento de plasma de argônio, a média do ângulo de contato foi de  $56,3^\circ \pm 0,9^\circ$ . Enquanto que o poliestireno apresentou um ângulo de contato médio de  $86,3^\circ \pm 5,7^\circ$ , antes dos tratamentos e, após as modificações, o PS apresentou  $49,9^\circ \pm 5,6^\circ$  e  $28,0^\circ \pm 1,5^\circ$ , para os tratamentos de UV/O<sub>3</sub> e plasma de argônio, respectivamente. E por fim, o PC apresentou um ângulo de contato inicial de  $78,8^\circ \pm 7,0^\circ$  e após 15 min de tratamento UV/O<sub>3</sub>, o ângulo decresceu para  $41,2^\circ \pm 5,6^\circ$  e  $55,9^\circ \pm 2,6^\circ$ , com plasma de Ar.

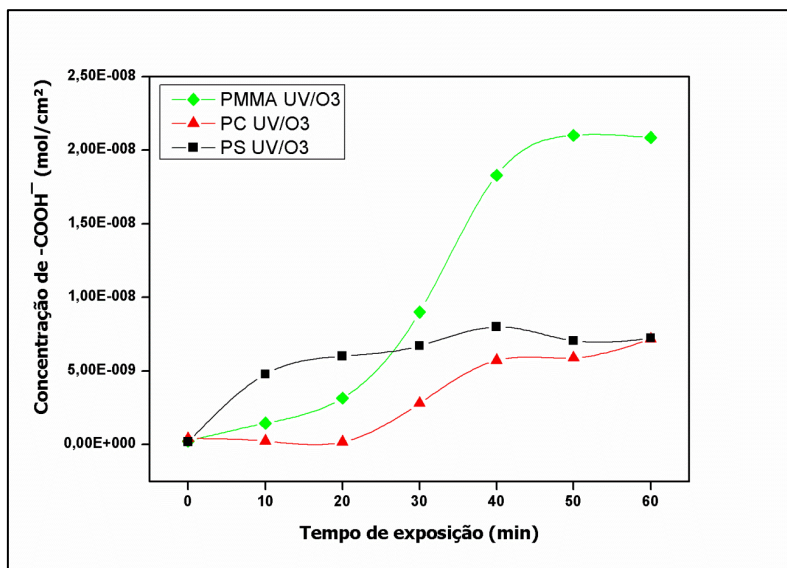
Foi observado que após 20 min de exposição à UV/O<sub>3</sub>, a gota de água se espalhou completamente nas superfícies dos polímeros, impossibilitando a detecção do ângulo de contato pelo equipamento. Apesar dessa superhidrofilicidade, sítios COOH gerados não são suficientes para saturar as superfícies, por isso, é necessário um tempo mais longo de exposição a esse tratamento. (BHATTACHARYYA e KLAPPERICH, 2007)

#### **4.3 Quantificação de grupos COOH por absorção de Toluidina**

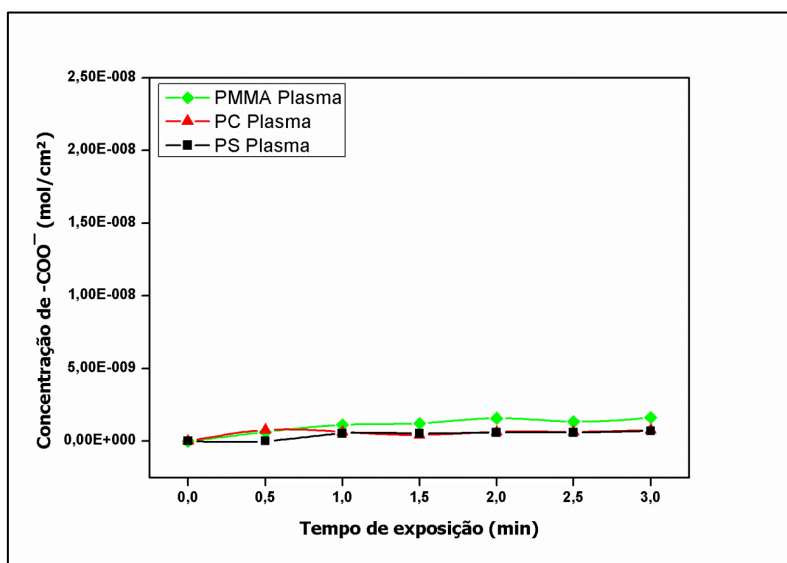
O tratamento por UV/ozônio se mostrou mais eficiente na geração de grupos carboxílicos do que aquele baseado no uso do plasma de argônio. Como pode ser visto na Figura 27a, no PMMA a densidade de – COOH aumenta de  $0,23 \text{ nmol/cm}^2$  para  $21 \text{ nmol/cm}^2$ . Já o PC apresentou uma variação de  $0,41 \text{ nmol/cm}^2$  para  $7,2 \text{ nmol/cm}^2$ . Finalmente, o PS exibiu um comportamento similar ao do PC, em sua superfície pristina, a densidade de grupos carboxílicos era de  $0,17 \text{ nmol/cm}^2$ , e após 60 min de tratamento a densidade aumentou para  $7,22 \text{ nmol/cm}^2$ .

Os valores obtidos neste trabalho se mostraram relativamente maiores dos que encontrados na literatura. Em seus experimentos, WEI *et al.* (2005) e MCCARLEY *et al.* (2004) encontraram densidades de COOH próximas de  $1,4 \text{ nmol/cm}^2$  após 60 min tratamento de UV/O<sub>3</sub>, enquanto que para o PC, as densidades reportadas por Li *et al.*

(2006) e McCarley *et al.* (2004) foram, respectivamente, 0,48 nmol/cm<sup>2</sup> e 0,25 nmol/cm<sup>2</sup>.



(a)



(b)

Figura 23. Evolução da criação de grupos carboxílicos em relação ao tempo de exposição ao tratamento de (a) UV/Ozônio e (b) plasma de Ar nos polímeros.

Plasma de gases monoatômicos, como o O<sub>2</sub>, por meio de ablação e degradação devido à presença de átomos de oxigênio, podem criar diversas espécies reativas (átomos, moléculas neutras, radicais livres no estado fundamental e excitados, íons positivos e negativos, radicais metaestáveis) em superfícies poliméricas. Para diminuir a



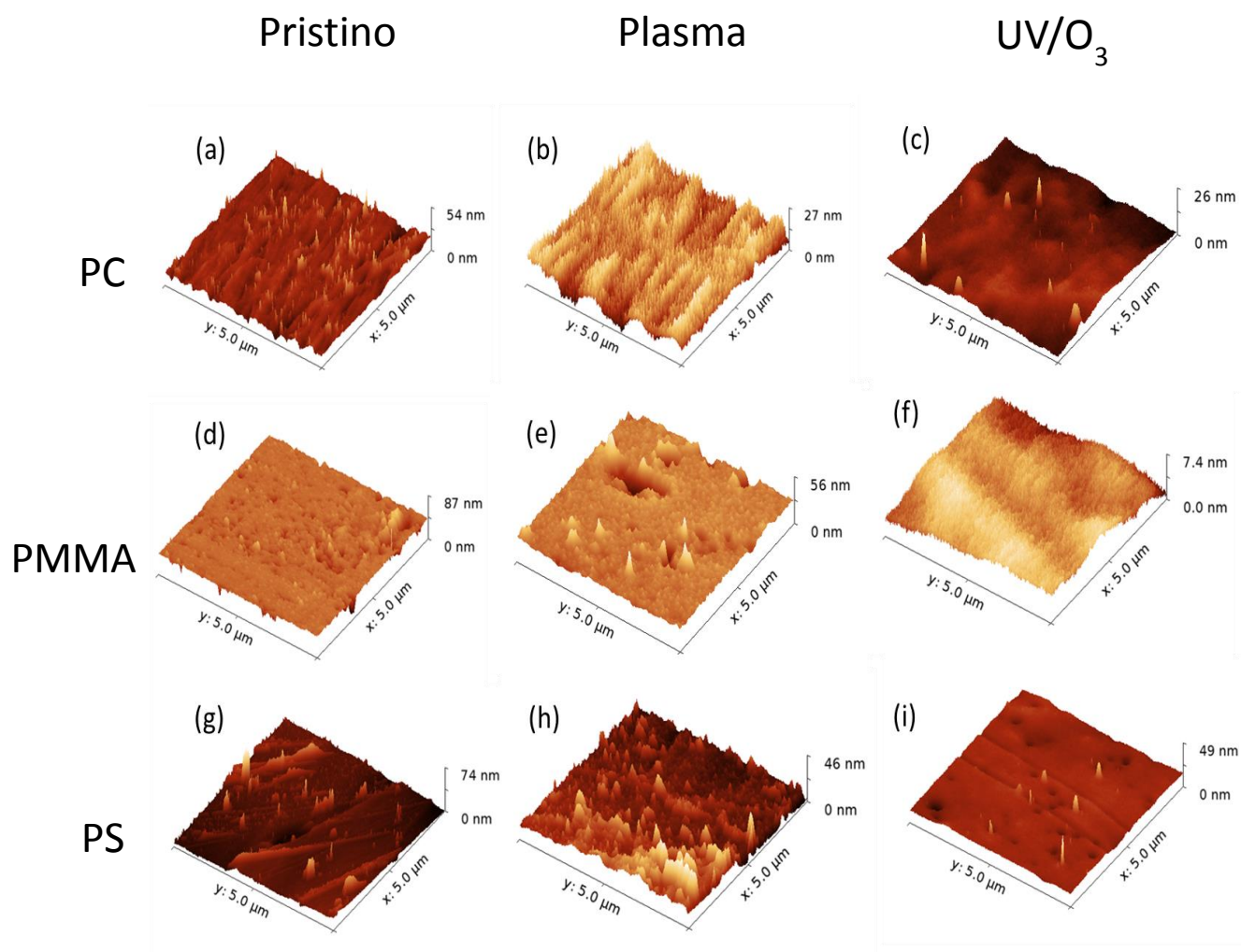
complexidade na interação polímero-plasma, reduzindo assim o número de diferentes espécies, foi utilizado neste trabalho plasma de gás inerte. O gás utilizado neste trabalho foi o de argônio. O plasma de Ar, que exibe um brilho roxo, interage com materiais orgânicos unicamente por meio de transferência de energia de íons, moléculas metaestáveis e radiação UV. (FRANCE e SHORT, 1994) Sendo assim, esses fatos podem explicar as baixas densidades de grupos carboxílicos presentes nas superfícies do PMMA, PS e PC (Figura 27b).

De acordo com esses dados, a quantificação de COOH foi coerente com os resultados de ATR-FTIR descrito anteriormente. Dentre os polímeros analisados, o PMMA tratado por 60 min com UV/ozônio apresentou um número maior de grupos carboxílicos, que as amostras do PC e PS.

#### **4.4 Análise da topografia de superfície dos polímeros antes e depois dos tratamentos utilizando AFM**

Estudos comprovam que a capacidade de adesão de biomoléculas (primers, bactérias, proteínas) é significativamente alterada com o aumento de rugosidade, molhabilidade, curvatura, composição química, carga e geometria da superfície. (MARIE *et al.*, 2006; GRENHÖ, 2010; PONCIN-EPAILLARD *et al.*, 2012) Tratamentos de plasma e UV/O<sub>3</sub> podem fornecer nanoestruturas rugosas a superfícies poliméricas, aumentando assim, a área superficial acessível à imobilização dos primers, por exemplo. (BHATTACHARYYA e KLAPPERICH, 2007; TSOUGENI *et al.*, 2012)

As micrografias de AFM dos polímeros PMMA, PC e PS foram obtidas de modo a nos permitir acompanhar a mudança de morfologia das superfícies poliméricas antes e depois dos tratamentos de modificação por UV/O<sub>3</sub> e por plasma de Ar. Podemos observar na Figura 28 que houve uma mudança mais significativa nas superfícies do PC e PS após elas serem submetidas a 3 min de plasma de Ar, e que o mesmo não aconteceu para o PMMA. No entanto, para 60 min de tratamento de UV/O<sub>3</sub>, apenas o PMMA exibiu um aumento na área superficial, similarmente às estruturas do PC e PS modificados com Plasma.



**Figura 24.** Imagens topográficas de AFM das superfícies de (a) PMMA pristino; (b) PMMA tratado com plasma por 3min; (c) PMMA tratado com 1 h por UV/O<sub>3</sub>; (d) PC pristino; (e) PC tratado com plasma por 3min; (f) PC tratado com 1 h por UV/O<sub>3</sub>; (g) PS pristino; (h) PS tratado com plasma por 3min; (i) PS tratado com 1 h por UV/O<sub>3</sub>. Todas as varreduras foram variadas de 5 μm x 5 μm com resolução de 512 x 512 pixels.

#### 4.5 Cinética da autofluorescência dos polímeros analisada por espectroscopia de fluorescência

É conhecido que quando submetidos à radiação UV (< 400 nm), azul (400 – 500 nm) e verde (500 – 550 nm), polímeros podem apresentar a autofluorescência. A natureza desse fenômeno pode se dever emissão natural de luz pelo polímero, ou à presença de produtos aditivos (ou seja, pela introdução de algumas espécies

fluorescentes), impurezas ou até mesmo degradação devido à foto-oxidação. (HAWKINS e YAGER, 2003; PIRUSKA *et al.*, 2005; THOMPSON, 2005; LIU *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2010)

Por utilizar baixo volume de amostra e baixa concentração de marcadores, muitos métodos de detecção baseados em fluorescência, e que utilizam polímeros como substrato, necessitam de precisão ao detectar os pequenos sinais luminosos formados. Às vezes, é necessário que esses polímeros sejam expostos à radiação luminosa por longos tempos, resultando no aumento na intensidade de fluorescência, que pode atrapalhar, ou até mesmo sobrepor os sinais fluorescentes específicos desejados. (PIRUSKA *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2010; LE *et al.*, 2012)

Como nosso objetivo era utilizar um substrato polimérico como plataforma para o teste ELINOR, que utiliza um nanocompósito PANI/AuNPs como marcador fluorescente com máxima intensidade de emissão de fluorescência em 480 nm, foi necessário verificar qual dos polímeros expostos a longos períodos aos tratamentos de UV/O<sub>3</sub> e plasma, mostrava menor intensidade de autofluorescência, de modo a não atrapalhar ou inibir o sinal fluorescente emitido em 480 nm pelas PANI/AuNPs, .

A Figura 29 mostra a evolução da autofluorescência dos plásticos tratados por UV/O<sub>3</sub> e por plasma de argônio em 480 nm. É possível observar que o PS exibiu maior intensidade de fluorescência com a variação no tempo de exposição tanto para o tratamento de UV/O<sub>3</sub> quanto para o de plasma, em relação ao PMMA e PC, que tiveram suas intensidades equiparáveis. O que está de acordo com NURMUKHAMETOV *et al.* (2006) e SHADPOUR *et al.* (2006), que observaram que a maior intensidade de fluorescência ocorre em polímeros que possuem em sua estrutura aromáticas e ligações duplas conjugadas, em comparação com aqueles que não possuem essas estruturas. Essa fluorescência ocorre devido à absorção de radiação ultravioleta ou visível, levando à formação de ligações  $\pi$  conjugadas; no caso do poliestireno essas ligações podem ser formadas, também, por tratamento térmico. (NURMUKHAMETOV *et al.*, 2006; SHADPOUR *et al.*, 2006)

A fotodegradação do PC ocorre em dois processos: rearranjo da estrutura e fotoxidação. O rearranjo acontece quando o PC é exposto à radiação ultravioleta com comprimentos de onda abaixo de 300 nm e a fotoxidação ocorre com comprimentos de onda maiores, acima de 340 nm. Esses processos podem ocorrer simultaneamente, e

podem resultar na formação de grupos hidroxilas, carboxílicos, dihidroxibifenilo, ésteres aromáticos e derivados fenólicos, (RIVATON *et al.*, 2002; ASLAN *et al.*, 2006; DIEPENS e GIJSMAN, 2007; WANG e LI, 2007; YAZDAN MEHR *et al.*, 2013), o que pode explicar a pouca variação na autofluorescência do PC, mesmo esse polímero possuindo grupos aromáticos em sua estrutura. Enquanto que a fluorescência natural das placas de PMMA pode ser devido a aditivos e impurezas adicionados no momento de fabricação. E, após o tratamento de UV/O<sub>3</sub>, sua autofluorescência é comparável à fluorescência do policarbonato. (BAI *et al.*, 2006; LLOPIS *et al.*, 2007; BALDINI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010)

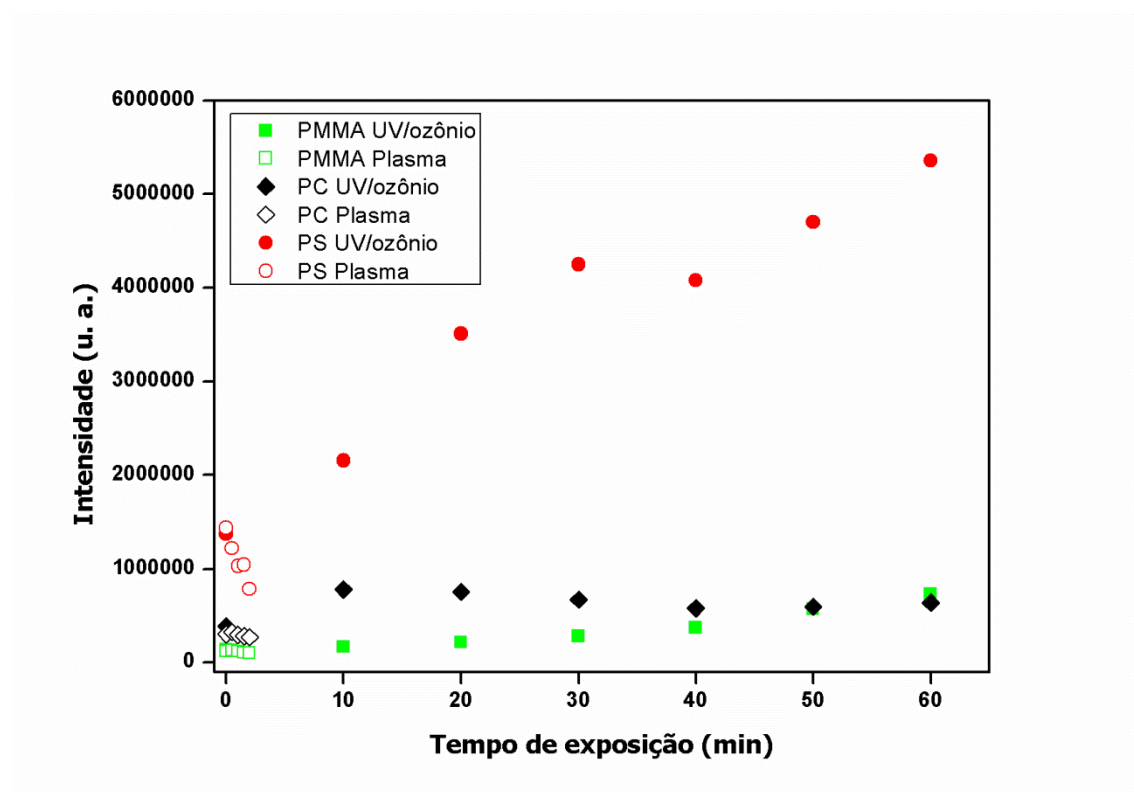


Figura 25. Evolução de fluorescência dos polímeros quando excitados em 480nm.

Foi observado que embora o método de modificação por UV/O<sub>3</sub> possa aumentar a autofluorescência dos polímeros, ele é o método mais eficaz na formação de grupos carboxílicos. Com isso, dentre os polímeros estudados, os que exibiram mais baixa fluorescência durante longa exposição à UV/ozônio foram o PC e PMMA. Como a densidade de ácidos carboxílicos obtida na superfície do PMMA foi muito maior do que para o PC, concluímos então que este polímero é o mais adequado para ser utilizado no teste ELINOR.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO – PARTE 2

Nesta seção, inicialmente serão apresentados os resultados da síntese e caracterização do compósito de polianilina e nanopartículas de ouro, seguidos pelos resultados e discussão do teste ELINOR em substratos de PMMA.

### 4.6 Compósito híbrido de Polianilina/ nanopartículas de ouro (PANI/AuNPs)

O compósito híbrido de PANI/AuNPs foi sintetizado e caracterizado de acordo com SANTOS *et al.* (2013). A comprovação da formação das NPs foi realizada pela análise de espectrofotometria UV/Vis, que comparou os espectros da PANI, das AuNPs e das PANI/AuNPs, separadamente. Foi observada a formação das bandas pólaron da PANI e da absorção do plasmon das AuNPs, em 424 nm e 556 nm, respectivamente. Já a oxidação da anilina foi comprovada pelas medidas de FTIR, que confirmam a oxidação da anilina na presença do ouro. Além disso, foi feita análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão, que determinou o tamanho de partícula que se encontrava entre 2-3 nm.

SANTOS *et al.* (2013) também estudaram a fluorescência do compósito, que apresentava emissão de fluorescência em uma larga faixa do espectro (região do azul ao verde) com maior intensidade em 480 nm, obtida quando o nanocompósito era excitado em 380 nm. Esta fluorescência se dá pela presença de unidades benzenóides, estruturas fotoluminescentes, na estrutura da PANI. Quando o pH é diminuído, a estrutura da PANI é protonada e passa a ser esmeraldina condutora.

### 4.7 Teste ELINOR

Na primeira parte da seção de Resultados e Discussão foram apresentadas as caracterizações realizadas para amostras de PMMA, PC e PS, a fim de determinar o plástico mais adequado para ser utilizado no teste ELINOR. Concluímos que o polímero mais apropriado foi o PMMA tratado por UV/O<sub>3</sub>. Com isso, a metodologia da Seção

3.10 foi adotada, para a preparação de substratos a serem usados nos testes ELINOR para a detecção de *L. infantum* em cães, o que foi feito em dois conjuntos de testes. No primeiro, foram realizados testes para 35 amostras de 40 ng/μL de DNA total (DNA de cão e DNA de *L. infantum*), das quais 19 delas eram sabidamente positivas e 16 negativas, segundo os resultados da PCR. Já no segundo conjunto, foram utilizadas 24 amostras, sendo 12 positivas e 12 negativas.

**Tabela 2. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para amostras de *L. infantum*.**

<i>Leishmania infantum</i>			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	16	7	23
NEGATIVO	3	9	12
Total (PCR)	19	16	35

Sensibilidade = 84%  
Especificidade = 56%  
Acurácia = 71%

**Tabela 3. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para duplicatas das amostras de *L. infantum*.**

<i>Leishmania infantum</i> (Duplicatas)			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	15	5	20
NEGATIVO	4	11	15
Total (PCR)	19	16	35

Sensibilidade = 79%  
Especificidade = 69%  
Acurácia = 74%

**Tabela 4. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para triplicatas das amostras de *L. infantum*.**

<i>Leishmania infantum</i> (Triplicatas)			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	15	9	24
NEGATIVO	4	7	11
Total (PCR)	19	16	35

Sensibilidade = 79%  
Especificidade = 43%  
Acurácia = 63%

As tabelas 2, 3 e 4 mostram que a sensibilidade do teste ELINOR para detectar os indivíduos realmente doentes foi de 80%, ou seja, das amostras verdadeiramente positivas ditas pela PCR, o teste conseguiu detectar, em média, 15 das 19 amostras. Já para a especificidade (a capacidade do teste detectar os indivíduos realmente não infectados) o resultado foi de 56%, ou seja, o teste ELINOR conseguiu detectar, em média, 9 amostras negativas dentre as 16 amostras identificadas como negativas por PCR. Com isso, a acurácia para esse primeiro conjunto de testes foi de 69%.

O segundo conjunto de resultados foi complementado pela necessidade de verificar se o número de falsos positivos decresceria com o aperfeiçoamento de alguns parâmetros de preparação como, por exemplo, diminuindo o número de testes por lâmina de PMMA, assim como modificando a etapa de lavagem para evitar contaminação cruzada entre as áreas de teste. Para esta repetição foram utilizadas 24 amostras, sendo 12 realmente positivas e 12 realmente negativas, amplificadas pela PCR.

**Tabela 5. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para amostras de *L. infantum*.**

2º Conjunto – <i>Leishmania infantum</i>			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	12	9	21
NEGATIVO	0	3	3
Total (PCR)	12	12	24

Sensibilidade = 100%

Especificidade = 25%

Acurácia = 62%

**Tabela 6. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para duplicatas das amostras de *L. infantum*.**

2º Conjunto – <i>Leishmania infantum</i> (Duplicatas)			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	12	9	21
NEGATIVO	0	3	3
Total (PCR)	12	12	24

Sensibilidade = 100%

Especificidade = 25%

Acurácia = 62%

**Tabela 7. Tabela de contingência mostrando a comparação entre o teste ELINOR com os do padrão-ouro (PCR) para triplicatas das amostras de *L. infantum*.**

2º Conjunto – <i>Leishmania infantum</i> (Triplicatas)			
Resultado	Presente	Ausente	Total
POSITIVO	10	10	20
NEGATIVO	2	2	4
Total	12	12	24

Sensibilidade = 83%  
Especificidade = 17%  
Acurácia = 50%

Apesar de termos controlado os parâmetros de execução, os resultados do segundo conjunto de amostra, mostrados nas tabelas 4, 5 e 6, mostram um número maior de testes com respostas falso-positivas. A sensibilidade obtida aumentou para 94,3%, uma detecção média de 11 amostras realmente positivas de um total de 12 amostras. No entanto, houve uma queda na porcentagem da especificidade, diminuindo para 22%, ou seja, o teste ELINOR conseguiu detectar, aproximadamente, 3 amostras não infectadas pela *L. infantum* entre 12 amostras realmente negativas, com acurácia de 58%.

A média obtida para a sensibilidade do primeiro e segundo conjunto de testes foi de 87,15%, enquanto a especificidade foi de 39%. Duas possíveis razões podem ser a causa do alto número de testes falsos positivos. A primeira pode ser decorrente da fixação do nanocompósito nas nanoestruturas superficiais formadas durante o tratamento por UV/ozônio, mostradas nas imagens de AFM na seção 4.5, o que simularia a fixação do nanocompósito nos primers. Como outra possibilidade, grupos  $COO^-$  não complexados com os primers podem interagir eletrostaticamente com as nanopartículas catiônicas que restaram após processo de lavagem. Não encontramos solução satisfatória para esses problemas, mas uma possível solução para o problema do sítios  $COO^-$  seria diminuir a área de teste, e assim diminuir a probabilidade de haver grupos carboxílicos não ocupados por primers.

Atualmente, a detecção de leishmaniose visceral é realizada por exames parasitológicos, sorológicos e moleculares, além do diagnóstico clínico. DOURADO *et al.* (2007) compararam a eficiência de testes sorológicos, como RIFI e ELISA, para detectar leishmaniose visceral em cinco países, Índia, Nepal, Alemanha, Sudão e Brasil.



Foi observado que a sensibilidade apresentou uma variação de 67 a 100% e os valores de especificidade variando entre 95 e 100%.

MOREIRA *et al.* (2007) realizaram um estudo comparativo entre métodos de diagnósticos parasitológicos, sorológicos e moleculares utilizados na detecção de *L. infantum chagasi* no estado de São Paulo. Para os exames parasitológicos, como o citológico, foram obtidas sensibilidades entre 32 a 100%, enquanto que para os testes sorológicos ELISA, IFD e ICQ apresentaram sensibilidades de 60 a 100%. A estatística obtida para o teste molecular PCR, mais caro e trabalhoso, se mostrou a mais eficiente, exibindo sensibilidade entre 95 e 100%. Para todos esses ensaios uma especificidade de 100% foi encontrada.

Em seu trabalho de doutorado, SANTOS (2013) realizou uma estatística para o teste ELINOR em feito em substratos de vidro, no Laboratório de Polímeros Não Convencionais, para detectar *L. infantum chagasi*, a qual resultou em uma sensibilidade de 88,3% e especificidade de 71,3%.

Observa-se que a sensibilidade obtida no teste ELINOR realizado em substrato plástico está na média quando comparada com os valores obtidos pelos autores citados acima. Testes como o ELINOR no estágio atual, assim como testes sorológicos, podem ser utilizados quando é preciso ter certeza de um resultado negativo. E comumente, testes com alta sensibilidade e baixa especificidade são utilizados em triagens, selecionando os indivíduos para realizar uma técnica comprobatória como a PCR. Esforços estão sendo feitos para melhorar o desempenho do teste ELINOR de modo a utilizá-lo um teste mais específico, baixo custo e fácil realização.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

As amostras de polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS) e policarbonato (PC) foram primeiramente identificadas por medidas de espectroscopia Raman. Os tratamentos de modificação de superfícies (UV/O<sub>3</sub> e plasma) se mostraram eficazes, pois diminuíram o ângulo de contato dos polímeros, que passaram a exibir superfícies hidrofílicas após o tratamento. Após essas modificações, foi determinada a quantidade molar de grupos carboxílicos, pela quantificação do número de moléculas do corante toluidina que foram adsorvidas por eles. Foi mostrado que o PMMA tratado por UV/O<sub>3</sub> exibiu a formação de 21 nmol de COO<sup>-</sup> por cm<sup>2</sup>, um número maior que os valores encontrados na literatura. Além disso, amostras de PMMA submetidas a tratamento de ultravioleta mostraram uma topografia favorável à imobilização de moléculas biológicas, assim como as dos três polímeros modificados por plasma de Ar. As autofluorescências do PC e PMMA são comparavelmente baixas em relação à do PS, quando expostos a longos tempos à UV/O<sub>3</sub>. Já com o tratamento de plasma de Ar, os polímeros não exibem mudanças significativas em suas fluorescências. Desta forma, chegamos à conclusão que o PMMA tratado por UV/O<sub>3</sub> é o mais adequado substrato para ser integrado ao teste ELINOR, pois ele apresenta maior formação de grupos carboxílicos, topografia adequada para imobilizar os primers e, além disso, sua autofluorescência é baixa.

Com isso, as PMMA tratadas por UV/O<sub>3</sub> foram usadas para realização do teste ELINOR para detectar a presença de *L. infantum* em amostras de cães infectados e saudáveis, utilizando o nanocompósito fluorescente e catiônico (PANI/AuNPs) como um marcador. Os resultados revelam que o teste teve 87,15% de sensibilidade e 39% de especificidade. As expectativas eram que os testes realizados em plásticos forneceria uma estatística mais robusta que o teste ELINOR tradicional feito em vidro. Na realidade, porém, encontramos um alto número de testes falsos positivos, o que diminuiu substancialmente sua especificidade, que pode ter ocorrido devido às interações entre os grupos carboxílicos e as nanopartículas catiônicas que não foram retiradas no processo de lavagem. No entanto, acreditamos que esse problema pode ser solucionado reduzindo a área de teste, de modo a diminuir a probabilidade de haver sítios carboxílicos não ocupados por primers.

Deve ser notado, porém, que um teste com alta sensibilidade apresenta poucos falsos negativos, sendo útil para ser usado quando é necessário ter certeza de um resultado negativo. De fato, teste com alta sensibilidade pode ser usado para que se elimine a consideração de outras doenças na fase inicial do diagnóstico ou quando o ônus da falta de diagnóstico é alto (como no rastreamento e seleção de doadores de sangue).

## REFERÊNCIAS

ADHIKARI, B.; MAJUMDAR, S. Polymers in sensor applications. **Progress in Polymer Science**, v. 29, n. 7, p. 699-766, 2004.

AMER, M. S. **Raman Spectroscopy for Soft Matter Applications**. Wiley, 2009.

ANAND, P. B.; JAYALEKSHMI, S. Observation of switching between SA and RSA in silver/gold polyaniline nanocomposite films. 2013, Year. p.88092B-88092B-6.

ANTONY, L. Rayleigh scattering: blue sky thinking for future CMB observations. **Journal of Cosmology and Astroparticle Physics**, v. 2013, n. 08, p. 053, 2013.

ARAGON, D. C. **Avaliação de métodos estatísticos aplicados ao estudo de testes diagnósticos na presença do viés de verificação**. . 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

ARAUJO, W. S. et al. Undoped polyaniline anticorrosive properties. **Electrochimica Acta**, v. 46, n. 9, p. 1307-1312, 2001.

ASLAN, K.; HOLLEY, P.; GEDDES, C. D. Metal-enhanced fluorescence from silver nanoparticle-deposited polycarbonate substrates. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 27, p. 2846-2852, 2006.

ATDBIO. ATDBio. 2014. Disponível em: < <http://goo.gl/xKQ9z3> >.

AZZAZY, H. M. E.; MANSOUR, M. M. H. In vitro diagnostic prospects of nanoparticles. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1-2, p. 1-8, 2009.

BACKER, H. D. Ozone, UV and Aerosol Studies. 2014. Disponível em: < <http://goo.gl/XmpQUh> >.

BAETA, D. A. et al. The use of styrene-butadiene rubber waste as a potential filler in nitrile rubber: order of addition and size of waste particles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 23-31, 2009.

BAI, Y. et al. Surface Modification for Enhancing Antibody Binding on Polymer-Based Microfluidic Device for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Langmuir**, v. 22, n. 22, p. 9458-9467, 2006.

BALDINI, F. et al. An optical PMMA biochip based on fluorescence anisotropy: Application to C-reactive protein assay. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 139, n. 1, p. 64-68, 2009.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis - part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BAQUEY, C. et al. Plasma treatment of expanded PTFE offers a way to a biofunctionalization of its surface. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 151, n. 1-4, p. 255-262, 1999.

BARCELLOS, C. et al. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 18, n. 3, p. 285-304, 2009.

BEHERA, S. et al. UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation. **J Anal Bioanal Techniques**, v. 3, n. 6, p. 1-6, 2012.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Sexta edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan LTDA, 2010.

BHADRA, S. et al. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 8, p. 783-810, 2009.

BHAGYASHREE, P. et al. ATTENUATED TOTAL REFLECTANCE SPECTROSCOPY- AN OVERVIEW **International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences**, v. 3, n. 2, p. 315-321, 2013.

BHATTACHARYYA, A.; KLAPPERICH, C. M. Mechanical and chemical analysis of plasma and ultraviolet-ozone surface treatments for thermal bonding of polymeric microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 7, p. 876-882, 2007.

BHUSHAN, B.; MARTI, O. Scanning Probe Microscopy – Principle of Operation, Instrumentation, and Probes. In: BHUSHAN, B. (Ed.). **Springer Handbook of Nanotechnology**: Springer Berlin Heidelberg, 2004. cap. 11, p.325-369.

BODAS, D. S.; GANGAL, S. A. Structural characterization of sputtered PMMA in argon plasma. **Materials Letters**, v. 59, n. 23, p. 2903-2907, 2005.

BRACCO, G.; HOLST, B. **Surface Science Techniques**. Springer, 2013.

BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 18, n. 10, p. 309-315, 1985.

BUTT, H.-J.; CAPPELLA, B.; KAPPL, M. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. **Surface Science Reports**, v. 59, n. 1–6, p. 1-152, 2005.

CAM-200, M. **CAM-200 Optical Contact Angle Meter, Instruction Manual**, KVS Instruments LTD, Finland: 121 p. 2001.

CARNEIRO, A. V. **Princípios de Selecção e Uso de Testes Diagnósticos: Propriedades Intrínsecas dos Testes**. Rev Port Cardiol. Lisboa: Elsevier. 20: 1267-1274 p. 2001.

CAVALCANTI, M. D. P. **DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**. 2008. Tese de Doutorado (Doutorado). Saúde Pública, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife - PE.

CDC, C. F. D. C. A. P.-. **Principles of Epidemiology in Public Health Practice: An Introduction to Applied Epidemiology and Biostatistics** Atlanta, GA - USA: U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service 2006.

CHAN, W. C. W.; NIE, S. Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2016-2018, 1998.

CHU, P. K. et al. Plasma-surface modification of biomaterials. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 36, n. 5–6, p. 143-206, 2002.

CIRIC-MARJANOVIC, G. Polyaniline Nanostructures. In: EFTEKHARI, A. (Ed.). **Nanostructured Conductive Polymer**. United Kingdom: Wiley, 2010.

CLARK, T. et al. A New Application of UV–Ozone Treatment in the Preparation of Substrate-Supported, Mesoporous Thin Films. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 12, p. 3879-3884, 2000.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to infrared and Raman spectroscopy**. 2nd. New York: Academic, 1975.

CROWLEY, K. et al. Printing polyaniline for sensor applications. **Chemical Papers**, v. 67, n. 8, p. 771-780, 2013.

CUATRECASAS, P.; PARIKH, I. Adsorbents for affinity chromatography. Use of N-hydroxysuccinimide esters of agarose. **Biochemistry**, v. 11, n. 12, p. 2291-2299, 1972.

DAI, L. **Intelligent Macromolecules for Smart Devices: From Materials Synthesis to Device Applications**. U.S. Government Printing Office, 2004.

DANTAS TORRES, F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 117-118, 2006.

DE MELO, C. P.; ANDRADE, C. A. S.; DOS SANTOS, C. G. **Compósitos de nanopartículas fluorescentes em Si, processo para a preparação dos mesmos, e uso em sistemas de diagnóstico rápido com afinidade a moléculas biológicas**. Brasil: INPI. PI0805991-8A2 2008.

DE MELO, C. P.; ANDRADE, C. A. S.; DOS SANTOS, C. G. **Fluorescent nanoparticle composites themselves, process for the preparation of such composites, and use in rapid diagnosis systems with affinity to biological molecules**: WIPO 2009.

DE OLIVEIRA, H. P.; ANDRADE, C. A. S.; DE MELO, C. P. Electrical impedance spectroscopy investigation of surfactant–magnetite–polypyrrole particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 319, n. 2, p. 441-449, 2008.

DE PAIVA CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of Leishmania infantum DNA in canine blood. **The Veterinary Journal**, v. 182, n. 2, p. 356-358, 2009.

DE SOUZA, J. E. G. et al. Polypyrrole based aroma sensor. **Synthetic Metals**, v. 102, n. 1–3, p. 1296-1299, 1999.

DE SOUZA, V. H. R.; OLIVEIRA, M. M.; ZARBIN, A. J. G. Thin and flexible all-solid supercapacitor prepared from novel single wall carbon nanotubes/polyaniline thin films obtained in liquid–liquid interfaces. **Journal of Power Sources**, v. 260, n. 0, p. 34-42, 2014.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DHAWAN, S. K. et al. Application of conducting polyaniline as sensor material for ammonia. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 40, n. 2–3, p. 99-103, 1997.

DIEPENS, M.; GIJSMAN, P. Photodegradation of bisphenol A polycarbonate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 3, p. 397-406, 2007.

DIPPEL, B. Raman.de. 2011. Disponível em: < <http://goo.gl/K1jeSX> >.

DOAN, T. C. D. et al. Intrinsic and Ionic Conduction in Humidity-Sensitive Sulfonated Polyaniline. **Electrochimica Acta**, v. 127, n. 0, p. 106-114, 2014.

DOKTYCZ, M. J. Nucleic Acids: Thermal Stability and Denaturation. In: (Ed.). **eLS**: John Wiley & Sons, Ltd, 2001.

DOLE, M. N. et al. ADVANCE APPLICATIONS OF FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 7, n. 2, p. 159-166, 2011.

DONALDSON, K.; STONE, V. Nanoscience fact versus fiction. **Commun. ACM**, v. 47, n. 11, p. 113-115, 2004.

DOURADO, Z. F. et al. PANORAMA HISTÓRICO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL ATÉ O SURGIMENTO DOS TESTES IMUNOCROMATOGRAFICOS (rK39). **REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL**, v. 36, n. 3, p. 205-214, 2007.



DRELICH, J. et al. Hydrophilic and superhydrophilic surfaces and materials. **Soft Matter**, v. 7, n. 21, p. 9804-9828, 2011.

DUFRÊNE, Y. F. Atomic Force Microscopy, a Powerful Tool in Microbiology. **Journal of Bacteriology** v. 184, n. 19, p. 5205-5213, 2002.

FAHRENFORT, J. Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infrared reflection spectra of organic compounds. **Spectrochimica Acta**, v. 17, n. 7, p. 698-709, 1961.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. D. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, p. 47-57, 2012.

FIOCRUZ, A. Leishmaniose. Brasil, p. É uma página da web criada pela Fundação Oswaldo Cruz que é destinada a promover a saúde e o desenvolvimento social, gerar e difundir conhecimento científico e tecnológico., 2013. Disponível em: < <http://www.agencia.fiocruz.br/leishmaniose> >. Acesso em: 04 de março.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W. **Epidemiologia Clínica: Elementos Essenciais**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 288.

FLORES, R. E. **A Medicina Baseada em Evidências e o Diagnóstico Laboratorial**. NewsLab: Editora Eskalab LTDA: 92-103 p. 2005.

FRANCE, R. M.; SHORT, R. D. Plasma treatment of polymers: effects of energy transfer from an argon plasma and post-plasma storage on the surface chemistry of polystyrene. **Polymer Degradation and Stability**, v. 45, n. 3, p. 339-346, 1994.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, n. 0, p. 11-19, 2012.

GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. **Progress in Polymer Science**, v. 32, n. 7, p. 698-725, 2007.

GOMES, A. H. S. et al. PCR identification of Leishmania in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144 n. 234-241, 2007

GRENHO, L. D. C. S. **Estudo da Adesão Bacteriana a Biomateriais Nanofásicos**. 2010. (Mestre). Microbiologia, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUPTA, A. K.; SAH, G. K. MISCIBILITY STUDIES OF PC/PMMA BLENDS IN TETRAHYDROFURAN BY VISCOMETRY, FTIR AND SEM ANALYSIS. **NANOSYSTEMS: PHYSICS, CHEMISTRY, MATHEMATICS**, v. 4, n. 5, p. 670-679, 2013.

GURUVENKET, S. et al. Plasma surface modification of polystyrene and polyethylene. **Applied Surface Science**, v. 236, n. 1–4, p. 278-284, 2004.

HADINOTO, K.; SUNDARESAN, A.; CHEOW, W. S. Lipid–polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, Part A, p. 427-443, 2013.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229-243, 2001.

HAO, Y. et al. Construction of highly ordered polyaniline nanowires and their applications in DNA sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 52, n. 0, p. 422-426, 2014.

HARRICK-PLASMA. **PLASMA CLEANER USER'S MANUAL FOR THE EXPANDED PLASMA CLEANER PDC-002 (230V)**. USA 2006.

HAWKINS, K. R.; YAGER, P. Nonlinear decrease of background fluorescence in polymer thin-films - a survey of materials and how they can complicate fluorescence detection in [small mu]TAS. **Lab on a Chip**, v. 3, n. 4, p. 248-252, 2003.

HE, B. et al. Complexation of polyaniline and graphene for efficient counter electrodes in dye-sensitized solar cells: Enhanced charge transfer ability. **Journal of Power Sources**, v. 256, n. 0, p. 8-13, 2014.

HEGEMANN, D.; BRUNNER, H.; OEHR, C. Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 208, p. 281–286, 2003.

HENRY, A. C. et al. Surface Modification of Poly(methyl methacrylate) Used in the Fabrication of Microanalytical Devices. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 21, p. 5331-5337, 2000.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. Elsevier Science, 2010.

HERNANDEZ-RODRIGUEZ, P.; RAMIREZ, A. G. Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations. In: HERNANDEZ-RODRIGUEZ, D. P. (Ed.). **Polymerase Chain Reaction**. Croatia: InTech, 2012.

HOF, M.; FIDLER, V.; HUTTERER, R. Basics of Fluorescence Spectroscopy in Biosciences. In: WOLFBEIS, O. S. (Ed.). **Springer Series on Fluorescence: Methods and Applications**. Germany: Springer, v.3, 2005.

HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A Practical Guide: To Scanning Probe Microscopy**. Park scientific instruments, 1996.

HU, X. et al. Fabrication of fluidic chips with 1-D nanochannels on PMMA substrates by photoresist-free UV-lithography and UV-assisted low-temperature bonding. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 10, n. 6, p. 1223-1232, 2011.

ITO, A. et al. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 1-11, 2005.

JANDT, K. D. Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. **Surface Science**, v. 491, n. 3, p. 303-332, 2001.

JOSHI, M.; DESHPANDE, J. D. **POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION**. 2011.

KANG, I.-K. et al. Immobilization of proteins on poly(methyl methacrylate) films. **Biomaterials**, v. 14, n. 10, p. 787-792, 1993.

KHOSHESAB, Z. M. Reflectance IR Spectroscopy. In: THEOPHILE, P. T. (Ed.). **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology** 2012.

KIEBOOMS, R.; MENON, R.; LEE, K. SYNTHESIS, ELECTRICAL, AND OPTICAL PROPERTIES OF CONJUGATED POLYMERS. In: NALWA, H. S. (Ed.). **Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices** Los Angeles, California, USA: Academic Press, v.8, 2001.

KOENIG, J. L. **Infrared and Raman Spectroscopy of Polymers**. Rapra Technology, 2001.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Third Edition. USA: Springer, 2006.

LAMOUR, G. et al. Contact Angle Measurements Using a Simplified Experimental Setup. **Journal of Chemical Education**, v. 87, n. 12, p. 1403-1407, 2010.

LE, N. C. H. et al. Ultrathin and smooth poly(methyl methacrylate) (PMMA) films for label-free biomolecule detection with total internal reflection ellipsometry (TIRE). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 36, n. 1, p. 250-256, 2012.

LEE, K. S.; LEE, H. L. T.; RAM, R. J. Polymer waveguide backplanes for optical sensor interfaces in microfluidics. **Lab on a Chip**, v. 7, n. 11, p. 1539-1545, 2007.

LEWIN, B. **Genes VIII**. 8. Pearson Prentice Hall, 2004. 1027.

LI, S. et al. Fabrication of Thorny Au Nanostructures on Polyaniline Surfaces for Sensitive Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 5, p. 49-54, 2013.

LI, X. et al. Amperometric immunosensor based on toluidine blue/nano-Au through electrostatic interaction for determination of carcinoembryonic antigen. **Journal of Biotechnology**, v. 123, n. 3, p. 356-366, 2006.

LI, Y. et al. DNA Detection on Plastic: Surface Activation Protocol To Convert Polycarbonate Substrates to Biochip Platforms. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 426-433, 2006.

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1–2, p. 11-16, 2006.

LIU, Y. et al. Photografted poly(methyl methacrylate)-based high performance protein microarray for hepatitis B virus biomarker detection in human serum. **MedChemComm**, v. 1, n. 2, p. 132-135, 2010.

LLOPIS, S. L.; OSIRI, J.; SOPER, S. A. Surface modification of poly(methyl methacrylate) microfluidic devices for high-resolution separations of single-stranded DNA. **ELECTROPHORESIS**, v. 28, n. 6, p. 984-993, 2007.

LOEB, G. I.; SCHRADER, E. **Modern Approaches to Wettability: Theory and Applications**. Springer, 1992.

LOMANT, A. J.; FAIRBANKS, G. Chemical probes of extended biological structures: Synthesis and properties of the cleavable protein cross-linking reagent [35S]dithiobis(succinimidyl propionate). **Journal of Molecular Biology**, v. 104, n. 1, p. 243-261, 1976.

LU, B. et al. A study of the autofluorescence of parylene materials for [small mu ]TAS applications. **Lab on a Chip**, v. 10, n. 14, p. 1826-1834, 2010.

MARIE, R. et al. Immobilisation of DNA to polymerised SU-8 photoresist. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, n. 5, p. 1327–1332, 2006.

MARMUR, A. Penetration and Displacement in Capillary Systems. In: LOEB, G. I. e SCHRADER, E. (Ed.). **Modern Approaches to Wettability: Theory and Applications**: Springer, 1992.

MATSUSHITA, A. et al. Two-dimensional Fourier-transform Raman and near-infrared correlation spectroscopy studies of poly(methyl methacrylate) blends: 1. Immiscible blends of poly(methyl methacrylate) and atactic polystyrene. **Vibrational Spectroscopy**, v. 24, n. 2, p. 171-180, 2000.

MCCARLEY, R. L. et al. Resist-Free Patterning of Surface Architectures in Polymer-Based Microanalytical Devices. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 3, p. 842-843, 2004.

MEYER, E. Atomic force microscopy. **Progress in Surface Science**, v. 41, n. 1, p. 3-49, 1992.

MINEO, P. G. et al. Covalent poly(methyl methacrylate) nanostructures on functionalized Si(100) surfaces. **RSC Advances**, v. 3, n. 4, p. 1137-1144, 2013.

MOREIRA, M. A. B. et al. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 245–252, 2007.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MORNET, S. et al. Magnetic nanoparticle design for medical applications. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 34, n. 2–4, p. 237-247, 2006.

MS, M. D. S.-. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral** SAÚDE, M. D. Brasília- DF: Editora do Ministério da Saúde: 120 p. 2006.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

NAGAI, K. et al. Hydrophilization of Polycarbonate by Ar Glow Discharge. **J. Plasma Fusion Res. SERIES**, v. 8, 2009.

NAJMABADI, P. et al. A Method for Fabrication of Polycarbonate-Based Bioactive Platforms. **Journal of the Association for Laboratory Automation**, v. 13, n. 5, p. 284-288, 2008.

NALWA, H. S. **Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices**. Academic Press, 2000.

NASCIMENTO, H. P. O. et al. An impedimetric biosensor for detection of dengue serotype at picomolar concentration based on gold nanoparticles-polyaniline hybrid composites. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 414–419, 2011.

NOTINGHER, I. Raman Spectroscopy Cell-based Biosensors. **Sensors**, v. 7, p. 1343-1358, 2007.

NURMUKHAMETOV, R. N.; VOLKOVA, L. V.; KABANOV, S. P. Fluorescence and absorption of polystyrene exposed to UV laser radiation. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 73, n. 1, p. 55-60, 2006.

OBRADOVIC, D. PCR (Polymerase Chain Reaction) in detection of *Chlamydia trachomatis* and the other methods - A comparative survey. **Natura Montenegrina**, v. 6, p. 131-136, 2007.

OEHR, C. Plasma surface modification of polymers for biomedical use. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 208, n. 0, p. 40-47, 2003.

OLAD, A.; NOSRATI, R. Preparation and corrosion resistance of nanostructured PVC/ZnO–polyaniline hybrid coating. **Progress in Organic Coatings**, v. 76, n. 1, p. 113-118, 2013.

OLIVEIRA, E. G. D. **Avaliação Estatística dos Testes Diagnóstico em Medicina (Um enfoque heurístico)**. Revista do Centro de Ciências da Saúde (RECCS). Fortaleza - CE. 9: 19-22 p. 1995.

OTROKHOV, G. V. et al. Biocatalytic Synthesis of Conducting Polymers and Prospects for Its Application. **BIOCHEMISTRY (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1539-1553, 2013.

OUDHIA, A. **UV-VIS spectroscopy as a nondestructive and effective characterization tool for II-VI compounds**. 2012.

OWEN, T. **Fundamentals of Modern UV-visible Spectroscopy: Primer**. Agilent Technologies, 2000.

PALM, A. Raman Spectrum of Polystyrene. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1320-1324, 1951.

PEARSON-EDUCATION. Principles of Cell Biology (BIOL2060). 2012. Disponível em: <<http://goo.gl/Tv3uml>>.

PEREIRA, F. S. G. **POLÍMEROS: FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS**. Recife - PE: Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) 2009.

PEREIRA, M. K. **Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado e Espalhamento Raman em Soluções Coloidais de Ouro**. 2009. 108 Dissertação de Mestrado (Mestrado). Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS.

PERKIN ELMER, I. **Technical Note: FT-IR Spectroscopy - ATR accessories: An Overview** 2004.

**Technical Note: Infrared Spectroscopy - The Effects of Varying Force and Contact on ATR Spectra** 2012.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8-24, 2011.

PIRUSKA, A. et al. The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation. **Lab on a Chip**, v. 5, n. 12, p. 1348-1354, 2005.

PONCIN-EPAILLARD, F. et al. Surface Treatment of Polymeric Materials Controlling the Adhesion of Biomolecules. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 3, n. 3, p. 528-543, 2012.

QIAN, K. et al. Designing and fabricating of surface-enhanced Raman scattering substrate with high density hot spots by polyaniline template-assisted self-assembly. **Nanoscale**, v. 4, n. 20, p. 6449-6454, 2012.

QUEIROZ, N. M. G. P. D. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010.

RAMOS-JESUS, J. et al. A piezoelectric immunosensor for Leishmania chagasi antibodies in canine serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 3, p. 917-925, 2011.

REIS, E. A.; REIS, I. A. **Avaliação de Testes Diagnósticos**. Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Exatas Minas Gerais. 2002. (RTP-02/2002)

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.



RIOS, P. F. et al. The effect of polymer surface on the wetting and adhesion of liquid systems. **J. Adhesion Sci. Technol.**, v. 21, n. 3–4, p. 227–241, 2007.

RIVATON, A. et al. Comparison of the photochemical and thermal degradation of bisphenol-A polycarbonate and trimethylcyclohexane–polycarbonate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 75, n. 1, p. 17-33, 2002.

ROTH-FÖLSCH, A.; LÖDEL, T. **Eine Frage des Kontaktwinkels**. [Kunststoffe International.com](http://Kunststoffe-International.com). Munique, Alemanha: Carl Hanser Verlag: 37-39 p. 2011.

SANTOS, R. F. S. **Caracterização das Propriedades Luminescentes de Compósitos PANI/AuNPs e sua Aplicação em Testes de Diagnósticos Rápidos**. 2013. 128 Tese de Doutorado (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais, Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, Brasil.

SANTOS, R. F. S. et al. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2013.

SANVICENS, N. et al. Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1243-1252, 2009.

SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA biosensors and microarrays. **Chem Rev**, v. 108, n. 1, p. 109-39, 2008.

SATRIJO, A. **Controlling the Architectures and Optical Properties of Conjugated Polymer Aggregates and Films**. 2007. Thesis (Doctor of Philosophy). Department of Chemistry, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.

SCOTT, J. C. History of Conductive Polymers. In: EFTEKHARI, A. (Ed.). **Nanostructured Conductive Polymers**: Wiley, 2010.

SHADPOUR, H. et al. Physiochemical properties of various polymer substrates and their effects on microchip electrophoresis performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, n. 2, p. 238-251, 2006.

SHIRAIISHI, N. et al. Fabrication and testing of polymer cantilevers for VOC sensors. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 202, n. 0, p. 233-239, 2013.

SLEPICKA, P. et al. Surface characterization of plasma treated polymers for applications as biocompatible carriers. **eXPRESS Polymer Letters**, v. 7, n. 6, p. 535-545, 2013.

SNEPPEN, K.; ZOCCHI, G. **Physics in Molecular Biology**. Cambridge University Press, 2005.

SRIDHARAN, G.; SHANKAR, A. A. **Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility**. 2012. 5.

STAROS, J. V.; WRIGHT, R. W.; SWINGLE, D. M. Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. **Analytical Biochemistry**, v. 156, n. 1, p. 220-222, 1986.

STORHOFF, J. J. et al. Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, n. 8, p. 875-883, 2004.

STUART, B. H. Temperature studies of polycarbonate using Fourier transform Raman spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 341-346, 1996.

SUBEDI, D. P. et al. Plasma Treatment at low pressure for the enhancement of wettability of polycarbonate. **Indian Journal of Pure & Applied Physics**, v. 46, p. 540-544, 2008.

TAPPER, R. **The Use of Biocides for the Control of Marine Biofilms on Stainless Steel Surfaces**. University of Portsmouth, 1998.

TAYLOR, R. F.; SCHULTZ, J. S. **Handbook of Chemical and Biological Sensors**. Taylor & Francis, 1996.

THERMO-SCIENTIFIC. Pierce Protein Biology Products. 2014. Disponível em: <<http://goo.gl/OYJ3FJ>>.

THOMAS, P.; ERNEST RAVINDRAN, R. S.; VARMA, K. B. R. Structural, thermal and electrical properties of poly(methyl methacrylate)/CaCu<sub>3</sub>Ti<sub>4</sub>O<sub>12</sub> composite sheets fabricated via melt mixing. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 2, p. 1311-1319, 2014.

THOMPSON, R. B. **Fluorescence Sensors and Biosensors**. Taylor & Francis, 2005.

THREE BOND CO., L. **Three Bond Technical News: Ultraviolet-Ozone Surface Treatment**. Tokyo, Japan, p.1-10. 1987

TSOUGENI, K. et al. High-capacity and high-intensity DNA microarray spots using oxygen-plasma nanotextured polystyrene slides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 9, p. 2757-2764, 2012.

TURRO, N. J. **Modern Molecular Photochemistry**. University Science Books, 1991.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001. 3-19.

VALLON, S. et al. Argon Plasma Treatment of Polycarbonate: In situ Spectroellipsometry Study and Polymer Characterizations. **J. Vac. Sci. Technol. A**, v. 14, p. 3194-3199, 1996.

VEECO-INSTRUMENTS. **A Practical Guide to SPM Scanning Probe Microscopy** 2005.

VELUSAMY, V. et al. Conducting polymer based DNA biosensor for the detection of the *Bacillus cereus* group species. **Proc. of SPIE**, v. 7315, 2009.

VERKUIJLEN, R. O. F. et al. Surface modification of polycarbonate and polyethylene naphthalate foils by UV-ozone treatment and  $\mu$ Plasma printing. **Applied Surface Science**, v. 290, p. 381-387, 2014.

VIG, J. R. UV/ozone cleaning of surfaces. **J. Vac. Sci. Technol. A**, v. 3, n. 3, p. 1027-1034, 1985.

VOET, D. V., JUDITH G.; PRATT, CHARLOTTE W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

WALLACE, G. G. et al. **Conductive Electroactive Polymers**. 3rd ed. USA: Taylor & Francis Group, LLC, 2009.

WANG, X. et al. Assembly of dandelion-like Au/PANI nanocomposites and their application as SERS nanosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, n. 6, p. 3063-3067, 2011.

WANG, X.; XU, S.; XU, W. Luminescent properties of dye-PMMA composite nanospheres. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 4, p. 1560-1567, 2011.

WANG, Z.; LI, R.-X. Fabrication of DNA micropatterns on the polycarbonate surface of compact discs. **Nanoscale Research Letters**, v. 2, n. 2, p. 69-74, 2007.

WEI, S. et al. Photochemically Patterned Poly(methyl methacrylate) Surfaces Used in the Fabrication of Microanalytical Devices. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 35, p. 16988-16996, 2005.

WHO, W. H. O. **Infections and infectious diseases: A manual for nurses and midwives in the World Health Organization European Region**. SOCIETIES, I. F. O. R. C. A. R. C. 2001.

WIKIPEDIA. **Atomic force microscope block diagram**. DIAGRAM.SVG, A. F. M. B. 2008.

Wikipedia Commons. 2013. Disponível em: < <http://goo.gl/BIEnvO> >.

WILSON, J. et al. Polypyrrole–polyaniline–Au (PPy–PANi–Au) nano composite films for label-free electrochemical DNA sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 171–172, n. 0, p. 216-222, 2012.

WILSON, R. Ray Wilson Bird & Wildlife Photography. 2005. Disponível em: < <http://goo.gl/q3cV1M> >.

WILSON, R. A.; BULLEN, H. A. Introduction to Scanning Probe Microscopy (SPM) - Basic Theory Atomic Force Microscopy (AFM). Highland Heights - KY, USA, 2006. Disponível em: < [http://asplib.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule\\_BasicTheoryAFM.pdf](http://asplib.org/onlineArticles/ecourseware/Bullen/SPMModule_BasicTheoryAFM.pdf) >.

XIE, C.; DINNO, M. A.; LI, Y.-Q. Near-infrared Raman spectroscopy of single optically trapped biological cells. **Optics Letters**, v. 27, n. 4, p. 249-251, 2002.

YAN, Y.-W. et al. Flame retardance and thermal degradation mechanism of polystyrene modified with aluminum hypophosphite. **Polymer Degradation and Stability**, v. 99, n. 0, p. 35-42, 2014.

YAZDAN MEHR, M. et al. Photodegradation of bisphenol A polycarbonate under blue light radiation and its effect on optical properties. **Optical Materials**, v. 35, n. 3, p. 504-508, 2013.

YUSILAWATI, A. N. et al. Surface Modification of Polystyrene Beads by Ultraviolet/Ozone Treatment and its Effect on Gelatin Coating. **American Journal of Applied Sciences**, v. 7, n. 6, p. 724-731, 2010.

ZHAI, J.; CUI, H.; YANG, R. DNA based biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 43-58, 1997.

ZHANG, L. et al. Self-Assembled Hollow Polyaniline/Au Nanospheres Obtained by a One-Step Synthesis. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 29, n. 7, p. 598-603, 2008.

ZHAO, Z. et al. Plastic Polymers for Efficient DNA Microarray Hybridization: Application to Microbiological Diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3752-3758, 2008.