



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA- CCEN
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

KAMILA TERESA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**USO DE FILMES DE BICAMADAS POLIMÉRICAS
NANOESTRUTURADAS PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DO
VÍRUS DA ZIKA**

Recife
2018

KAMILA TERESA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**USO DE FILMES DE BICAMADAS POLIMÉRICAS
NANOESTRUTURADAS PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DO
VÍRUS DA ZIKA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Área de concentração: Materiais poliméricos

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Recife
2018

Catálogo na fonte
Bibliotecária Arabelly Ascoli CRB4-2068

N244u Nascimento, Kamila Teresa Oliveira do
Uso de filmes de bicamadas poliméricas nanoestruturadas para o diagnóstico rápido do vírus da Zika / Kamila Teresa Oliveira do Nascimento. – 2018.
81 f.: il., fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2018.
Inclui referências e anexos.

1. Polímeros. 2. Vírus Zika. 3. Diagnóstico molecular. 4. Fluorescência. I. Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

620.11 CDD (22. ed.) UFPE-FQ 2019-57

KAMILA TERESA OLIVEIRA DO NASCIMENTO

**USO DE FILMES DE BICAMADAS POLIMÉRICAS NANOESTRUTURADAS
PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DO VÍRUS DA ZIKA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais, Centro de Ciências Exatas e da Natureza da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Área de concentração: Materiais poliméricos

Aprovada em: 10/08/2018

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Rosa Maria Souto Maior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Sinval Pinto Brandão Filho (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães
(Fiocruz Pernambuco)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde, discernimento e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Vania Maria e Gilson Cordeiro, aos meus irmãos Kaio Augusto, Iury Augusto e Ianna Teresa, pelo carinho e suporte e a minha avó por todo incentivo e confiança. E in memória do meu querido avô José Pereira por me mostrar o verdadeiro sentido da vida. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos meus familiares, por todo o apoio e incentivo, sempre acreditando fielmente no meu sucesso.

A todas as minhas amigas de infância, Danielly Maciel, Emanuela Iarla e Isabella Santos, as minhas amigas Karen Santos, Bruna Gomes, Evanily Chagas, Izabel Gomes, Simone Simões, Jessica Queiroz, Jeice Marquês, Amanda Gisele e Ângela Maria, por todos os momentos vividos e por estarem presente e me apoiarem em todas as etapas da minha caminhada.

A minha amiga Gabriela Plauz, por toda ajuda e companheirismo, por acreditar no meu sucesso e nunca me deixar desistir, “In Richtung Racso”.

Ao corpo docente, por contribuir para a minha formação.

As pessoas que compõem o grupo de Polímeros Não Convencionais (PNC): Adriana, Edson, Elton, Hanna, Hérica, Winnie e Rubênia, e em especial Graciela, Gabriela, Filipe e Romário que contribuíram bastante na construção deste trabalho.

Ao meu orientador Celso P. Melo, por toda a paciência, dedicação e orientação.

A Capes pela concessão da bolsa para a continuação deste trabalho.

RESUMO

A infecção pelo vírus Zika (ZIKV) tornou-se um grande problema de saúde pública após a descoberta em 2016 de que um aumento alarmante no número de recém-nascidos com microcefalia no Brasil poderia estar associado à ocorrência dessa doença viral durante a gravidez. A necessidade urgente de métodos simples de diagnóstico que permitissem um rastreamento rápido de casos suspeitos estimulou a busca de dispositivos de baixo custo capazes de detectar sequências específicas de ácidos nucleicos. O presente trabalho consistiu no desenvolvimento de filmes nanoestruturados formados por bicamadas de polímeros conjugados para a detecção rápida por fluorescência da presença do DNA do vírus Zika. Para isso, camadas alternadas de polianilina (PANI) e polipirrol (PPY) foram inicialmente crescidas sobre a superfície de folhas de polietileno tereftalato (PET). Os filmes obtidos foram então caracterizados por MEV, UV-vis, FTIR-ATR e medidas do ângulo de contato, e para sua utilização como supressores de fluorescência (“quenchers”) para o diagnóstico da Zika foi usada uma cadeia simples de DNA, específica para o ZIKV e marcada com um fluoróforo (ssDNA-FAM). Para isso, a sonda ssDNA-FAM foi imobilizada na superfície das películas PANI-PPY/PET ou PPY-PANI/PET, do que resulta a extinção da fluorescência. Posteriormente, os filmes ao serem imersos em uma solução contendo o ssDNA alvo (fita de DNA complementar), ocorre a subsequente hibridização da sonda imobilizada no filme, com o seu alvo. Isso leva a uma alteração conformacional do DNA, que se desprende do filme, ocasionando a recuperação da fluorescência. Na busca da otimização das propriedades dos filmes nanoestruturados, investigamos tanto a cinética de imobilização quanto a de hibridização. Com isso, foi possível identificar o tempo necessário para que ocorra a saturação da interação entre o ssDNA-FAM e o filme (180 min) e também o tempo necessário para que aconteça a máxima hibridização entre o ssDNA-FAM e o DNA alvo (60 min). Com base nos parâmetros otimizados, estimamos os limites de detecção como sendo 345 pmol/L e 278 pmol/L para os filmes PPY-PANI/PET e PANI-PPY/PET, respectivamente. A simplicidade do procedimento, aliada ao fato de que uma resposta positiva/negativa pode ser obtida em menos de 60 minutos, sugerem que a proposta do uso desses filmes de bicamadas poliméricas é um método promissor para o desenvolvimento de testes rápidos de diagnóstico molecular.

Palavras-chave: Polímeros intrinsecamente condutores. Vírus Zika. Diagnóstico molecular. Fluorescência.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection became a major public health problem after the discovery in 2016 that an alarming increase in the number of newborns with microcephaly in Brazil could be associated with the occurrence of this viral disease during pregnancy. The urgent need for simple diagnostic methods that allow rapid screening of suspected cases has stimulated the search for low-cost devices capable of detecting specific sequences of nucleic acids. The present work consisted in the development of nanostructured films formed by bilayers of conjugated polymers for the rapid detection by fluorescence of the presence of Zika virus DNA. For this, alternating layers of polyaniline (PANI) and polypyrrole (PPY) were initially grown on the surface of polyethylene terephthalate (PET) sheets. The films obtained were then characterized by MEV, UV-Vis, FTIR-ATR and contact angle measurements, and for their use as quenchers for the diagnosis of Zika a single DNA strand specific for ZIKV, labeled with a fluorophore (FAM-ssDNA). For this, the FAM-ssDNA probe was immobilized on the surface of PANI-PPY/PET or PPY-PANI/PET films, resulting in a quenching of the fluorescence signal. Subsequently, the films were immersed in a solution containing the target ssDNA (complementary DNA strand), and the subsequent hybridization of the immobilized probe with its target leads to a conformational change of the DNA chain, which detaches from the film, causing fluorescence recovery. After investigating the kinetics of immobilization and the kinetics of hybridization, we optimized the properties of the nanostructured films. With this, it was possible to determine the time required for saturation of the interaction between FAM-ssDNA and the film (180min) and the time required for the maximal hybridization between FAM-ssDNA and target DNA (60 min). The corresponding detection limits were estimated as 345 pmol/L and 278 pmol/L for the PPY-PANI/PET and PANI-PPY/PET, respectively. The simplicity of the procedure coupled with the fact that a positive/negative response can be obtained in less than 60 minutes suggests that the proposal of using these polymeric bilayer films represents a promising methodology for the development of rapid molecular diagnostic tests.

Keywords: Intrinsically conductive polymers. Zika virus. Molecular diagnosis. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Composição de um biossensor e organização dos seus componentes. (A) componente biológico, onde é feita a detecção do analito-alvo; (B) transdutor, onde o sinal é convertido, e (C) sistema de processamento de dados, onde o sinal de resposta é gerado.....	15
Figura 2 -	Diagrama de energias com distribuição das bandas de valência e condução de metal, semicondutor e isolante.....	21
Figura 3 -	Esquema dos defeitos estruturais e da faixa proibida (gap) do politiofeno neutro (a) pólaron (b) e bipólaron (c).....	22
Figura 4 -	Estrutura molecular da anilina.....	23
Figura 5 -	Estrutura da polianilina na forma de base (não dopada).....	23
Figura 6 -	Etapas de polimerização eletroquímica e dopagem da polianilina (MEDEIROS et al., 2012).....	25
Figura 7 -	Principal método de síntese da polianilina (FAEZ et al., 2000)...	26
Figura 8 -	Estrutura molecular do pirrol.....	27
Figura 9 -	Mecanismo de polimerização eletroquímica do pirrol (SILVA, 2010).....	28
Figura 10 -	Esquema dos defeitos estruturais do polipirrol neutro (isolante) (a) pólaron (condutora) (b) e bipólaron (condutora) (c).....	29
Figura 11 -	Interações da luz com a matéria.....	30
Figura 12 -	Diagrama simplificado de Perrin-Jablonski. As linhas tracejadas se referem aos processos não radiativos e as linhas contínuas aos processos radiativos (LAKOWICZ, 2006).	31
Figura 13 -	Distinção entre os estados singleto e tripleto (VALEUR, 2001)..	32
Figura 14 -	Estruturas dos principais fluoróforos.....	34
Figura 15 -	Esquema de nível de energia de moléculas doadoras e receptoras mostrando as transições acopladas (VALEUR, 2001)	36
Figura 16 -	Componentes sensor de PET. (a) “Estado desligado”, transferência de elétrons a partir do doador livre para o receptor, (b) “Estado ligado”, a transferência de elétrons a partir do doador é bloqueada devido a ligação do analito.....	37
Figura 17 -	Constituição do nucleotídeo.	38
Figura 18 -	Estrutura química da desoxirribose e ribose (a) e das bases nitrogenadas (b).	39
Figura 19 -	Ligações fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA e do RNA (a), representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice e ligações de hidrogênio (linha azuis) no pareamento de bases definido por Watson e Crick (c) (NELSON; COX, 2013).....	40
Figura 20 -	Morfologia dos vírus não envelopados e envelopados. (a) diagrama de um vírus poliédrico (icosaédrico), (b) diagrama de um vírus helicoidal envelopado, (c) Microfotografia do vírus influenza A2 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).....	43
Figura 21 -	Distribuição do vírus da Zika no mundo adaptado de https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/01/160126_zika_brasil_endemica_fd_rp	45
Figura 22 -	Esquema da preparação e delimitação da área de polimerização.	51

Figura 23 -	Esquema de polimerização dos filmes de bicamadas.....	55
Figura 24 -	Esquema do procedimento de imobilização dos filmes bicamadas.	53
Figura 25 -	Substrato PET com máscara (a), filme de bicamada PANI-PPY/PET com máscara (b), filme de bicamada PPY-PANI/PET com máscara (c), filme de bicamada PPY-PANI/PET sem máscara e filme cortado em tira (e).....	57
Figura 26 -	Espectros UV-vis. (a) Filme de PANI-PPY/PET (I) PANI sobre a folha de PET e (II)PPY crescida na superfície da PANI; (b) PPY-PANI/PET (I) PPY sobre a folha de PET e (II) PANI crescida na superfície do PPY.	58
Figura 27 -	Espectros IV dos filmes PPY-PANI/PET (a) e PANI-PPY/PET (b).	59
Figura 28 -	Imagens MEV de PET (I), filme bicamada Polipirrol-Polianilina/PET (II), filme bicamada Polianilina-Polipirrol/PET	60
Figura 29 -	Ângulo de contato da água para: filme PANI-PPY/PET (a) e filme PPY-PANI/PET (b).	61
Figura 30 -	Esquema do mecanismo de detecção de ácidos nucleicos utilizando filmes nanoestruturados PIC /PET.	62
Figura 31 -	(a) Espectros de emissão de fluorescência da solução de ssDNA-FAM (50 nM) sob diferentes condições: antes (I) e após a interação com filmes PPY-PANI/PET (II) e PANI-PPY/PET (III). (b) Intensidade da fluorescência após interação dos sistemas ssDNA-FAM - PIC/PET com ssDNA alvo complementar e não complementar (50 nM).....	63
Figura 32 -	Cinética de imobilização ssDNA-FAM (50nM) diluído em Tris-HCl (pH 7,4), 518nm.....	64
Figura 33 -	Cinética de hibridização. Recuperação da fluorescência devido à interação do ssDNA-FAM imobilizado nos filmes PIC/PET com o DNAC (50nM) diluído em Tris-HCl (pH 7,4), 518nm.....	65
Figura 34 -	Espectros de fluorescência dos filmes PANI-PPY/PET(a) e PPY-PANI/PET(b) imobilizados com ssDNA-FAM e em diferentes concentrações de DNAC: a-100, b-75,c-50, d-25, e-10, f-5..	66
Figura 35 -	Espectro de fluorescência correspondente ao intervalo de resposta linear dos ensaios para o filme PANI-PPY/PET(a) e PPY-PANI/PET(b) (518nm)	66
Figura 36 -	Histogramas da seletividade dos filmes (a) PANI-PPY/PET e (b) PPY-PANI/PET com relação à adição do Poli-A, Poli-A mais o DNAC, e os complementares com uma base errada (T1) e duas bases erradas (T2).	66
Figura 37 -	Histogramas da comparação entre os filmes (a) PANI-PPY/PET e (b) PPY-PANI/PET com relação à adição aos filmes de uma e duas camadas de PPY ou PANI.	70
Figura 38 -	Espectros de fluorescência dos filmes PANI-PPY/PET (a) e PPY-PANI/PET (b) imobilizados com ssDNA-FAM para HPV-18 em diferentes concentrações de DNAC: a-100, b-75,c-50, d-25, e-10, f-5. Insert Espectro de fluorescência correspondente ao intervalo de resposta linear de dos ensaios para o filme PANI-PPY/PET(a) e PPY-PANI/PET(b).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura dos principais polímeros intrinsecamente condutores.	19
Tabela 2 - Os quatro estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina (isolante e condutora) e pernigranilina.	24
Tabela 3 - Sensores para detecção do vírus Zika.....	48
Tabela 4 - Sequência de nucleotídeos utilizada nos experimentos sobre Zika.....	50
Tabela 5 - Comparação entre os filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET e alguns supressores de fluorescência.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
APS	Persulfato de amônio
BC	Banda de condução
BV	Banda de valência
C	Citosina
DENV	Vírus dengue
DMT	Doença do mosaico do tabaco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAM	Fluoróforo derivado da Fluoresceína
FRET	Transferência de energia de ressonância de Förster
FTIR	Espectroscopia de absorção no infravermelho
G	Guanina
HOMO	Orbital molecular de mais alta energia ocupado
LUMO	Orbital molecular de mais baixa energia não ocupado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANI	Polianilina
PET	Polietileno tereftalato
PET	Transferência fotoinduzida de elétrons
PICs	Polímeros intrinsecamente condutores
PNC	Laboratório de Polímeros não convencionais
PPY	Polipirrol
RNA	Ácido ribonucleico
ssDNA-FAM	DNA fita simples marcado com FAM
T	Timina
U	Uracila
UV-VIS	Espectroscopia de absorção no ultravioleta visível
WNV	Vírus oeste do Nilo
YFV	Vírus febre amarela
ZIKV	Vírus da Zika

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	CONCEITOS BÁSICOS.....	14
2.1	Biossensores.....	14
2.2	Polímeros	17
2.2.1	Polímeros intrinsecamente condutores – PIC	18
2.2.1.1	<i>Propriedades da condução dos polímeros conjugados</i>	<i>20</i>
2.2.1.2	<i>Polianilina</i>	<i>22</i>
2.2.1.3	<i>Polipirrol</i>	<i>27</i>
2.3	Fluorescência.....	30
2.3.1	Fluoróforos	34
2.3.2	Supressão de fluorescência	35
2.4	Ácidos Nucleicos	38
2.5	Vírus.....	42
2.5.1	Vírus da Zika	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Materiais.....	49
3.2	Método de preparação dos filmes de bicamada PANI-PPY/PET e PPY- PANI/PET.....	50
3.2.1	Preparação das folhas de poli(tereftalato de etileno)- PET	50
3.2.2	Polimerização <i>in situ</i>	52
3.3	Métodos de caracterização.....	52
3.3.1	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis).....	52
3.3.2	Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR)	53
3.3.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
3.3.4	Ângulo de contato.....	53
3.3.5	Espectroscopia de fluorescência	53
3.4	Experimentos de sensoriamento.....	53
3.4.1	Cinética de Imobilização	54
3.4.2	Cinética de Hibridização	55
3.4.3	Limite de detecção do biossensor	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56

4.1	Preparação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET	56
4.2	Caracterização dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET	57
4.2.1	Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis).....	57
4.2.2	Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR)	58
4.2.3	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	59
5.2.4	Ângulo de contato.....	60
4.4	Aplicação dos filmes PPY-PANI/PET e PANI-PPY/PET para o diagnóstico rápido da Zika.....	61
4.4.1	Otimização dos filmes para a detecção de DNA	63
4.4.1.1	<i>Cinética de imobilização</i>	63
4.4.1.2	<i>Cinética de hibridização</i>	64
4.4.2	Limite de detecção.....	65
4.4.3	Seletividade da detecção de DNA do vírus da Zika	67
4.4.4	Comparação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET com outros supressores de fluorescência descritos na literatura	68
4.4.5	Comparação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET com filmes de PANI e PPY com uma e duas camadas	69
4.5	Os filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET para diagnóstico de outros vírus.....	71
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE OS REAGENTES UTILIZADOS.....	80
	ANEXO B – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS DE HPV 18.....	81

1 INTRODUÇÃO

O vírus da zika (ZIKV) que é transmitido pela picada do mosquito *Aedes aegypti* (arbovirus), faz parte da família Flaviviridae e do gênero *Flavivirus*, apresentando associação genética com outros do gênero *Flavivirus* também importantes, como o vírus da dengue, o da febre amarela e o do oeste do Nilo. A partir de 2016, um surto do vírus da Zika no Brasil, tornou-se um grande problema de saúde pública, com a infecção viral estando associada a casos graves de problemas neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré em adultos e a microcefalia em bebês nascidos de pacientes infectadas. A necessidade urgente de métodos simples de diagnóstico de doenças infecciosas que permitam um rastreamento rápido de casos suspeitos estimulou a busca de dispositivos de baixo custo capazes de detectar sequências específicas de ácidos nucleicos. Há alguns anos, o grupo de Polímeros Não-convencionais (PNC), do departamento de Física da UFPE vem desenvolvendo pesquisas em biossensores poliméricos baseados em fluorescência. Um dos trabalhos recentes foi a investigação de um biossensor para o diagnóstico molecular utilizando filmes de polianilina (PANI) e polipirril (PPY) crescidas em uma folha de PET, um método inicialmente desenvolvido para a detecção de *Leishmania infantum* com resultados de detecção de 1.3 nM para PANI e 1.1 nM para PPY. O presente trabalho foi voltado para o desenvolvimento de filmes de bicamadas poliméricas (PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET) sobre folhas de PET para o diagnóstico molecular do ZIKV, e teve por objetivo melhorar as propriedades do material, estabelecer o limite de detecção e examinar a viabilidade de utilização desses filmes em testes de diagnóstico molecular com base em ensaios fluorescentes.

Essa dissertação está estruturada em cinco capítulos. No primeiro capítulo, é apresentado a introdução, e no segundo é feita a revisão bibliográfica, onde são apresentados conceitos fundamentais sobre biossensores, polímeros, fluorescência, ácidos nucleicos e Zika. O terceiro capítulo é dedicado à apresentação dos materiais e métodos, onde são descritos os materiais utilizados, bem como, a metodologia aplicada para a realização dos ensaios. No quarto capítulo são apresentados os resultados e as discussões. E, por último, tens a conclusão do trabalho e as discussões das perspectivas para uma continuidade futura.

2 CONCEITOS BÁSICOS

Neste capítulo, apresentaremos alguns tópicos importantes para o desenvolvimento deste trabalho, tais como uma breve revisão sobre biossensores, polímeros em geral, e polímeros condutores, fluorescência, ácidos nucleicos e, por último, uma revisão sobre o vírus Zika.

2.1 Biossensores

Os biossensores são definidos como dispositivos capazes de converter informações bioquímicas em um sinal mensurável. O sistema de reconhecimento de biossensores se baseia em interações bioquímicas estabelecidas entre o receptor biológico imobilizado em um transdutor e o analito de interesse (OLIVEIRA et al., 2013). Em 1963, Clark e Lyons apresentaram o primeiro dispositivo de biossensoriamento, um biossensor eletroquímico que utilizava a enzima glicose oxidase para determinar o nível de glicose no plasma sanguíneo (HARPER; ANDERSON, 2010).

Nos dias de hoje, os biossensores são classificados de acordo com o tipo de detecção, que pode ser direta (sensor de detecção direta ou sistema não reticulado) ou indireta (sensor marcado ou sistema reticulado). No primeiro caso, a interação biológica é medida de modo direto utilizando um ligante não-catalítico, como receptores celulares ou anticorpos. Já na detecção indireta são utilizados anticorpos marcados ou elementos catalíticos, como enzimas (CALIL; ROBERTO, 2011).

Para a obtenção de bons biossensores são necessárias algumas características como a seletividade (habilidade de discriminar a espécie de interesse em meio a outras espécies presentes), faixa de sensibilidade (capacidade de detecção do analito), tempo de vida útil, estabilidade operacional (resposta da variação do biossensor em função dos diferentes fatores) e pequeno tamanho (possibilitando simples instalação e monitorização) (DIAS, 2014). Os principais constituintes de um biossensor são um componente biológico (receptor), o sistema de transdução (transdutor) e um sistema de processamento de dados e registro (Fig. 1).

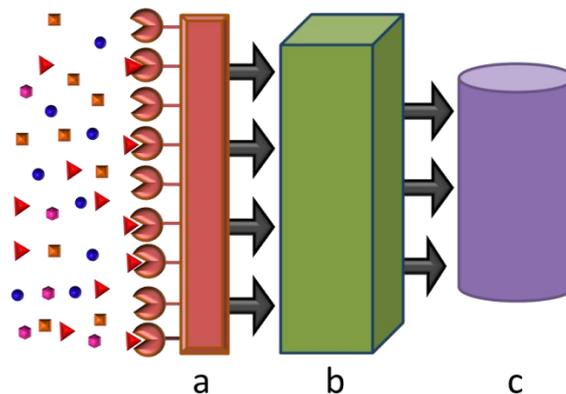


Figura 1 Composição de um biossensor e organização dos seus componentes. (a) componente biológico, onde é feita a detecção do analito-alvo; (b) transdutor, onde o sinal é convertido, e (c) sistema de processamento de dados, onde o sinal de resposta é gerado.

O componente biologicamente ativo, o responsável pela especificidade do biossensor, possibilita a interação com o analito. A ligação entre eles gera uma resposta, produzindo alterações em um ou mais parâmetros físico-químicos (como modificação de pH, a transferência de elétrons, variação de massa, transferência de calor, liberação de gases ou íons). O elemento de reconhecimento biológico podem ser enzimas, oligonucleotídeos, anticorpos, organelas, aptâmeros ou microrganismos, entre outros.

O transdutor é o componente que processa as alterações provocadas pela interação entre o receptor e a molécula de interesse e as transforma em um sinal que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado. O sistema de processamento é responsável por filtrar, amplificar e analisar o sinal transduzido, transmitindo-o para um monitor ou armazenando-o em algum dispositivo. O biossensor detecta quantitativa e/ou qualitativamente a resposta, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da molécula alvo (OLIVEIRA et al., 2013).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o receptor biológico, tipo de detecção ou por uma combinação dos dois. Com base no elemento biológico utilizado, o biossensor, pode ser biocatalítico (enzimas, células ou tecidos) ou por bioafinidade (antígenos, anticorpos ou fragmentos de DNA). Com relação ao mecanismo de transdução, os biossensores podem ser eletroquímicos (amperométricos; potenciométricos; condutimétricos – a depender do seu princípio de medição), piezoelétricos, óticos ou calorimétricos (DIAS, 2014; OLIVEIRA et al., 2013).

Os biossensores eletroquímicos se baseiam na medição da corrente produzida por uma reação química entre espécies químicas eletroativas. Os biossensores eletroquímicos podem ser divididos em amperométricos (pela diferença de corrente

elétrica decorrente da oxidação ou redução eletroquímica), potenciométricos (diferença de voltagem decorrente da diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência) ou condutimétricos (pela medida de mudança da condutância) (CALIL; ROBERTO, 2011).

Por sua vez, o funcionamento de biossensores piezoelétricos se baseia na medida de alteração de massa ou nas propriedades da propagação da onda ressonante devido à sorção ou dessorção de espécies químicas. Para isso, são muito utilizados os cristais de quartzo, pelo fato de serem eles muito sensíveis às variações de massa. Os biossensores óticos registram a variação da luminosidade (luminescência, fluorescência) decorrente de uma reação química ou biológica. Já os biossensores calorimétricos medem a mudança de temperatura que acompanha reações bioquímicas entre uma substância biologicamente ativa e o analito (CALIL; ROBERTO, 2011; DIAS, 2014; MEDEIROS et al., 2012a).

Essa diversidade de biossensores abre espaço para a utilização de vários materiais no biossensoriamento. Uma classe de materiais que vem atraindo interesse é a dos polímeros conjugados, que podem ser utilizados como matrizes para a imobilização de biomoléculas, e assim servir como intermediários nos processos de interação entre o receptor e o analito e na transdução do sinal. Esses polímeros são utilizados com o intuito de melhorar a sensibilidade, o tempo de resposta e o limite de detecção dos biossensores. Biossensores poliméricos são encontrados em uma diversidade de aplicações, que vão do diagnóstico de doenças até à determinação de contaminantes na água (OLIVEIRA et al., 2013).

Dessa forma, os polímeros conjugados têm ganhado grande destaque na ciência e tecnologia de sensores e biossensores. Suas principais características responsáveis por isso estão associadas a essa grande diversidade de polímeros conjugados, que são materiais baratos e permitirem a realização de análises relativamente rápidas ao se ligarem a moléculas biológicas (MEDEIROS et al., 2012a). Exemplos de imobilização de moléculas biológicas em polímeros o uso através de enzimas como um biossensor para glicose (MAZEIKO et al., 2013; YUAN; GAPONIK; EYCHMÜLLER, 2012), de anticorpos (CUI et al., 2016), e de ácidos nucleicos (LIU et al., 2013; RADHAKRISHNAN et al., 2013; WANG et al., 2017; WILSON et al., 2012; ZHANG et al., 2013), dentre outros.

2.2 Polímeros

Polímeros são macromoléculas compostas por muitas unidades (chamadas meros) que se repetem, e que estão ligadas entre si por ligações covalentes. O termo polímero, que deriva do grego poli (muitos) e meros (unidades de repetição), foi criado por Berzelius, em 1832, para indicar compostos de pesos moleculares múltiplos, em contraposição ao termo isômero, empregado para compostos de mesmo peso molecular, porém de estruturas diferentes. Uma única unidade repetitiva é chamada monômero, que é a unidade básica que dá origem aos polímeros através de uma reação química chamada de polimerização (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; CANEVAROLO JR., 2006; MANO; MENDES, 2004).

Os polímeros podem ser de origem natural como os provenientes de plantas ou de animais (como borracha, algodão, lã, couro e seda) ou também proteínas, amido e celulose (moléculas importantes dos sistemas biológicos) ou sintética, quando formados a partir de pequenas moléculas orgânicas, como o polipropileno (PP), o poli(tereftalato de etileno) (PET), o polietileno (PE) e o poli(cloreto de vinila) (PVC) (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; SPINACÉ; PAOLI, 2005).

Os polímeros podem ser classificados de acordo com seu comportamento térmico (termofixos ou termoplásticos), sua origem (naturais ou sintéticos), regularidade espacial (isotáticos, sindiotáticos ou atáticos), natureza de unidade repetitiva (homopolímeros ou copolímeros), tipo de cadeia (linear, ramificada ou reticulada) e com a natureza da síntese (polimerização de adição ou por condensação) (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; CANEVAROLO JR., 2006).

Na década de 1920, Staudinger apresentou argumentos sugerindo que a borracha natural e outros produtos de síntese seriam constituídos por moléculas de cadeias muito longas, e não por agregados coloidais de pequenas moléculas, como se acreditava na época. No entanto, apenas na iminência da Segunda Guerra Mundial, com a limitação no suprimento do produto natural, ocorreu a necessidade da produção da borracha sintética; com isso, os polímeros sintéticos passaram a ser produzidos em maior quantidade e variedade, passando a ser melhor investigada sua síntese, composição e propriedades (CANEVAROLO JR., 2006; FAEZ et al., 2000; MANO; MENDES, 2004).

Atualmente, tanto do ponto de vista prático quanto econômico, os polímeros mais importantes são os sintéticos, que desde a segunda metade do século 20 passaram a

ser a principal fonte da indústria, criando um forte elo entre a química e a engenharia de materiais. Tradicionalmente, os polímeros eram usados na indústria elétrica como isolantes. Logo, pela incorporação de fibras metálicas e negro de fumo na matriz polimérica, foi possível obter polímeros com menor resistência elétrica, que poderiam ser utilizados em blindagem contra radiações eletromagnética. Esses polímeros foram classificados como condutores extrínsecos. Por volta dos anos 70, o poliacetileno dopado foi sintetizado sob a forma de filmes que apresentavam um comportamento intrinsecamente eletroativo e condutividade elétrica da mesma ordem que a de alguns metais, o que abriu novos horizontes para a comunidade científica (WAN; GALEMBECK; GALEMBECK, 2001; ZOPPI; DE PAOLI, 1993).

2.2.1 Polímeros intrinsecamente condutores – PIC

Tem sido crescente, nos últimos anos, o interesse pelas propriedades de materiais poliméricos que possuam condutividade elétrica comparável com a dos metais, os assim chamados polímeros condutores. Esses polímeros intrinsecamente condutores (PIC) são de natureza conjugada e formam uma classe de materiais que conduzem corrente elétrica sem necessidade de incorporação prévia de cargas (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; FAEZ et al., 2000). Eles são formados por cadeias de hidrocarbonetos que possuem duplas ligações alternadas, o que facilita a deslocalização dos elétrons através do sistema conjugado, e podem passar de isolante a condutor através de processos reversíveis de oxidação e redução (FAEZ et al., 2000; INZELT, 2008; ZOPPI; DE PAOLI, 1993).

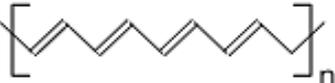
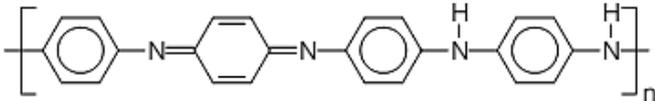
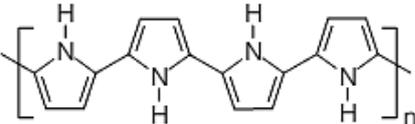
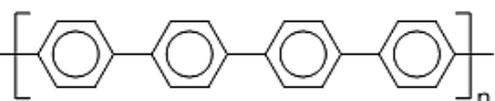
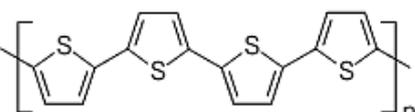
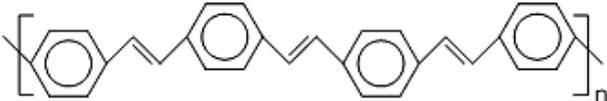
Esses polímeros condutores, que podem ser empregados em uma grande variedade de aplicações, possuem baixa densidade e são altamente flexíveis, sendo ainda fáceis de serem produzidos. Eles têm encontrado uso em áreas como eletrodos (de baterias recarregáveis, sensores e capacitores), músculos artificiais (transdutores mecânicos para robótica), LEDs (monitores e mostradores), protetor antiestático (microeletrônica), anticorrosivos (tintas), células solares (fonte alternativa de energia) (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; FAEZ et al., 2000; HÜMMELGEN; ROMAN; LIMA, 1998).

Os PICs foram descobertos de maneira fortuita em 1976, no Instituto de Tecnologia de Tóquio, por H. Shirakawa. Na tentativa de sintetizar o poliacetileno (até então produzido sob a forma de um pó preto), um estudante de Shirakawa obteve um

filme prateado semelhante a uma folha de alumínio: acidentalmente, ele havia usado uma quantidade 1000 vezes maior do catalisador. Shirakawa, em colaboração com A.G. MacDiarmid e A.J. Heeger, constatou que após a dopagem com iodo, o filme que era prateado se transformava em uma folha metálica dourada, com sua condutividade elétrica aumentada por várias ordens de grandeza (FAEZ et al., 2000). No ano 2000, Shirakawa, MacDiarmid e Heeger ganharam o prêmio Nobel de Química pela descoberta dos polímeros condutores. Desde então muitos outros polímeros condutores foram desenvolvidos.

Entre os polímeros intrinsecamente condutores, os mais estudados são o poliacetileno, a polianilina, o polipirrol e o politiofeno, o poli(p-fenileno) e o poli(p-fenileno vinileno), cujas estruturas e condutividades estão representadas na Tabela 1 (MATTOSO, 1996). O poliacetileno tem o maior valor de condutividade dentre os polímeros, igualando-se à do cobre, 10^6 Siemens/centímetro (S/cm).

Tabela 1 Estrutura dos principais polímeros intrinsecamente condutores.

Nome	Estrutura Química	Condutividade ($S \cdot cm^{-1}$)
Poliacetileno		10^3 a 10^6
Polianilina		10 a 10^3
Polipirrol		600
Poli(p-fenileno)		500
Politiofeno		200
Poli(p-fenileno vinileno)		1

Os PICs podem ser sintetizados por três métodos de polimerização, a química, a eletroquímica e a fotoeletroquímica, sendo a primeira a mais utilizada na indústria por proporcionar uma grande quantidade de material. Durante a polimerização, ou por via de reações de oxi-redução, defeitos estruturais móveis surgem naturalmente na cadeia polimérica; esses defeitos são responsáveis pela condutividade, pois a oxidação ou redução da cadeia remove ou adiciona elétrons causando os defeitos (FAEZ et al., 2000; MEDEIROS et al., 2012b).

Quando elétrons são retirados/adicionados na cadeia, há a formação de cargas deslocalizáveis, com os contraíons (dopantes) inseridos de modo a equilibrar a carga da cadeia polimérica. Através da dopagem é possível controlar a condutividade elétrica e as propriedades eletroquímicas e eletrocromáticas dos PICs. Como nos semicondutores inorgânicos, a dopagem pode ser do tipo *n* (introdução de um excesso de elétrons) ou do tipo *p* (excesso dos buracos), mas ao contrário deles, os átomos ou moléculas dopantes não substituem ou ocupam um lugar na estrutura covalente dos polímeros (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; MEDEIROS et al., 2012b; ZOPPI; DE PAOLI, 1993).

2.2.1.1 Propriedades da condução dos polímeros conjugados

Por possuírem propriedades elétricas, magnéticas e ópticas semelhante a metais e semicondutores, os polímeros intrinsecamente condutores são chamados também de “metais sintéticos”. No entanto, um termo mais apropriado seria chamá-los de “polímeros conjugados”, porque são formados por cadeias contendo ligações CC duplas e simples conjugadas, como mostrado na Tabela 1 (FAEZ et al., 2000).

Uma primeira explicação da condutividade elétrica desses polímeros toma como base o modelo de bandas, semelhante ao caso dos semicondutores inorgânicos. Na linguagem da física do estado sólido, quando um agregado de átomos forma um sólido, o princípio de exclusão de Pauli é obedecido, de modo que dois elétrons de mesmo spin não podem ocupar o mesmo nível de energia, o que resulta no aparecimento de um grande número de estados de energia muito próximos. Isso dá origem à formação de bandas, isto é, faixas de energia permitidas. Em um semicondutor ou em um isolante, os níveis de energia mais baixo são ocupados, formando a banda de valência (BV), enquanto os de energia mais alta formam a banda de condução (BC), que é desocupada, com o aparecimento da chamada faixa de energia proibida entre essas duas bandas, o

chamado band gap (ou “hiato”), que determina as propriedades elétricas inerentes ao material, se semicondutor ou isolante (FAEZ et al., 2000; MEDEIROS et al., 2012b; ZOPPI; DE PAOLI, 1993).

Quimicamente, o orbital ocupado de mais alta energia (HOMO; highest occupied molecular orbital) e o desocupado de mais baixa energia (LUMO; lowest unoccupied molecular orbital) correspondem, respectivamente, aos limites superior da banda de valência e inferior da banda de condução, (sendo E_g a diferença entre eles) (Fig. 2) (HÜMMELGEN; ROMAN; LIMA, 1998).

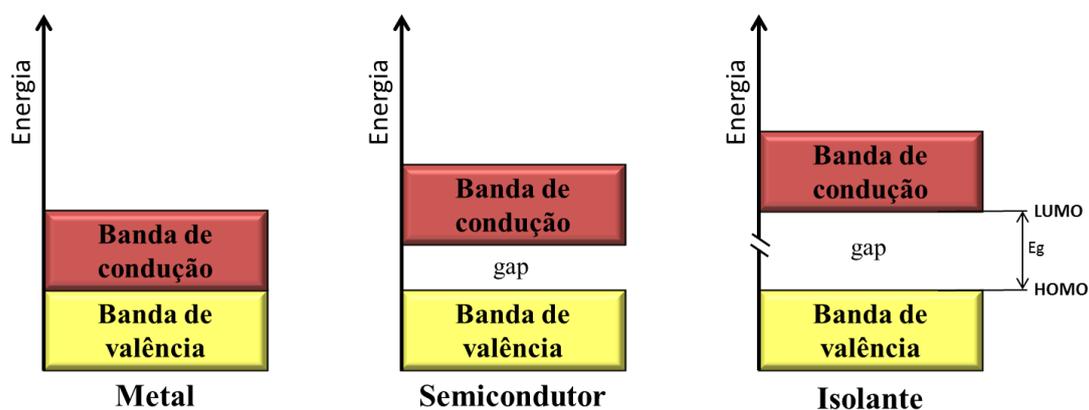


Figura 2 Diagrama de energias com distribuição das bandas de valência e condução de metal, semicondutor e isolante.

Assim, as propriedades elétricas de um material são determinadas pela estrutura dessas bandas de energia. Se o band gap for nulo, e existir apenas uma única banda semi preenchida, o material será um condutor (metal). A diferença entre semicondutores e isolantes é o valor da energia de separação (band gap): para os semicondutores, o gap é moderado (de ordem de alguns eV), enquanto que para os isolantes essa separação é bem maior. No caso dos semicondutores, a promoção de elétrons da banda de valência para níveis desocupados se faz possível, sendo fortemente dependente da temperatura (MEDEIROS et al., 2012b; MELO, 1987).

Por si só, o modelo de bandas não consegue explicar a condutividade dos polímeros condutores, pois a condutividade não estaria ligada ao movimento de elétrons desemparelhados, mas ao transporte eletrônico via defeitos estruturais na cadeia polimérica. No caso da oxidação, quando acontece a remoção de um elétron da cadeia, há a formação de um cátion radical (chamado de pólaron) (Fig. 3b); a redistribuição de elétrons π distorce a molécula localmente, com os anéis aromáticos passando para a forma quinoide. Quando um segundo elétron é removido do pólaron, ocorre a formação

de um bipólaron (dicátion) (Fig. 3c). Estudos demonstram que o bipólaron é termodinamicamente mais estável do que dois pólarons próximos, devido à repulsão coulômbica de duas cargas confinadas em um mesmo sítio (FAEZ et al., 2000; MEDEIROS et al., 2012b).

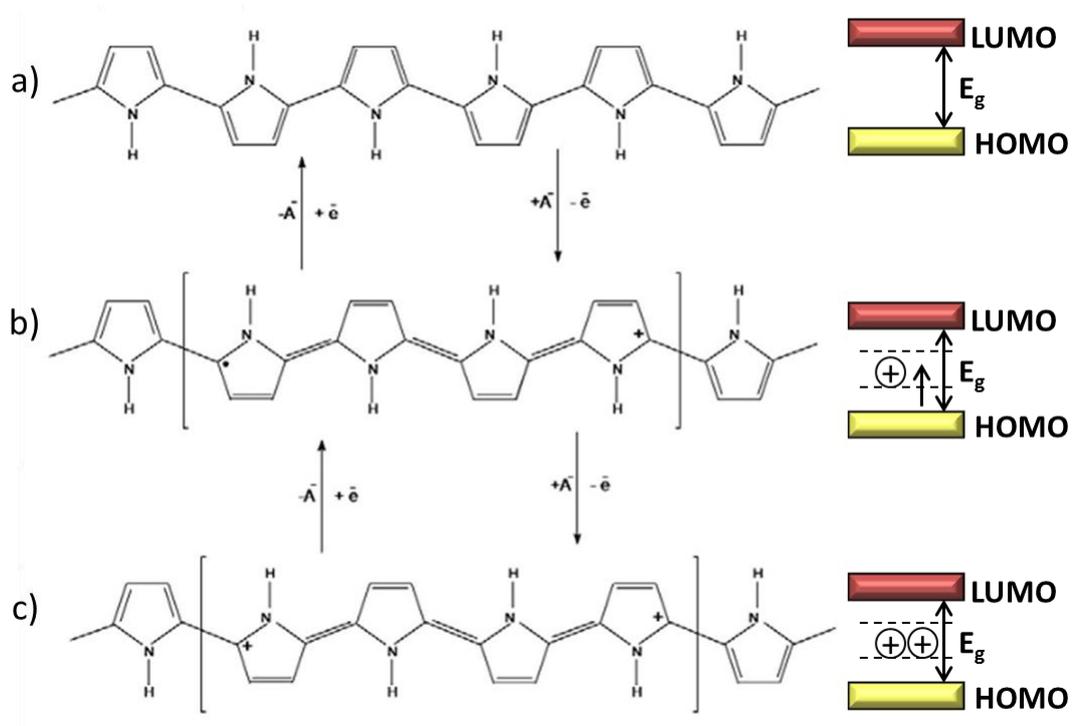


Figura 3 Esquema dos defeitos estruturais e da faixa proibida (gap) do polipirrol neutro (a), pólaron (b) e bipólaron (c).

Muito embora exista uma grande diversidade de polímeros condutores, nesta dissertação iremos tratar especificamente da polianilina e do polipirrol, os polímeros base de nosso estudo.

2.2.1.2 Polianilina

A polianilina (PANI) é obtida pela polimerização do monômero anilina, cuja fórmula estrutural é mostrada na Figura 4. A PANI se constitui na classe especial dos polímeros condutores que podem ser dopados por protonação (ou seja, incorporação de prótons, sem a mudança do número de elétrons da cadeia polimérica) (MATTOSO, 1996). Este polímero e seus derivados vêm ganhando grande destaque nos últimos anos

devido à sua estabilidade química e ambiental, boa processabilidade, facilidade de polimerização e dopagem, e o baixo custo de seu monômero. Estas propriedades fazem da polianilina um polímero promissor para várias aplicações tecnológicas, sendo inclusive, já empregado há muito tempo na indústria (FRANÇA; DALL'ANTONIA, 2007; MATTOSO, 1996).

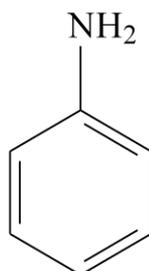


Figura 4 Estrutura molecular da anilina.

Na literatura científica, a polianilina (conhecida como negro de anilina - aniline black) foi descrita pela primeira vez em 1862 por H. Letherby, muito embora fosse conhecida desde 1834, quando era usada, provavelmente, para tingir algodão. No início do século XX, vários químicos orgânicos começaram a investigar a constituição do negro de anilina, e Green e Woodhead descreveram muitos aspectos da polimerização oxidativa e os diferentes estados de oxidação da polianilina.

Depois de algumas décadas, alguns artigos foram publicados analisando o efeito de ácidos sobre suas propriedades eletroquímicas e em sua condutividade, mas sem progressos significativos. Tais avanços só vieram a ocorrer após o descobrimento dos PICs, fazendo com que a polianilina fosse o primeiro polímero condutor a encontrar aplicações comerciais (MEDEIROS et al., 2012b; NEVES, 1997).

Sua composição química (na forma não dopada) é representada por uma estrutura geral formada, respectivamente, por y e $(1-y)$ unidades repetitivas das espécies reduzida e oxidada (Fig. 5).

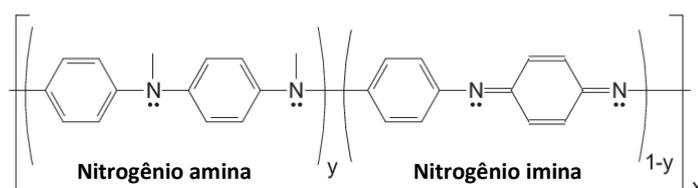
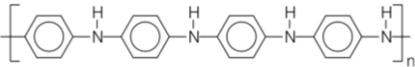
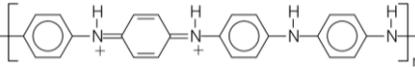
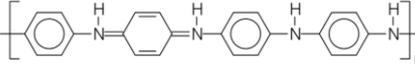
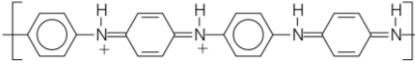


Figura 5 Estrutura da polianilina na forma de base (não dopada).

O valor de y pode variar continuamente entre 0 e 1. Quando $y = 1$, obtém-se um polímero completamente reduzido, que apresenta apenas nitrogênios amina. Quando $y = 0$, obtém-se um polímero completamente oxidado, que contém apenas nitrogênios imina. A polianilina pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, sendo as principais a leucoesmeraldina (forma totalmente reduzida), a base esmeraldina e o sal esmeraldina (formas parcialmente oxidadas), e a pernigranilina (forma totalmente oxidada) (Tabela 2) (MAIA et al., 2000).

Tabela 2 Os quatro estados de oxidação mais importantes da polianilina: leucoesmeraldina, esmeraldina (isolante e condutora) e pernigranilina.

Estado de Oxidação	Estrutura	Absorção máxima (nm)	Cor	Característica
Leucoesmeraldina		310	Amarela	Isolante (completamente reduzida)
Sal esmeraldina		320,420, 800	Verde	Condutora (parcialmente oxidada)
Base esmeraldina		320,620	Azul	Isolante (parcialmente oxidada)
Pernigranilina		320,530	Púrpura	Isolante (completamente oxidada)

Fonte: FAEZ et al., 2000

A fórmula geral descreve apenas as estruturas básicas do polímero. No entanto, quando a PANI é dopada por protonação os nitrogênios imínicos e amínicos podem ser total ou parcialmente protonados, a depender do pH da solução. Diferentemente dos outros polímeros poliaromáticos, o estado completamente oxidado da polianilina não é condutor, mas o estado moderadamente oxidado se torna condutor, quando protonado. O sal esmeraldina é a forma estrutural onde a polianilina alcança os maiores valores de condutividade (MAIA et al., 2000; MEDEIROS et al., 2012b).

A polimerização é um processo onde unidades monoméricas se ligam, uma a uma, para formar uma macromolécula linear. A polimerização em cadeia acontece em três etapas: iniciação (geração do centro ativo), propagação (crescimento da cadeia e transferência do centro ativo de monômero em monômero) e terminação (desaparecimento do centro ativo) (CALLISTER; RETHWISCH, 2007). Na Figura 6 são mostradas os mecanismos da síntese eletroquímica da polianilina.

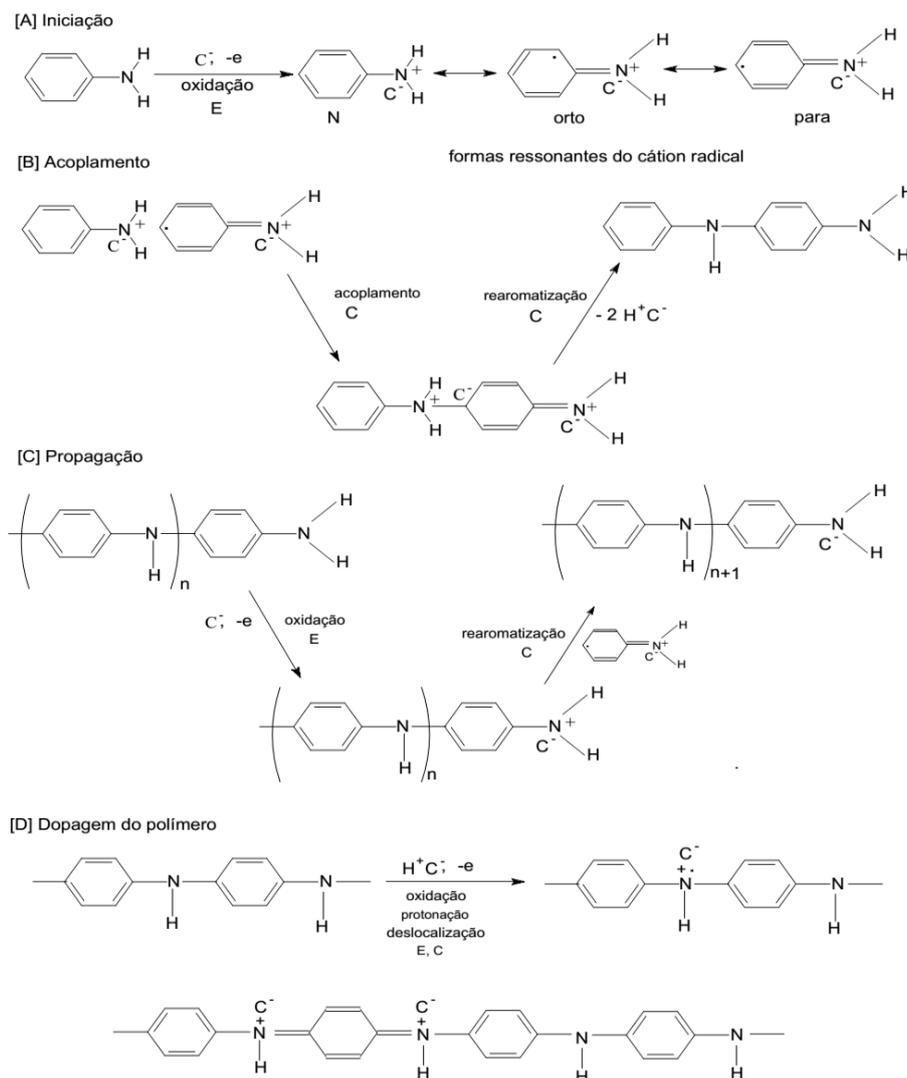


Figura 6 Etapas de polimerização eletroquímica e dopagem da polianilina (MEDEIROS et al., 2012).

A polianilina pode ser sintetizada através de oxidação química ou eletroquímica em meio ácido, com a escolha do método a ser utilizado dependendo da aplicação pretendida. A síntese química da polianilina pode ser realizada utilizando-se uma variedade de agentes oxidantes (como o $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), MnO_2 , Cr_2O_4 , H_2O_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KClO_3) e meios ácidos. Alguns dos meios ácidos utilizados são: inorgânicos (HCl ,

H₂SO₄, H₂PO₄, HClO₄, HPF₆), poliácidos (poli(vinil sulfônico) - PVS e poli(estireno sulfônico) – PSS) e ácidos funcionalizados (cânforssulfônico - CSA e dodecilbenzeno sulfônico - DBSA). O sistema mais utilizado é o persulfato de amônio em soluções aquosas de HCl com pH entre 0 e 2, por apresentar bom rendimento e condutividade ao polímero sintetizado (Fig. 7) (FAEZ et al., 2000; FRANÇA; DALL'ANTONIA, 2007).

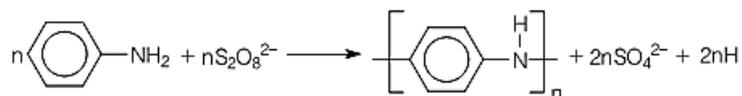


Figura 7 Principal método de síntese da polianilina (FAEZ et al., 2000).

A síntese eletroquímica acontece pela oxidação anódica da anilina em um eletrodo de metal inerte como a platina ou o ouro, vidro condutor ou outros materiais, como o carbono vítreo. Os métodos de eletropolimerização mais utilizados são os de corrente e potencial controlados. O eletrólito deve ser uma solução ácida (HCl, H₂SO₄, HNO₃ etc.) o que influencia em propriedades como condutividade, massa molar, solubilidade do polímero produzido (MEDEIROS et al., 2012).

Devido à facilidade e à versatilidade dos métodos de síntese da polianilina (e de seus derivados), ela pode ser preparada de modo a apresentar características específicas, dependendo do dopante escolhido e/ou das condições utilizadas (FRANÇA; DALL'ANTONIA, 2007). Quando a base esmeraldina (EB) (isolante) se encontra na presença de um ácido de Brönsted (ou seja, uma espécie doadora de prótons), ocorre a formação de um sal de esmeraldina (ES). O ácido comumente usado é o HCl, que possui um alto grau de dissociação em meio aquoso, sendo portanto um ácido forte (MEDEIROS et al., 2012b). A reação de protonação ocorre principalmente nos nitrogênios imínicos da polianilina. Além da elevada condutividade elétrica (que pode chegar a ser de ordem de 10² S.cm⁻¹), outra propriedade interessante da polianilina é a capacidade de exibir diferentes colorações quando são variadas as condições de pH ou o potencial elétrico. Em geral, a condutividade aumenta com o aumento na temperatura, massa molar, umidade, nível de dopagem e graus de cristalinidade e de estiramento (FAEZ et al., 2000; MEDEIROS et al., 2012b).

Devido a essas propriedades da PANI encontrou uso em muitas aplicações tecnológicas, como na blindagem eletromagnética (EL-SHAZLY; AL-TURAIIF, 2012; MUTHUKUMAR; THILAGAVATHI; KANNAIAN, 2015), e desenvolvimento de supercapacitores (SALUNKHE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015), fotodetectores UV

(WANG et al., 2016), células solares (GIZZIE et al., 2016; PARK et al., 2015), músculos artificiais (ZHANG et al., 2018), dentre muitas outras.

2.2.1.3 Polipirrol

O polipirrol (PPY) é obtido pela polimerização do monômero pirrol, cuja fórmula estrutural está representada na Fig 8. Assim como as polianilinas, o PPY e seus derivados são um dos polímeros condutores mais estudados (MEDEIROS et al., 2012b). Ele é particularmente promissor devido à sua boa estabilidade ambiental, fácil síntese e alta condutividade, quando comparado a muitos outros polímeros condutores (CHOUGULE et al., 2011). O PPY permanece estável não apenas em condições ambientais normais, mas, se mantida inerte a atmosfera, suporta temperaturas elevadas, devido a seu baixo potencial de oxidação.

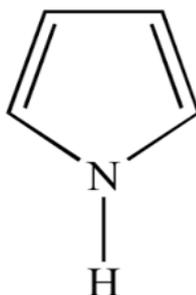


Figura 8 Estrutura molecular do pirrol.

A síntese química do polipirrol foi realizada pela primeira vez por A. Angeli e L. Alessandro, em 1916, usando o peróxido de hidrogênio como oxidante e uma solução ácida. No entanto, mais de 50 anos se passaram, até que em 1968 o primeiro artigo foi publicado descrevendo sua síntese e suas propriedades condutoras. Essa síntese foi realizada pelo método eletroquímico, usando eletrodos de platina e uma solução de pirrol em ácido sulfúrico 0,1 N, do que resultou o primeiro filme de polipirrol estável (MEDEIROS et al., 2012b). Em 1979, também por via eletroquímica, Diaz e Kanazaw, conseguiram obter filmes espessos de polipirrol que apresentavam boas propriedades elétricas, forte adesão a alguns metais e boa estabilidade, despertando assim o interesse pelo estudo desse polímero (DIAZ; KANAZAW, 1979).

Devido a essas boas propriedades e às melhorias associadas ao uso de solventes orgânicos e eletrólitos diferentes, a polimerização eletroquímica se tornou o método

mais utilizado na síntese do polipirrol. Na Fig. 9 é ilustrado o mecanismo de polimerização eletroquímica do polipirrol.

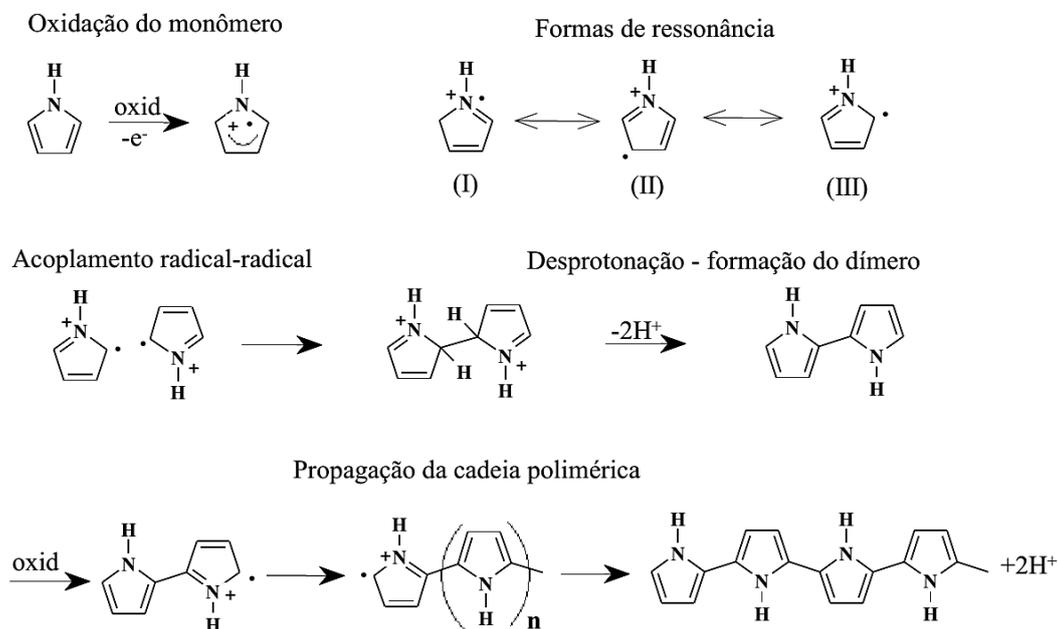


Figura 9 Mecanismo de polimerização eletroquímica do pirrol (SILVA, 2010).

A polimerização eletroquímica é iniciada com a oxidação do monômero pirrol a radical cátion (centro ativo) no ânodo. A partir daí, os monômeros vão se juntando através do acoplamento dos radicais e começa o alongamento da cadeia. Quando a cadeia atinge um determinado tamanho, ela se torna insolúvel e começa a precipitar sobre o ânodo, o eletrodo de trabalho. Os polímeros condutores são preparados, eletroquimicamente na presença de solvente adequado na presença de eletrólitos e do contra-ânion de dopagem (SILVA, 2010). Os contra-íons que são incorporados à síntese para que seja mantida a eletro-neutralidade do sistema, o que influencia fortemente as propriedades do material, sendo possível a modulação dessas propriedades conforme a aplicação desejada (ARANTES et al., 2008).

O PPY também pode ser polimerizado quimicamente, sendo o cloreto férrico o oxidante mais utilizado, (o persulfato de amônio pode ser também usado, assim como na síntese da polianilina). Por sua vez, a escolha do solvente é limitada, uma vez que este deve ser compatível com o monômero e o agente oxidante. A síntese química é de grande interesse, pois é mais fácil de ser realizada em grande escala e resulta na formação de pós ou dispersões coloidais (MEDEIROS et al., 2012b).

O mecanismo de condução do polipirrol também se baseia na criação de defeitos conformacionais. Durante a síntese do polímero, a aplicação do campo positivo, leva à formação dos pólarons e dos bipólarons. No estado de oxidação mais baixo há a formação dos pólarons e bipólarons, enquanto que nos estados de oxidação mais altos há a formação dos bipólarons, pois ocorre a retirada de um elétron do nível polarônico, o que gera o bipólarons (Fig. 10). Essas estruturas são responsáveis pela condução elétrica, pois levam ao aparecimento dos estados eletrônicos no meio da banda proibida de energia, o que facilita a passagem de elétrons da BV para a BC (MEDEIROS et al., 2012b; SILVA, 2010).

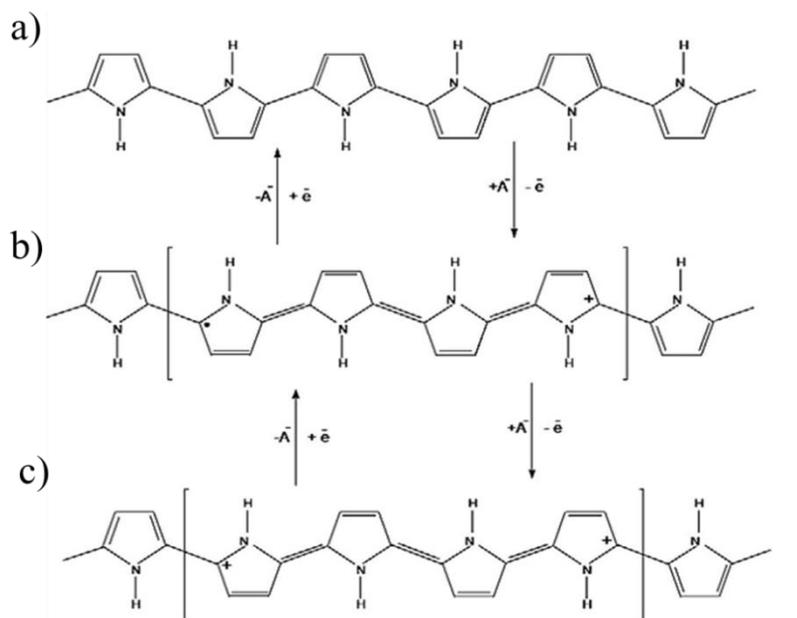


Figura 10 Esquema dos defeitos estruturais do polipirrol neutro (isolante) (a) polaron (condutora) (b) e bipolaron (condutora) (c).

Juntamente com a polianilina, o polipirrol e seus derivados representam a classe de PICs mais estudadas e investigadas para aplicações tecnológicas. O PPY encontra aplicação em sensores eletroquímicos (DAI et al., 2016), dispositivos eletrocromáticos (DE PAOLI et al., 1999; DULGERBAKI; OKSUZ, 2016) e sensores de gás (NAVALE et al., 2014; PARK et al., 2014; RAD et al., 2015). Ele pode ainda ser usado na construção de supercapacitores (SHI et al., 2014), membranas funcionais (ZHAO et al., 2015), e em revestimentos anticorrosivos (ARAVINDAN; SANGARANARAYANAN, 2016; PAN et al., 2016), entre outras aplicações.

2.3 Fluorescência

Existem materiais que absorvem energia e a reemitem na forma de luz, no evento conhecido como luminescência, que corresponde à emissão de fótons na região ultravioleta, visível ou infravermelho por uma espécie eletronicamente excitada. O termo vem do latim *lumen*, que significa luz. A luminescência é conhecida também como “luz fria”, por não requerer altas temperaturas e não produzir calor perceptível, ao contrário do caso da incandescência. De acordo com o modo de excitação, a luminescência pode ser classificada em: fotoluminescência (absorção de luz), radioluminescência (radiação ionizante), catodoluminescência (raios catódicos), eletroluminescência (campo elétrico), quimioluminescência (processos químicos) e bioluminescência (processos bioquímicos) (Fig. 11) (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; LAKOWICZ, 2006).

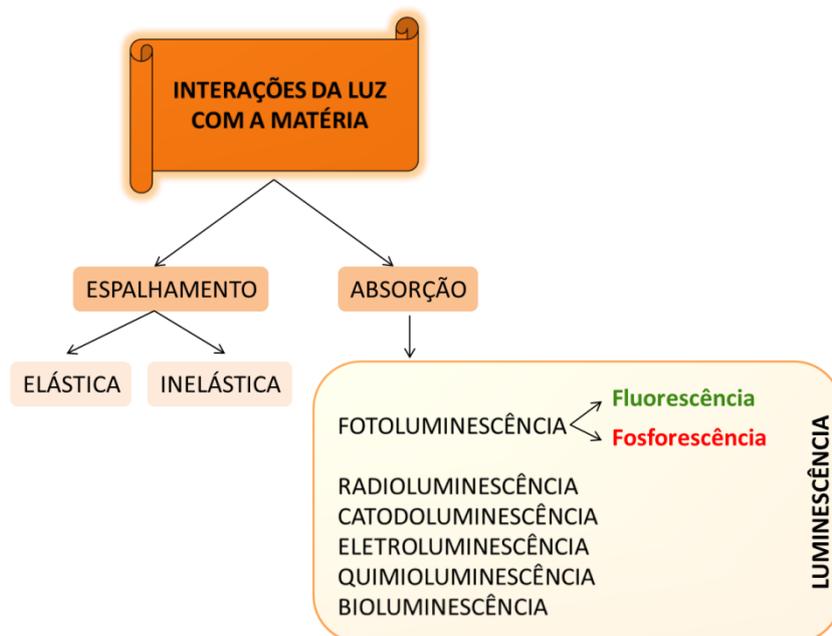


Figura 11 Interações da luz com a matéria.

O termo luminescência foi introduzido em 1888 pelo físico alemão Eilhard Wiedemann, para descrever todos os fenômenos de luz, exceto os relativos ao aumento da temperatura, ou seja, os fenômenos incandescentes. Mas, antes da introdução desse termo, outra expressão já tinha sido usada, a fluorescência, por Gabriel Stokes, físico e matemático escocês, que em 1852 deu a primeira explicação para o fenômeno da emissão observando o efeito da luz ultravioleta sobre o quartzo (VALEUR, 2001).

A fotoluminescência, que trata da emissão de luz através da absorção de fótons, pode ser dividida em fluorescência e fosforescência. A diferença entre elas depende da amplitude do tempo de atraso entre os fenômenos de absorção e remissão, ou seja, da duração da emissão após o fim da excitação. Quando a emissão de luz cessa simultaneamente ao fim da excitação, ocorrendo em tempos inferiores a um segundo (10^8 s^{-1}), esse fenômeno é conhecido como fluorescência. Se esse tempo for mais longo (10^3 a 10^0 s^{-1}), o fenômeno será descrito como fosforescência, onde a luz emitida permanece após o fim da excitação. Por um longo tempo depois da inserção do termo fluorescência, a diferenciação entre fluorescência e fosforescência foi fundamentada dessa maneira (CALLISTER; RETHWISCH, 2007; LAKOWICZ, 2006).

Mas, por volta de 1929, Francis Perrin dava início às discussões sobre a fosforescência propondo a presença de um estado metaestável antes da emissão das espécies excitadas. Em 1935, o Professor Alexander Jablonski explicou os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão de luz. O diagrama Perrin-Jablonski (Fig. 12) é apropriado para visualizar de forma simples esses processos: absorção de fótons, conversão interna, fluorescência, cruzamento intersistema e fosforescência. Esse diagrama é empregado em uma diversidade de formas, para demonstrar os vários processos moleculares que podem ocorrer em estados excitados (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2001; VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2011).

As linhas horizontais indicam os níveis vibracionais de um determinado estado eletrônico. O diagrama mostra os diferentes níveis de energia para uma molécula fotoluminescente. O nível S_0 representa o estado singlete fundamental, já o S_1 e S_2 são estados singletos excitados, e T_1 o estado tripleto. É chamado de estado singlete aquele em que a multiplicidade ($M=2S+1$) é igual a 1. Isso acontece quando um dos dois elétrons de spins opostos é promovido a um orbital molecular de energia superior e seu spin é, em princípio, inalterado, de modo que o número quântico total de spin ($S = \sum s_i$, com $s_i = +\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$) permanece igual a zero. Já quando o elétron é promovido para um orbital de energia superior e tem seu spin alterado, ou seja, os dois elétrons têm spins paralelos, o número quântico total do spin é 1 e a multiplicidade é 3 (Fig. 13). Esse estado é chamado de estado tripleto porque corresponde a três estados de mesma energia (VALEUR, 2001).

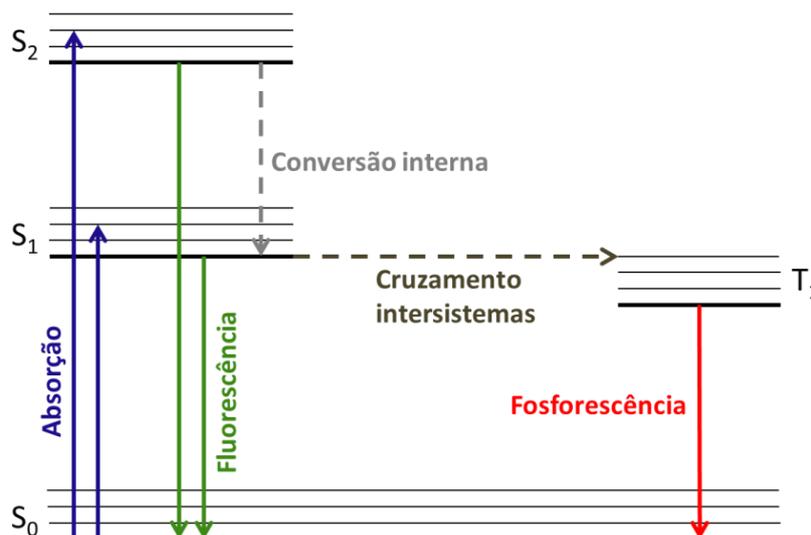


Figura 12 Diagrama simplificado de Perrin-Jablonski. As linhas tracejadas se referem aos processos não radiativos e as linhas contínuas aos processos radiativos (LAKOWICZ, 2006).

Quando há a absorção de fótons, ocorre uma transição do estado fundamental para um estado excitado. O excesso de energia pode ser dissipado através de dois tipos de processos, os radiativos e não radiativos, como a emissão de luz ou a perda de calor, respectivamente. A absorção ocorre de modo rápido (10^{-15} s) se comparado com os outros processos (VALEUR, 2001).

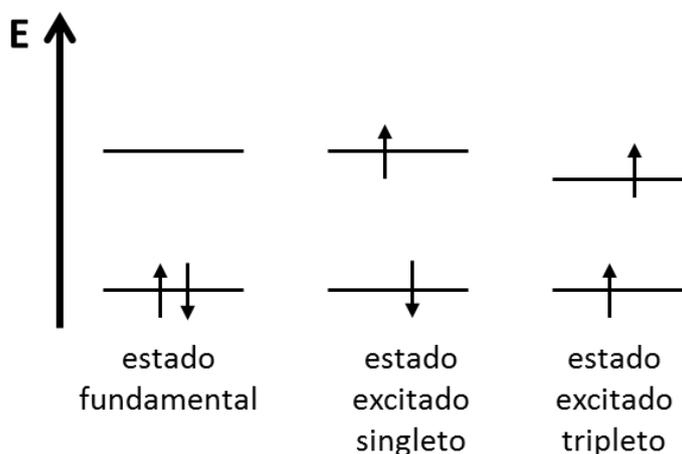


Figura 13 Distinção entre os estados singleto e tripleto (VALEUR, 2001).

A conversão interna é uma transição não radiativa entre dois estados de mesma multiplicidade de spin. Em solução, o excesso de energia vibracional se dissipa imediatamente, como resultado das colisões entre as moléculas excitadas e as do solvente. Esse processo é chamado de relaxamento vibracional. Já a conversão interna (CI) se dá pela passagem de um estado eletrônico de mais alta energia com nível

vibracional mais baixo para um estado eletrônico de mais baixa energia, sem emissão de radiação ($S_2 \rightarrow S_1$).

No cruzamento intersistemas (CIS) há a transição entre dois níveis vibracionais de mesma energia pertencentes a estados eletrônicos de diferentes multiplicidades. Como exemplificado na Figura 11, a transição pode ocorrer do estado S_1 para o estado T_1 , um nível vibracional isoenergético. O CIS pode ser tão rápido ($10^{-7} - 10^{-9}$ s) que pode chegar a competir com outras vias de desexcitação de S_1 (fluorescência e conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$). O cruzamento entre estados de multiplicidades diferentes é proibido, mas em moléculas contendo átomos pesados as interações spin-órbita ficam mais fortes e a mudança de spin é favorecida (VALEUR, 2001).

A fosforescência e a fluorescência são exemplos de transições radiativas. A fosforescência é a emissão de luz através do estado tripleto, cujo o elétron do orbital excitado tem seu spin invertido, para o estado singlete, envolvendo estados de diferentes multiplicidades. A transição $T_1 \rightarrow S_0$ é, em princípio, proibida, mas pode ocorrer devido ao acoplamento spin-órbita; portanto, a taxa de emissão correspondente é lenta (10^3 a 10^0 s⁻¹). Geralmente, em temperatura ambiente, a fosforescência não é observada em soluções líquidas devido à competição com outros processos de desativação, tais como processos não radiativos e supressores (LAKOWICZ, 2006).

Na fluorescência, depois de excitados, os elétrons retornam ao estado fundamental emitindo luz, em um processo que envolve estados de mesma multiplicidade de spin ($S_1 \rightarrow S_0$). Salvo algumas exceções, a emissão de fluorescência ocorre a partir do primeiro estado singlete excitado (S_1) e suas características independem do comprimento de onda de excitação. Analisando o diagrama de Perrin-Jablonski, percebe-se que a energia de absorção é maior que a energia de emissão, uma observação empírica feita por Stokes, precedente ao diagrama, onde pode ser constatado que comprimento de onda de emissão deve ser maior que o comprimento de onda de absorção (VALEUR, 2001).

Vários parâmetros físicos e químicos influenciam a emissão de fluorescência de uma molécula, tais como polaridade, pH, potencial elétrico, ligações de hidrogênio, pressão, viscosidade, temperatura, íons, supressão (VALEUR, 2001). A fluorescência é uma técnica muito empregada na biotecnologia, citometria de fluxo, em diagnósticos médicos, sequenciamento de DNA, forense, imagem celular e análise genética (LAKOWICZ, 2006).

2.3.1 Fluoróforos

Os fluoróforos são moléculas fluorescentes que absorvem energia em um comprimento de onda específico, sendo parte dessa energia emitida em um comprimento de onda mais longo. Quando a molécula absorve energia, os elétrons são excitados e a energia do fóton é transferida para o fluoróforo; o retorno dos elétrons ao estado fundamental ocasiona a emissão de fluorescência (CUNHA; CARVALHO; DODE, 2015; FERREIRA et al., 2014).

Algumas características devem ser respeitadas para que compostos orgânicos sejam fotoluminescentes, como por exemplo, rigidez estrutural, planaridade, e a existência de ligações π conjugadas. Geralmente, a fluorescência ocorre a partir da presença de grupos funcionais aromáticos e/ou anéis condensados (MOTA et al., 2015).

A absorção de energia na faixa do ultravioleta distante pode acontecer em compostos orgânicos que apresentam ligações duplas. Já os compostos com ligações conjugadas absorvem energias menores e em comprimento de onda maior. Então, quanto maior o número de ligações conjugadas, menor será a energia absorvida que pode chegar ao comprimento de onda do visível (FERREIRA et al., 2014). Alguns compostos fluorescentes típicos (fluoróforos) são mostrados na Fig. 14.

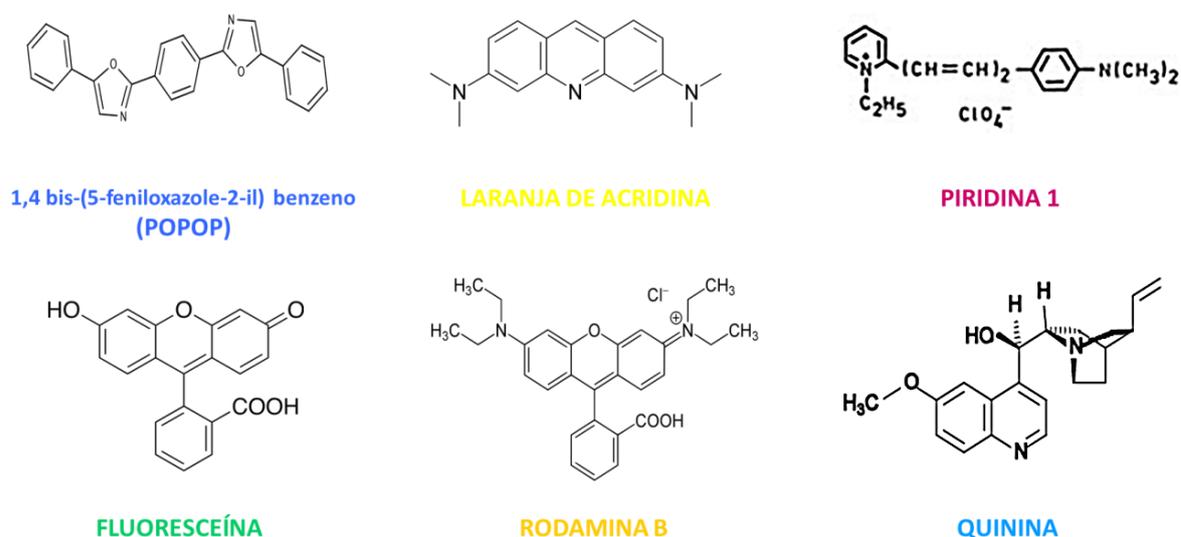


Figura 14 Estruturas dos principais fluoróforos.

Um fluoróforo muito conhecido é a quinina, que está presente na água tônica. Muitos outros também são encontrados no cotidiano, como no brilho verde ou vermelho-alaranjado de anticongelantes, devido a traços de fluoresceína ou rodamina,

respectivamente. A rodamina é frequentemente usada, juntamente com a piridinal, em lasers de corantes. Já o POPOP é utilizado em coquetéis de cintilação e o laranja de acridina é constantemente utilizada como corante de DNA. Alguns outros compostos aromáticos polinucleares também são fluorescentes, como o antraceno e o perileno, que são usados para inspecionar a poluição ambiental associada ao derramamento de óleo (LAKOWICZ, 2006).

A fluoresceína é um dos corantes fluorescente mais importantes. Ela foi descoberta em 1871 por A. Von Baeyer, através da condensação do anidrido ftálico com resorcinol, em meio ácido com $ZnCl_2$, e tem inúmeras aplicações (BATISTELA, 2007; LAKOWICZ, 2006).

A 6-carboxifluoresceína (6-FAM), reagente fluorescente derivado da fluoresceína, é um dos corantes mais comuns (e mais simples) utilizados na síntese de oligonucleotídeos. Esse corante é utilizado em PCR em tempo real, na marcação de primers, em sequenciação e análise de fragmentos, devido ao alto rendimento quântico (0,9) e sua fácil detecção via instrumentos de fluorescência mais comuns, pelo fato de sua absorvância/emissão estar na região visível do espectro (492/517 nm, respectivamente) (STEPAKOV et al., 2015).

2.3.2 Supressão de fluorescência

A supressão (ou “quenching”) de fluorescência é a redução de sua intensidade, que pode acontecer por diversos mecanismos, como supressão estática, supressão colisional ou dinâmica, transferência de energia e transferência de elétrons, entre outros. A supressão estática acontece quando o fluoróforo forma um complexo não fluorescente com o supressor. Ao absorver a luz, esse complexo retorna instantaneamente ao estado fundamental, sem emissão de fótons (FERREIRA et al., 2014).

Na supressão colisional, à desativação do fluoróforo no estado excitado acontece devido ao contato com alguma molécula inibidora em solução, e ele retorna ao estado fundamental. As moléculas têm suas propriedades químicas inalteradas nesse processo, ou seja, sem que ocorra nenhuma reação fotoquímica. Nesses dois tipos de supressão, há a necessidade de contato entre o fluoróforo e o supressor para que ocorra a inibição de fluorescência (VALEUR, 2001).

Dois diferentes mecanismos são responsáveis pela extinção de fluorescência quando há certa distância entre o fluoróforo e a molécula considerada de supressão, a

transferência de energia de ressonância de Förster (FRET) e a transferência de elétrons fotoinduzida (PET). Para que ocorra uma transferência de energia, se faz necessário a interação entre uma molécula doadora (D) e uma molécula receptora (R). No FRET, acontece a transferência de um doador para um receptor, o fluoróforo. Já para o caso do PET, é preciso que ocorra uma interação (tipo van der Waals) para haver a extinção eficiente a uma dada separação entre D e R que deve estar na escala subnanométrica (DOOSE; NEUWEILER; SAUER, 2009).

Essa transferência pode ocorrer quando o espectro de emissão da molécula doadora se sobrepõe ao espectro de absorção da molécula receptora (Fig. 15). Desse modo, as transições vibracionais do D têm aproximadamente a mesma energia que as transições do R. Esse é um processo não radiativo, que não envolve a emissão e nem a reabsorção de fótons.

Esse fenômeno corresponde à chamada transferência de energia de ressonância de Förster (FRET), que pode acontecer através de vários mecanismos de interação, como interações coulômbicas e/ou devido à sobreposição orbital intermolecular. As interações coulômbicas, consistem em interações do tipo dipolo-dipolo de longo alcance. Já a sobreposição orbital intermolecular abrange a troca de elétrons e as interações de ressonância de carga de curto alcance (VALEUR, 2001). Para que aconteça uma maior eficiência do fenômeno FRET é necessário que o doador e o receptor atendam a algumas condições, tal como uma considerável sobreposição entre o espectro de emissão dos doadores ao espectro de absorção do aceitador. Para isso, o doador e o receptor devem estar relativamente próximos um do outro, isto é, a distância de separação entre eles deve situar-se na faixa de 1-10 nm, quando o rendimento quântico do processo se torna razoavelmente alto (SZÖLLÖSI; ALEXANDER, 2003).

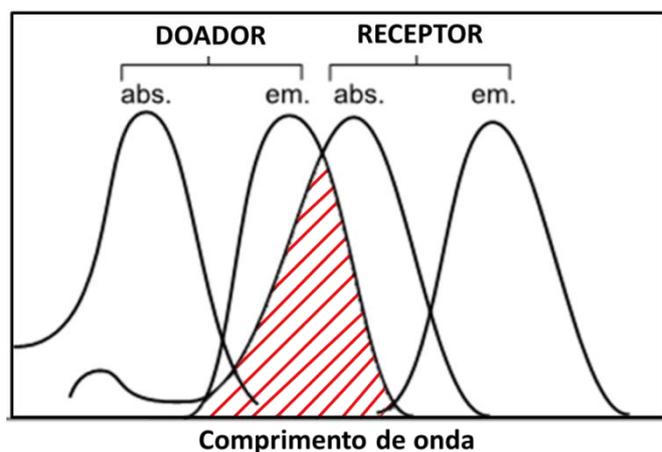


Figura 15 Esquema de nível de energia de moléculas doadoras e receptoras mostrando as transições acopladas (VALEUR, 2001).

No fenômeno PET, um complexo entre o doador e o receptor de elétrons é formado. Quando acontece a transferência de elétrons, o sensor está no seu “estado desligado” e, com a excitação do fluoróforo, ocorre a transferência de elétrons do receptor para o fluoróforo; desse modo, a excitação do fluoróforo deve proporcionar a redução do receptor e a oxidação do doador. No “estado ligado”, a excitação do receptor (fluoróforo) resulta em fluorescência, com o que o PET é impedido, devido à ligação do analito (A) ao doador. Essa ligação entre o analito e o doador faz com que a ocorrência da PET não seja mais termodinamicamente favorecida (Fig. 16). Para esse processo, o fluoróforo excitado pode ser o doador ou o aceitador de elétrons, a depender do potencial de oxidação e redução de cada um. Já no FRET, os fluoróforos são sempre os doadores (DE SILVA; MOODY; WRIGHT, 2009; LAKOWICZ, 2006).

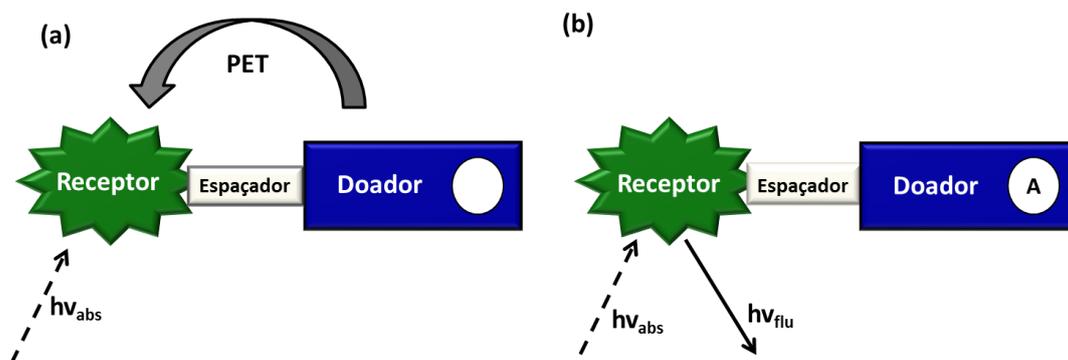


Figura 16 Componentes sensor de PET. (a) “Estado desligado”, transferência de elétrons a partir do doador livre para o receptor, (b) “Estado ligado”, a transferência de elétrons a partir do doador é bloqueada devido a ligação do analito.

Atualmente, técnicas de fluorescência baseadas em FRET, ou mecanismos de supressão de fluorescência como PET, têm recebido grande destaque para a criação de novos sensores e na detecção de ácidos nucleicos (DE SILVA; MOODY; WRIGHT, 2009; LIU et al., 2011). São exemplos, a aplicação da transferência de energia de ressonância de Förster (FRET) em um sensor utilizando óxido de grafeno para a detecção de *Helicobacter pylori* (LIU; SU, 2017), um sensor de polipirrol para detecção de DNA de HIV (LU et al., 2011), e nanolâminas de MoS₂ para detecção de DNA. Por sua vez, com base na transferência fotoinduzida de elétrons (PET) existem vários tipos de sensores, como um sensor de PANI para detecção de ácido nucleico (LIU et al., 2011), um sensor utilizando nanocompósitos de carbono para detecção de DNA (TAN et al., 2016), e um sensor baseado em MOF para a detecção de DNA do vírus HIV (YANG et al., 2015).

2.4 Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos, que são as moléculas portadoras da informação genética, apresentam a capacidade de armazená-la e transmiti-la de geração em geração. O nome ácido nucleico tem origem nas substâncias ácidas encontradas no núcleo celular. Os grandes representantes desse grupo são o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA) (NELSON; COX, 2013), descobertos por Friedrich Miescher, em 1868, através de trabalhos com células de pus obtidas de ataduras cirúrgicas descartadas. Apenas em 1940, é que se consolidaram as descobertas sobre a química e a biologia dessas moléculas (BRYCE; PACINI, 1998).

Os ácidos nucléicos são polímeros constituídos por uma matriz linear com monómeros ligados covalentemente, os nucleotídeos (BRYCE; PACINI, 1998). Os nucleotídeos são constituídos por três componentes: um grupo fosfato, uma pentose (açúcar com 5 carbonos) e uma base nitrogenada (Fig 17).

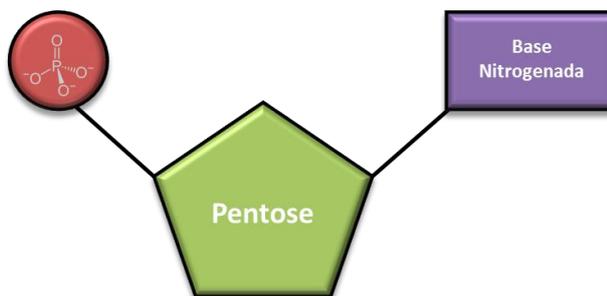


Figura 17 Constituição do nucleotídeo.

As pentoses encontradas nos ácidos nucleicos podem ser de dois tipos: a ribose (RNA) e a desoxirribose (DNA). Elas se diferenciam pela presença do grupamento hidroxila (-OH), pois só a ribose contém esse grupo (Fig. 18a), como indicado pelo prefixo 'desoxi'. As bases nitrogenadas são moléculas aromáticas e heterocíclicas que contêm nitrogênio, e podem ser divididas em dois grupos: as purinas composta por dois anéis (adenina e guanina), e as pirimidinas com apenas um anel (citosina, timina, uracila) (Fig. 18b). Elas podem ser representadas por letras, como A (adenina) e G (guanina), C (citosina), como a T (timina) estando presente apenas no DNA, e a U (uracila) apenas no RNA (BRYCE; PACINI, 1998; NELSON; COX, 2013).

Os nucleotídeos do DNA e do RNA são unidos por ligações fosfodiéster, com o grupo fosfato de um nucleotídeo sendo ligado a um grupo hidroxila de um nucleotídeo

vizinho. Essas ligações entre nucleotídeos formam o esqueleto covalente dos ácidos nucleicos, que consiste em fosfatos e pentoses alternadas e tem um caráter hidrofílico. Já as bases nitrogenadas se posicionam como grupos laterais ao esqueleto. As ligações fosfodiéster têm a mesma orientação ao longo da cadeia, o que concede à fita uma polaridade específica e extremidades 5' e 3' diferentes. Por definição, o carbono 5 (5') da pentose está ligado a um grupo fosfato e não apresenta nenhum nucleotídeo ligado, já a extremidade 3' (carbono 3 da pentose) está ligada ao grupo hidroxila e a nenhum nucleotídeo (Fig. 19a) (NELSON; COX, 2013).

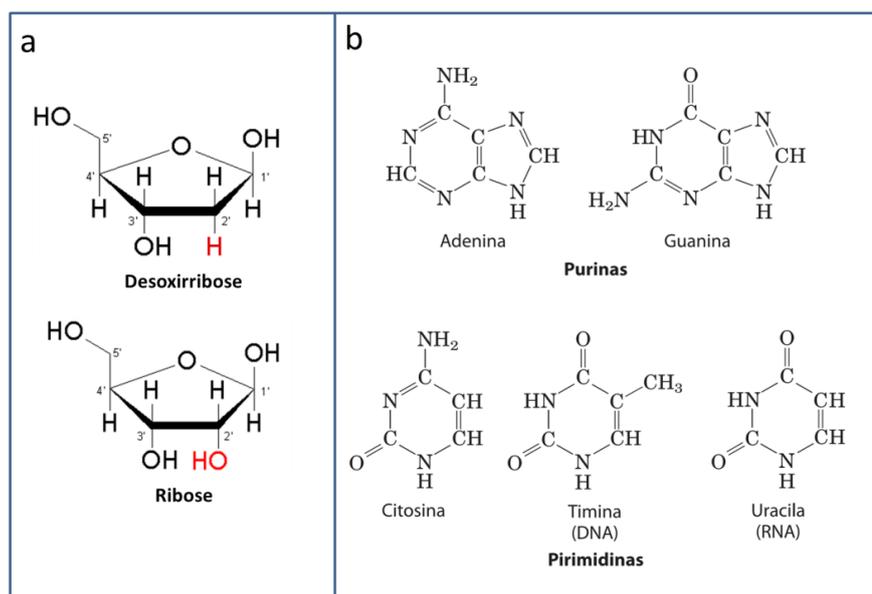


Figura 18 Estrutura química da desoxirribose e ribose (a) e das bases nitrogenadas (b).

O esqueleto covalente é susceptível à hidrólise lenta e não enzimática das ligações fosfodiéster. O RNA é facilmente hidrolisado em meio básico, ao contrário do DNA. Essa hidrólise acontece devido ao fato do RNA possuir o grupo 2'-OH (hidroxila ligada ao carbono 2 da pentose), que é rapidamente hidrolisado. O DNA não contém esse grupamento, e esta estabilidade química faz com que essa molécula (e não o RNA) seja o arquivo genético celular (NELSON; COX, 2013; VOET; VOET, 2013).

O DNA e o RNA demonstram diferenças quanto à composição química e também em relação a sua estrutura molecular, pois o DNA deve ter a capacidade de reprodução do seu material genético.

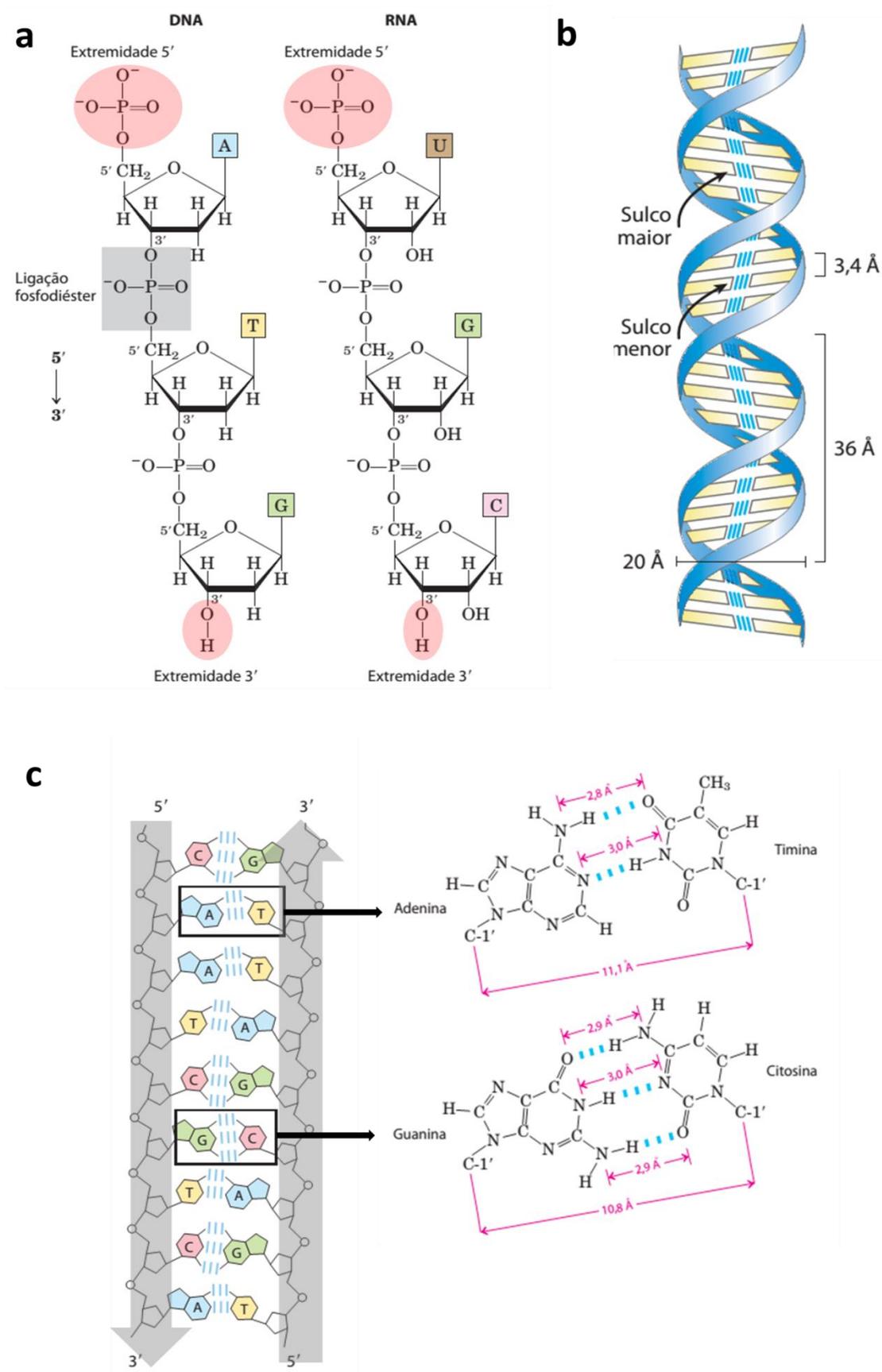


Figura 19 Ligações fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA e do RNA (a), representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice e ligações de hidrogênio (linha azuis) no pareamento de bases definido por Watson e Crick (c) (NELSON; COX, 2013).

Em 1953, James D. Watson e Francis C. Crick, postularam um modelo tridimensional do DNA, deduzindo essa estrutura a partir de estudos de difração por raios X, realizados por Rosalind Franklin. Esse fato marcou o nascimento da biologia molecular moderna. Watson e Crick apresentaram um modelo que atendia os seguintes preceitos: (a) a molécula de DNA é uma longa fita de nucleotídeos, tendo uma estrutura helicoidal análoga à de uma escada de caracol (Fig. 19b); (b) nessa escada, o açúcar e o fosfato são os componentes verticais (corrimãos) e as bases nitrogenadas são os degraus; (c) tal modelo também requer que as duas fitas polinucleotídicas sejam antiparalelas, isto é, corram em direções opostas: uma da extremidade 5' para a extremidade 3' (5'→3') e a outra na direção 3'→5' (Fig. 19c). Por essas descobertas, em 1962, Watson e Crick receberam o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

A formação da dupla hélice, ou seja, o pareamento perfeito entre as duas fitas polinucleotídicas, gera um sulco maior e um sulco menor na superfície dessa dupla hélice (Fig. 19b). O espaço ocupado por duas bases opostas é pequeno, obrigando a combinação entre uma base grande (púrica) e outra pequena (pirimídica). Watson e Crick descobriram que as bases nitrogenadas de uma fita estavam unidas no mesmo plano com as bases da outra fita através de ligações de hidrogênio. Essas interações acontecem entre a A-T e entre G-C no DNA, por serem combinações mais estáveis. A adenina faz duas ligações de hidrogênio com a timina e a guanina faz três ligações com a citosina (Fig. 19c). O DNA possui o mesmo número de resíduos de adenina e timina e números iguais de resíduos de guanina e citosina. Essa denominação é conhecida como a regra de Chargaff, que fora descoberta em 1940 e que especifica que $A + G$ (purinas) = $T + C$ (pirimidinas) (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013; NELSON; COX, 2013).

A relação entre os pares de base G+C/A+T é igual em todos os indivíduos da mesma espécie, mas varia de uma espécie para outra. A estrutura molecular do DNA apresenta muitas características essenciais, como possibilitar o armazenamento e codificação de uma grande quantidade de informações, poder ser replicada, conter mecanismos de defesa contra perda de informação genética e permitir a hibridização (junção de fitas complementares de DNA em meio a uma mistura de moléculas complexas) (BORGES-OSÓRIO; ROBINSON, 2013).

Ainda na década de 1950, o RNA, foi identificado como sendo o carregador da informação genética do DNA no núcleo para o citoplasma, na complexa maquinaria

biossintética proteica do ribossomo. No entanto, apenas em 1961 foi que François Jacob e Jacques Monod conseguiram apresentar uma descrição consistente de muitos aspectos desse processo. Na síntese proteica são utilizados três tipos de RNA: o RNA mensageiro (RNAm), o RNA ribossomal (RNAr) e o RNA transportador (RNAt). O RNAm que é responsável por levar a informação do núcleo para o citoplasma, é formado a partir de um molde de DNA, em um processo chamado de transcrição. O RNAr é um componente dos ribossomos, os complexos que executam a síntese proteica e o RNAt é uma molécula que transporta aminoácidos específicos, eles reconhecem a sequência específica que codifica os aminoácidos, processo chamado de tradução (NELSON; COX, 2013).

Como já referido acima, o RNA difere em alguns aspectos do DNA quanto à composição química, já que o RNA possui ribose no lugar da desoxirribose. O RNA obedece os mesmos pares de base do DNA, tendo apenas uma exceção, com a timina sendo trocada por uracila, formando o par de bases adenina e uracila. Normalmente, o RNA ocorre como uma molécula de fita simples, mas em alguns vírus podem ser encontrados RNAs de fita dupla, que também obedecem às regras de Chargaff (VOET; VOET, 2013). Em essência, enquanto o DNA é o responsável pela informação genética contida nos genes, o RNA é a segunda maior forma dos ácidos nucleicos nas células, é o responsável pela expressão gênica.

2.5 Vírus

Os vírus são organismos muito pequenos (“filtráveis”) e parasitas intracelulares obrigatórios, ou seja, requerem de células hospedeiras vivas para se multiplicarem. O termo vírus vem do latim e significa veneno, termo utilizado pela primeira vez em 1930. Somente em 1935, quando Wendell Stanley, um químico norte-americano, conseguiu isolar o vírus do mosaico do tabaco, se tornou possível o estudo químico e estrutural dos vírus, sendo possível esse estudo, pela invenção do microscópio eletrônico nessa mesma época (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Antes do isolamento do vírus, alguns trabalhos foram cruciais para chegar a essa descoberta. Em 1886, o químico holandês Adolf Mayer conseguiu demonstrar a transmissão da doença do mosaico do tabaco (DMT) de uma planta afetada para uma planta sadia. Em 1892, Dimitri Iwanowiski, um bacteriologista russo, tentou isolar esse microrganismo filtrando a seiva das plantas doentes em filtros de porcelana usado para

reter bactérias, ele verificou que nada ficou preso ao filtro, mas mesmo sim, quando a seiva era injetada em plantas saudáveis provocava a doença. Essas descobertas anteriores, permitiram Wendell Stanley isolar mais tarde esses “agentes filtráveis” (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

As propriedades que diferenciam os vírus de outros microrganismos estão associadas a sua organização estrutural simples e aos mecanismos de multiplicação. As características que definem os vírus são o fato de serem agentes filtráveis, parasitas intracelulares obrigatórios, e não possuem enzimas para a produção de energia ou de proteínas. Sua estrutura é composta por um genoma que pode ser de RNA ou DNA, um invólucro proteico que protege o ácido nucleico (capsídeo) e que pode conter um envelope de lipídeos, proteínas e carboidratos recobrindo o capsídeo (Fig. 20) (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O DNA pode ser de fita simples ou dupla, linear ou circular. O RNA pode ser de sentido positivo (+) (funcionando como RNA mensageiro) ou negativo (–) (análogo a um negativo fotográfico), fita dupla (+/–), ou de duplo sentido. Para a proteção do ácido nucleico, na camada externa dos vírus existem o capsídeo e o envelope. Essas estruturas são o veículo de liberação dos vírus para a transmissão e disseminação em células-alvo dentro do hospedeiro. O capsídeo é uma estrutura rígida que resiste a severas condições ambientais, como a exposição a ácidos e detergentes, ou a ressecamento. Já o envelope é uma membrana composta de lipídeos, proteínas e glicoproteínas, que envolve o capsídeo. Ela é facilmente rompida por ressecamento, condições ácidas, detergentes e solventes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

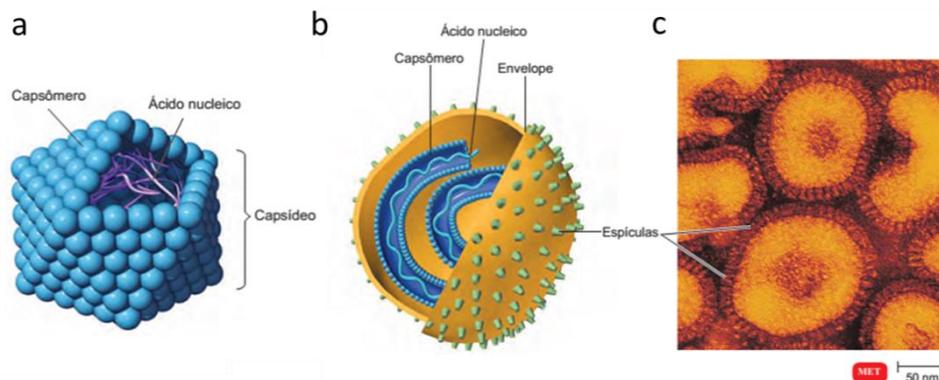


Figura 20 Morfologia dos vírus não envelopados e envelopados. (a) diagrama de um vírus poliédrico (icosaédrico), (b) diagrama de um vírus helicoidal envelopado, (c) Microfotografia do vírus influenza A2 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os vírus são parasitas celulares específicos, infectando determinados tipos de células de uma única espécie de hospedeiro, e podendo infectar invertebrados, vertebrados, plantas, protistas, fungos e bactérias. A infecção na célula hospedeira ocorre através de uma interação química entre a superfície externa do vírus (envelope ou capsídeo) com receptores específicos existentes na superfície da célula alvo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os vírus podem ser agrupados de acordo com algumas características, como a natureza da doença (hepatite, encefalite), o meio de transmissão (entérico, respiratório) ou pelo vetor de sua transmissão (como no caso os arbovírus, ou seja, os vírus transportados por artrópodes). No entanto, a classificação mais utilizada é baseada em características bioquímicas e físicas, como tamanho, morfologia (presença ou ausência de envelope de membrana), tipo de genoma (com DNA de fita dupla, DNA de fita simples, RNA de fita dupla e RNA de fita simples) e formas de replicação (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

2.5.1 Vírus da Zika

O vírus da Zika (ZIKV) é um arbovírus do gênero *Flavivirus* e da família flaviviridae, apresentando associação genética e de proteínas estruturais com outros do gênero *Flavivirus* potencialmente importantes, como o vírus da dengue (DENV), o da febre amarela (YFV) e o do Nilo Ocidental (WNV). Ele é um vírus que apresenta um genoma de RNA com 10,7 kb, de fita simples e sentido positivo. (NICOLINI; MCCRACKEN; YOON, 2017; RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). Pouco tempo atrás, um surto emergente do vírus da Zika nas Américas representou o ressurgimento desse vírus, que se tornou um grave problema de saúde pública (PARDEE et al., 2016).

O primeiro caso do ZIKV foi detectado em 1947, ao ser isolado no sangue de um macaco do gênero *Rhesus*, e em 1948, em mosquitos, ambos encontrados na floresta Zika, em Uganda. Após quatro anos, em 1952, foi identificado o primeiro caso de Zika em humanos. Subsequentemente, ocorreram alguns surtos em regiões do continente africano, asiático e nas Ilhas do Pacífico (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; FAYE et al., 2014).

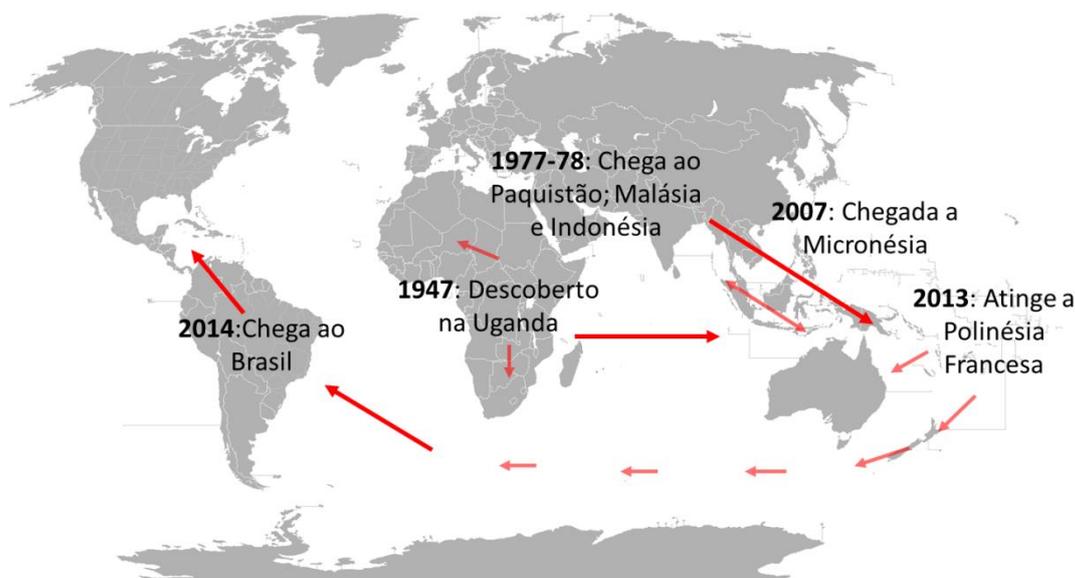


Figura 21 Distribuição do vírus da Zika no mundo adaptado de https://www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/01/160126_zika_brasil_endemica_fd_rp.

Em 2007, o ZIKV foi encontrado fora das regiões da África e Ásia, causando uma epidemia na ilha Yap, na Micronésia. Antes de 2007, apenas 14 casos foram relatados. Na ilha Yap, 73% dos residentes tiveram a infecção com o vírus da Zika, em uma demonstração do potencial dessa doença emergente. Após esse surto, em 2013-2014 a Zika se espalhou para a Polinésia Francesa e outras ilhas do Pacífico, atingindo a América Latina em 2014-2015, e se disseminando para a América do Norte em 2016 (Fig. 21) (FAYE et al., 2014; SONG et al., 2017).

No Brasil, entre o final de 2014 e abril de 2015, os casos começaram a ser relatados e foram logo identificados em algumas regiões. Em maio desse mesmo ano, o Ministério da Saúde reconheceu a circulação do ZIKV no Brasil (CARDOSO et al., 2015). Alguns casos foram primeiramente identificados em Natal-RN, e também em Salvador-BA (CARDOSO et al., 2015; ZANLUCA et al., 2015). Depois, o vírus se alastrou por outros estados do país, como São Paulo, Sergipe, Paraíba, Maranhão, Rio de Janeiro, Ceará, Roraima, Alagoas, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Piauí, Pernambuco e Pará (CUNHA et al., 2016).

Segundo o Boletim Epidemiológico 2018 do Ministério da Saúde, até maio de 2018 foram registrados 3.656 casos prováveis de doença causados pelo vírus Zika no Brasil, com taxa de incidência de 1,8 casos/100 mil hab.; destes, 1.295 (35,4%) foram confirmados. Em 2017, foram registrados 17.594 casos prováveis de doença aguda pelo vírus Zika no país, e em 2016, 216.207. A taxa de incidência de prováveis casos de Zika (número de casos/100 mil hab.), segundo regiões geográficas, confirma que as regiões

Centro-Oeste (6,5 casos/100 mil hab) e Norte (3,3 casos/100 mil hab.) apresentaram as maiores taxas de incidência.

O vírus da Zika é um vírus de RNA, formado por um envelope proteico, um capsídeo e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5). A proteína NS1 é a mais importante, por sua eficiência na secreção, virulência e replicação viral (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016).

O ZIKV é um vírus transmitido pela picada de mosquitos (arbovírus), podendo ter dois ciclos diferentes de transmissão: o ciclo silvestre, envolvendo primatas não humanos e mosquitos arbóreos nas florestas, e o outro, urbano, envolvendo a transmissão do vírus entre humanos e mosquitos urbanos, em cidades. Sua principal via de transmissão se dá através do *Culex quinquefasciatus* e mosquito do gênero *Aedes* (*A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. furcifer*, *A. taylori*, *A. luteocephalus*, *A. apicoargenteus* e *A. africanus*), sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor no Brasil (FAYE et al., 2014; SALGE et al., 2016; SONG et al., 2017). Há evidências que a transmissão do vírus pode acontecer de mãe para recém-nascidos durante a gravidez ou amamentação (como comprovado pela detecção do RNA viral em recém-nascidos e no líquido amniótico, urina ou soro de mães com fetos que tinham anormalidade cerebrais), transmissão sexual entre ambos os sexos (detectado em sêmen urina, saliva e swabs nasofaríngeos) ou por saliva e por transfusão de sangue (SONG et al., 2017).

Não se sabe ao certo o mecanismo de patogenicidade, mas os *Flavivírus* têm certa especificidade por células dendríticas¹, fibroblastos² e queratinócitos³ da epiderme e derme, se replicando nessas células e, posteriormente, dispersando-se para os gânglios linfáticos e a corrente sanguínea. O ciclo proposto para a replicação do ZIKV é baseado em oito passos principais: a ligação (a uma molécula receptora), endocitose (entrada da partícula viral na célula envolto em uma membrana), fusão da membrana (fusão do envelope do vírus com a membrana do endossomo), tradução (transformação da sequência de genes presentes no RNA para a formação proteica), replicação de RNA, montagem (formação dos vírus imaturos), maturação e liberação (CUNHA et al., 2016; SONG et al., 2017).

Embora a suscetibilidade ao vírus seja universal, só cerca de 20-25% das pessoas irão desenvolver a doença clinicamente, com um período de incubação de 4 a 10 dias.

¹ Células do tecido nervoso

² Células do tecido conjuntivo

³ Células do tecido epitelial rica em queratina

Em casos sintomáticos, as manifestações mais comuns são febre transitória de baixo grau, erupção cutânea maculopapular⁴, artrite ou artralgia, e conjuntivite não purulenta, e, em menor frequência, cefaléia, mialgia, edema e vômito. O vírus Zika pode também provocar alguns casos mais graves da doença, como problemas neurológicos, a síndrome de Guillain-Barré em adultos e a microcefalia em bebês nascidos de pacientes infectadas.

A síndrome de Guillain-Barré é uma doença auto-imune, em que o sistema imunológico ataca parte do sistema nervoso periférico, causando formigamento, fraqueza muscular, paralisia, e até a morte. O mecanismo pelo qual a infecção por ZIKV leva à síndrome de Guillain-Barré é desconhecido. Já a microcefalia é uma situação neurológica em que o cérebro do bebê não se desenvolve corretamente e, conseqüentemente, a cabeça do recém-nascido fica menor que o normal. Ela pode ser dividida em dois tipos: a microcefalia primária ou congênita, que está presente no útero ou no nascimento, e a microcefalia secundária ou pós-natal, que se desenvolve após o nascimento (SONG et al., 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os recém-nascidos (RN) com perímetro cefálico igual ou inferior a 32 cm são considerados com microcefalia. O Brasil foi o primeiro país a constatar a relação entre a infecção pelo ZIKV na gestação e a microcefalia RN. Foram detectados casos em 724 municípios do país (SALGE et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial do vírus da Zika é baseado em métodos moleculares (detecção do RNA viral) e em imunoenaios (detecção de anticorpos). No imunoensaio, são utilizados as imunoglobulinas IgG e IgM. Nas infecções por *Flavivírus*, as imunoglobulinas IgM são desenvolvidas no início da doença e podem ser detectadas durante até três meses. Já as IgG são detectadas poucos dias depois do desenvolvimento das IgM, podendo continuar a ser detectadas vários meses depois. O imunoensaio mais empregado é o ELISA. Na detecção molecular pode ocorrer a detecção do vírus em cultura de células, ou pela amplificação molecular usando reação em cadeia da polimerase (PCR). De um modo geral, os ensaios baseados na detecção viral, por métodos moleculares são mais confiáveis do que os imunoenaios, devido à reatividade cruzada entre os anticorpos IgM do ZIKV e alguns *Flavivírus* (DENV, YFV, WNV) (SHUKLA et al., 2016).

⁴ Erupção cutânea que se caracteriza pelo aparecimento de manchas e de pequenas elevações sólida de tonalidade avermelhada.

O período virêmico não está totalmente elucidado, mas se supõe que seja de curta duração, com o RNA viral podendo ser detectado em um período de 4-7 dias após o início dos sintomas. É recomendado pelo Ministério da Saúde que a coleta seja feita preferencialmente até o quinto dia do aparecimento dos sintomas. Muitos sensores para detecção do vírus da Zika foram desenvolvidos usando técnicas de ensaios diversos (Tabela 3).

Tabela 3 Sensores para detecção do vírus Zika

Modo de detecção	Alvo	Limite de detecção	Tempo de ensaio	Ref.
Impedimétrico (Capacitância)	NS1 (flaviviruses)	30 ng/mL 0.5 ng/mL	30 min	CECCHETTO et al., 2017
Quimioluminescência	Proteína E	10 PFU/mL	~2 h	ACHARYA et al., 2016
Colorimétrico	RNA (ZIKV)	1 fM	~3 h	PARDEE et al., 2016
Colorimétrico	RNA (ZIKV)	50-100 PFU/ mL	40 min	SONG et al., 2016
Fluorescente	RNA (ZIKV)	5000 copies/ mL	<30 min	EBOIGBODIN et al., 2016
Capacitância	NS1	450 pM		AFSAHI et al., 2018
Fluorescente	RNA (ZIKV)	192 pM	2 min	XIE et al., 2018

A profilaxia a ser adotada é a mesma que para o caso de dengue, e se baseia no combate ao mosquito *Aedes aegypti*, com a eliminação de criadouros do mosquito (água parada) e o uso de proteção individual com vestimentas cobrindo o corpo e repelente, sendo também aconselhado o uso de telas em janelas e portas (CUNHA et al., 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão mostrados os materiais e métodos utilizados para a confecção de filmes compostos por bicamadas poliméricas através da polimerização da anilina e do pirrol sobre o substrato de poli(tereftalato de etileno)-PET intercalados: i) o polipirrol sobre a polianilina (PANI-PPY/PET) e ii) a polianilina sobre o polipirrol (PPY-PANI/PET), bem como a sua caracterização e os experimentos de sensoriamento.

3.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo usado como recebidos, exceto a anilina e o pirrol, que foram destilados a vácuo antes de sua utilização. Em todas as análises foi utilizada água deionizada obtida através do sistema Synergy (Millipore, EUA).

Álcool isopropílico foi usado para a remoção de impurezas na superfície do poli(tereftalato de etileno)-PET, e persulfato de amônio (APS) e o cloreto férrico foram adotados para a oxidação dos monômeros anilina e pirrol, respectivamente. No anexo A, podem ser encontradas as fórmulas químicas, a procedência e a origem de todos os reagentes empregados neste trabalho.

Os oligonucleotídeos foram sintetizados e purificados pela ThermoFisher Scientific (EUA). As sequências das bases de DNA usadas neste trabalho estão listadas abaixo (bases erradas estão sublinhadas):

Tabela 4 Sequência de nucleotídeos utilizada nos experimentos sobre Zika

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA
DNA marcado com fluoróforo FAM (ssDNA-FAM)	5'- FAM-CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT -3'
DNA complementar (DNAc)	5'- ATG TCT GCA AAA GAA CGT TAG TGG -3'
DNA fita simples não complementar (DNAnc)	5'- ATG GAA TTT CGC CGA TTT TGC -3'
DNA fita simples complementar com uma base errada (T₁)	5'- ATG TCT GCA <u>CAA</u> GAA CGT TAG TGG -3'
DNA fita simples complementar com uma base errada (T₂)	5'- ATG TCT GCA <u>CAC</u> GAA CGT TAG TGG -3'
DNA fita simples não complementar com uma calda de Adenina (Poli-A)	5'-AGG ACC AGA AAA GTT TGG AAAAA...-3'

3.2 Método de preparação dos filmes de bicamada PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET

3.2.1 Preparação das folhas de poli(tereftalato de etileno)- PET

Antes da polimerização, as folhas de PET foram cortadas na forma de quadrados com 45 mm de aresta, lavadas com detergente neutro e água corrente, e depois colocadas em um béquer contendo álcool isopropílico e levadas ao banho ultrassônico por 15 min. Posteriormente, as folhas foram secadas e as máscaras (folhas adesivas) com dimensões de 45 mm x 35 mm, foram afixadas às folhas para delimitar a zona da polimerização. Os filmes PET adesivados foram então fixados em uma suporte de

isopor. Em seguida, as camadas de polianilina (PANI) e polipirrol (PPY) foram depositadas, por polimerização *in situ*, em ordens distintas sobre a superfície do PET.

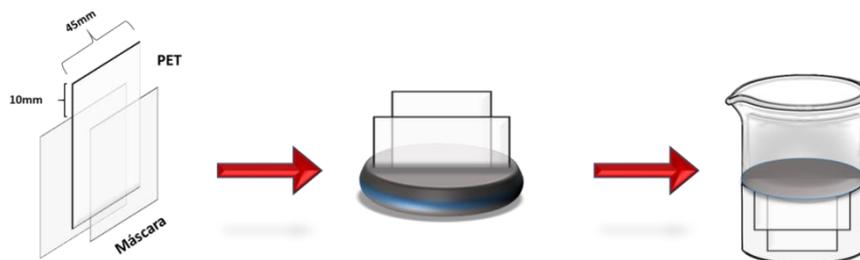


Figura 22 Esquema da preparação e delimitação da área de polimerização

3.2.2 Polimerização *in situ*

Para a síntese da camada de polipirrol foi utilizada uma modificação da polimerização química *in situ* proposta por LU et al (2011). Para isso, em um béquer, foram dissolvidos 69,4 μL de pirrol em 48 mL de ácido clorídrico (HCl, 1M) e em seguida inserida a folha de PET no suporte de isopor. O béquer contendo a solução de pirrol é levado ao agitador orbital a uma velocidade de 85 rpm por 15 min, e a uma temperatura de $\sim 4^\circ\text{C}$. Posteriormente, foram colocados 2 mL do agente oxidante cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1M) no béquer, que foi recolocado no orbital onde ficou sob agitação por 12 horas. Passado esse tempo, o filme é retirado da solução, lavado com água deionizada e seco à temperatura ambiente.

Com os filmes já secos, e crescida uma camada de pirrol, é iniciada a polimerização da anilina, de modo a formar uma bicamada polimérica. A polimerização da anilina seguiu uma adaptação da síntese proposta por CHIOU et al. (2007), com 60 μL de anilina sendo dissolvidos em 40 mL de ácido clorídrico (HCl, 1M). O béquer com a solução foi colocado em banho ultrassônico (USC 1450, Unique, Brasil) por 5 minutos e, retirado em seguida. Os filmes PPY/PET foram colocados no suporte de isopor e invertidos na solução (Fig. 22). Os béqueres contendo os filmes foram então colocados no agitador orbital a uma velocidade de 85 rpm, e a uma temperatura de $\sim 4^\circ\text{C}$. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de persulfato de amônio (APS, 0,33 mmol), sendo a agitação mantida por 12 horas. Após esse tempo, os filmes foram lavados com água deionizada e colocados a secar à temperatura ambiente, de modo a formar o filme PPY-PANI/PET. Em seguida, as máscaras são retiradas e os filmes cortados em pequenas tiras de 8 mm x 30 mm (Fig. 23). Para a preparação dos filmes

PANI-PPY/PET, foram adotados os mesmos procedimentos descritos acima, apenas com a alteração da ordem das polymerizações.

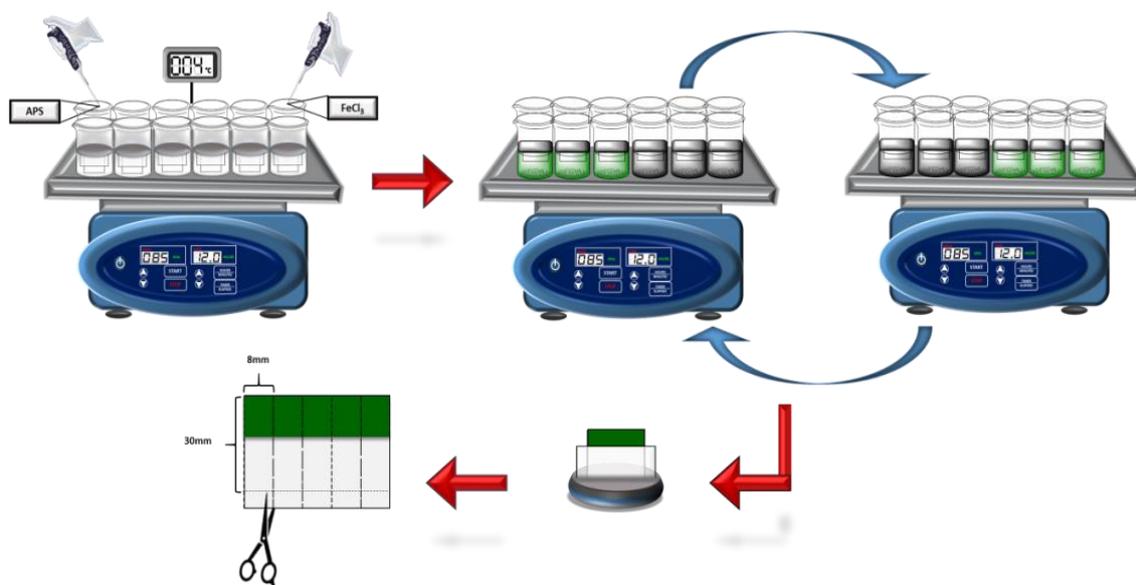


Figura 23 Esquema de polimerização dos filmes de bicamadas.

3.3 Métodos de caracterização

3.3.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

Com o intuito de obter informações a cerca da composição dos filmes, utilizamos o espectrofotômetro UV-VIS UV-2600 (Schimadzu, Japão). A medida é iniciada pelo espectro do filme de PET, que servirá de sinal de fundo (background). Em seguida, foram analisados os filmes no primeiro ciclo e no segundo ciclo de polimerização desdopados com hidróxido de sódio. As medidas foram coletadas na região 300-900 nm.

3.3.2 Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Para a análise qualitativa dos grupos funcionais existentes nos filmes foi utilizado o espectrofotômetro FT/IR-4600 (Jasco, Japão). A medida foi feita no modo ATR (reflexão total atenuada), com resolução de 4 cm^{-1} no intervalo de $2500\text{-}630\text{ cm}^{-1}$.

3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para observar a morfologia dos filmes foi utilizado o microscópio FEG-SEM MIRA3 LM (TESCAN, CZ). Os filmes foram cortados e colocados sobre suportes metálicos contendo fita de carbono, após esse suporte ter sido metalizado com uma fina camada de ouro.

3.3.4 Ângulo de contato

A molhabilidade é comumente analisada pela medida do ângulo de contato, ou seja, o ângulo entre uma superfície e um determinado líquido. Com isso é possível determinar o caráter hidrofóbico / hidrofílico dos filmes. Nessas medidas foi utilizado o medidor do ângulo de contato CAM 100 (KSV, Finlândia), e as medidas foram feitas utilizando água deionizada.

3.3.5 Espectroscopia de fluorescência

A fluorescência das amostras foi medida usando o espectrofotômetro de fluorescência FluoroLog-3 (Horiba, EUA), com comprimento de onda de excitação em 480 nm e espectro de emissão coletados na faixa de 490-650nm. A medida da fluorescência foi utilizada nos experimentos de sensoriamento.

3.4 Experimentos de sensoriamento

Para os experimentos de sensoriamento foram utilizados os filmes desdopados. Para isso, os filmes foram colocados em eppendorf contendo 2 mL de solução de

hidróxido de sódio (NaOH, 10mM), que foi deixado em repouso por aproximadamente 6 horas. Posteriormente, os filmes foram lavados com água deionizada e colocados para secar em uma capela de fluxo laminar.

As soluções de oligonucleotídeos, como o DNA fita simples marcado com FAM (ssDNA-FAM), o DNA fita simples complementar (DNAc) e o DNA fita simples não complementar (DNAnc), foram diluídos em água free nuclease para uma concentração inicial de 50 ng/mL e quantificadas no espectrofotômetro UV-vis NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific, EUA), para então obtermos uma solução estoque.

As soluções estoque foram diluídas para as concentrações desejadas em tampão de Tris-HCl (pH 7.4) com adição de 10 mM de MgCl₂ (Tris-HCl + 10 mM MgCl₂). Para todos os experimentos de sensoriamento foram utilizados 1 mL das soluções diluídas (nas concentrações pré-determinadas) e colocadas em eppendorf. Foi utilizado o agitador orbital em uma rotação de 300 rpm para melhorar a interação entre a sonda e os filmes. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

3.4.1 Cinética de Imobilização

A fim de determinar o tempo necessário para que a sonda se ligue ao filme, a solução estoque contendo ssDNA-FAM foi diluída com Tris-HCl + 10 mM MgCl₂, numa concentração de 50nM, 1 mL dessa solução foi colocado no eppendorf e medida no Fluorolog, com o intuito de observar a fluorescência inicial da sonda. Com o auxílio de uma pinça, os filmes foram colocados nos eppendorfs e deixados em agitação orbital. A cada 30 minutos, os filmes eram retirados dos eppendorfs para que fosse medida a fluorescência da solução, sendo em seguida recolocados nos seus respectivos eppendorfs, voltando ao agitador orbital (Fig. 24). Esse procedimento de análise da solução foi realizado até a máxima imobilização da sonda nos filmes acontecer, como constatado pela saturação da fluorescência da solução.

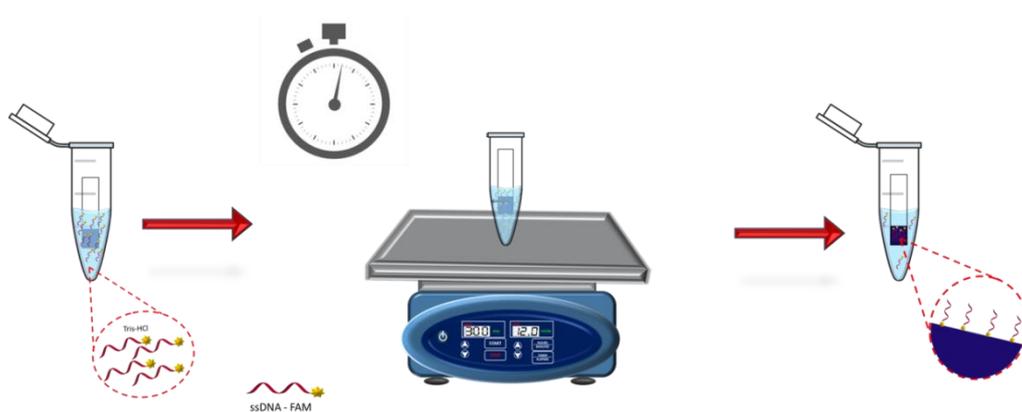


Figura 24 Esquema do procedimento de imobilização dos filmes bicamadas.

3.4.2 Cinética de Hibridização

Depois de imobilizados, os filmes foram colocados em eppendorfs com 1mL de Tris-HCl + 10 mM MgCl₂ pH 7.4, e agitados em um agitador orbital durante 15 minutos. Este procedimento de lavagem foi repetido 4 vezes. Em seguida, os filmes foram colocados em novos eppendorfs contendo DNAc na concentração de 50nM e, mais uma vez, posicionados no agitador orbital. Depois de 5 minutos, os filmes foram retirados, para a medida da fluorescência da solução. Essa solução é examinada a cada 10 minutos, a fim de verificar o tempo necessário para que ocorra a máxima hibridização da sonda ssDNA-FAM com o DNA alvo (DNAc), como verificada pela saturação na intensidade da fluorescência.

3.4.3. Limite de detecção do biossensor

Após a determinação do tempo de imobilização e hibridização, foram feitas diluições seriadas utilizando a solução estoque de DNAc colocadas em um eppendorf. Os filmes também foram adicionados aos eppendorfs com o auxílio de uma pinça, e colocados em agitação orbital durante o tempo estimado na hibridização. Decorrido esse tempo de hibridização, os filmes foram retirados dos eppendorfs, sendo a fluorescência do sobrenadante medida a fim de ser construída uma curva de calibração para o cálculo do limite de detecção. Para isso foi utilizada a fórmula: $3\sigma/S$, onde σ é o desvio padrão do branco e S é a inclinação da curva de calibração (LIU; SU, 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são descritos os resultados obtidos no decorrer deste trabalho para a síntese de filmes bicamadas poliméricas a serem usados no diagnóstico molecular da Zika. O capítulo foi estruturado em duas partes, a síntese e a caracterização dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET, e a etapa de sensoriamento, em que foram realizados os experimentos de fluorescência.

4.1 Preparação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET

A síntese química foi adotada, por levar a um alto rendimento e ser uma rota muito utilizada, tanto em escala piloto como na industrial (FAEZ et al., 2000). A deposição química foi realizada a 4°C por 12 h, a fim de permitir que a polimerização seja lenta o suficiente para formar polímeros lineares (REGAÇO, 2006). A síntese dos polímeros na superfície do PET foi feita usando uma baixa concentração de reagentes e uma baixa temperatura, de modo a que os locais de nucleação ocorram na superfície da folha de PET, em vez de apenas na solução (CHIOU et al., 2007) (Fig. 25). Em superfícies hidrofóbicas, a taxa de deposição de polímeros condutores é alta, mas se obtém uma fraca adesão a superfície, podendo o filme resultante ser removido por uma fita adesiva (FLAVEL et al., 2009).

No caso da polianilina, o mecanismo de polimerização envolve a formação de oligômeros de anilina, por oxidação em meio ácido. Esses oligômeros são mais hidrofóbicos e têm a tendência a se separarem em meio aquoso, sendo adsorvidos em superfícies que estão em contato com o meio reacional. Como a reatividade desses oligômeros é grande, inicia-se o crescimento das cadeias de PANI, que se propaga por toda a superfície do substrato (STEJSKAL; SAPURINA, 2005). Já o PPY se deposita nos substratos por precipitação. O mecanismo de síntese do PPY, envolve a formação de espécies intermediárias altamente reativas. O oxidante oxida o monômero pirrol, formando cátions radicais, que vão se recombinando, formando oligômeros de pirrol e, por fim, formando o PPY. A maior parte dos polímeros sintetizados se deposita na solução após a polimerização química, podendo uma parte deles se acumular na superfície do substrato em contato com o meio, formando uma camada fina sobre ele (MALINAUSKAS, 2001).

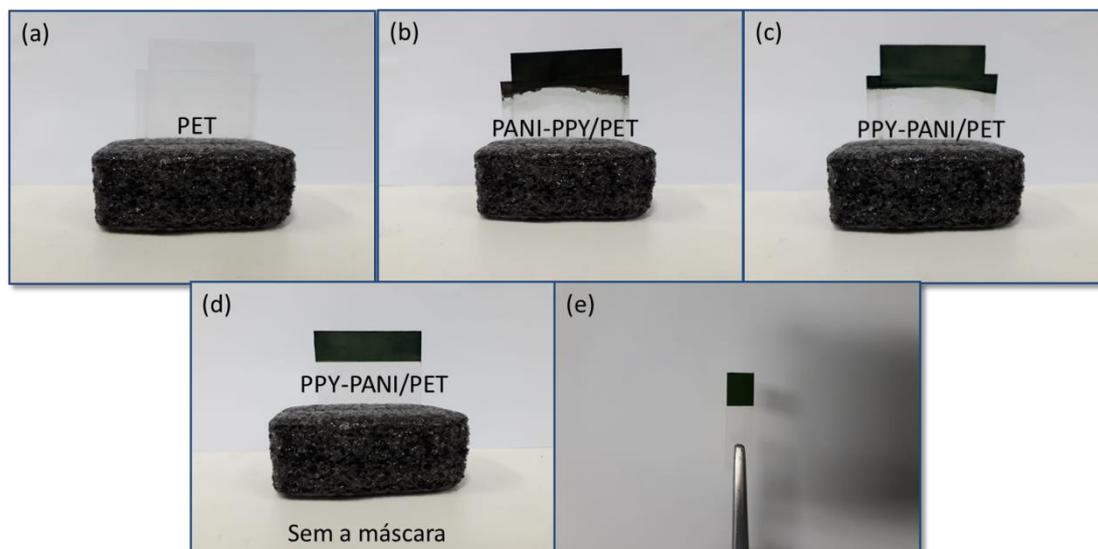


Figura 25 Substrato PET com máscara (a), filme de bicamada PANI-PPY/PET com máscara (b), filme de bicamada PPY-PANI/PET com máscara (c), filme de bicamada PPY-PANI/PET sem máscara e filme cortado em tira (e).

4.2 Caracterização dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET

4.2.1 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-vis)

O estado de oxidação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET foi determinado por UV-vis. Inicialmente, foram realizadas as análises com as primeiras camadas de polimerização dos filmes sobre o PET polianilina (Fig. 26a curva I) e polipirrol (Fig. 26b curva I). Depois, os espectros foram novamente obtidos para os mesmos filmes após o segundo ciclo de polimerização, onde ocorreu a polimerização da segunda camada de PPY (Fig. 26a curva II) e PANI (Fig. 26b curva II) respectivamente. Os dois filmes de bicamadas foram lavados com uma solução de NaOH 10nm.

Na curva I (Fig. 26a) podem ser observadas as bandas de absorção em 354, 430 e 760 nm, que são atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ dos anéis benzenóides, estando o segundo e terceiro pico relacionados com a presença dos pólarons formados pela protonação, e sendo o pico em 430 nm resultado da transição pólaron-bipólaron, característica da polianilina no seu estado sal esmeraldina. Esses picos estão condizentes com a literatura (FLAVEL et al., 2009; NGUYEN et al., 2014). Na curva I (Fig. 26b), as bandas de absorção em 488 e 904 nm, atribuídas ao filme de PPY, correspondem à transição $\pi-\pi^*$ e aos bipólarons, e são picos associados à natureza condutora do PPY (LI et al., 2016; WENG et al., 2011).

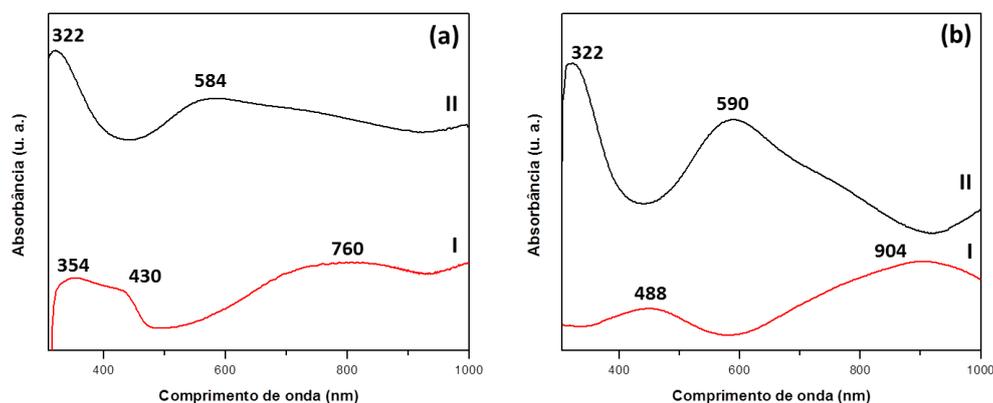


Figura 26 Espectros UV-vis. (a) Filme de PANI-PPY/PET (I) PANI sobre a folha de PET e (II) PPY crescida na superfície da PANI; (b) PPY-PANI/PET (I) PPY sobre a folha de PET e (II) PANI crescida na superfície do PPY.

Analisando os picos da segunda camada dos filmes, podemos perceber que há semelhança entre as bandas de absorvância dos dois filmes (PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET). Na curva II (Fig. 26a), podem ser observadas as bandas de absorção em 322 e 580 nm do filme de PANI-PPY/PET, e na curva II (Fig. 26b), as bandas em 322 e 590 nm do filme de PPY-PANI/PET. Esses picos são característicos do estado base esmeraldina da PANI, com o primeiro sendo devido à transição $\pi-\pi^*$ dos anéis benzenóides e à absorção de excitons dos anéis quinóides, respectivamente (FLAVEL et al., 2009; NGUYEN et al., 2014; WU; HONG, 2016). Na curva II (Fig. 26a), referente ao filme PANI-PPY/PET, é encontrada uma banda mais larga se comparada à curva II (Fig. 26b), referente a sobreposição ao pico do PPY. Nesse filme, há a presença da PANI juntamente com o PPY na camada superficial do filme, fato esse que é demonstrado pelos picos do UV-vis característico da presença da PANI desdopada. Já no filme PPY-PANI/PET não se observa a sobreposição de picos.

4.2.2 Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR)

Para a constatação do crescimento da polianilina e do polipirrol na superfície do PET e, posteriormente, da segunda camada em cada um dos filmes, foi utilizada a Espectroscopia Infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada (FTIR-ATR). Os filmes analisados foram o PPY-PANI/PET e o PANI-

PPY/PET, com a identificação dos grupos funcionais existentes através dos picos característicos de cada material.

Na Fig. 27 são mostrados os picos referentes aos filmes PPY-PANI/PET (Fig. 27a) e PANI-PPY/PET (Fig. 27b). Alguns são encontrados nos dois filmes, como os picos em 1704 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} , 870 cm^{-1} , 714 cm^{-1} . No espectro (a) são encontrados os picos em 714 cm^{-1} e 835 cm^{-1} , atribuídos à deformação C–H fora do plano dos anéis de benzeno 1,2-substituídos e 1,4-substituídos, respectivamente. Também são encontrados os picos em 1237 cm^{-1} , 1574 cm^{-1} e 1504 cm^{-1} , que indicam o estiramento C–N do anel benzenóide e o estiramento C=C em anéis quinóides e benzenóides, respectivamente, e que são picos característicos da PANI (BLINOVA et al., 2007; GALIANI et al., 2007; NGUYEN et al., 2014). Já no espectro (b), são observados os picos em 1030 cm^{-1} , 1093 cm^{-1} , 1173 cm^{-1} e 1540 cm^{-1} , relacionados com a deformação das ligações C-H e N-H no plano, a vibração no plano de N-H, a deformação no plano C-H e N–H e a formação de bipólaron, indicativa de PPY protonado, e o estiramento das ligações C=C no anel benzeno, respectivamente, picos característicos do PPY (BLINOVA et al., 2007; LIU; OLIVEIRA, 2007; REUNG-U-RAIA et al., 2008).

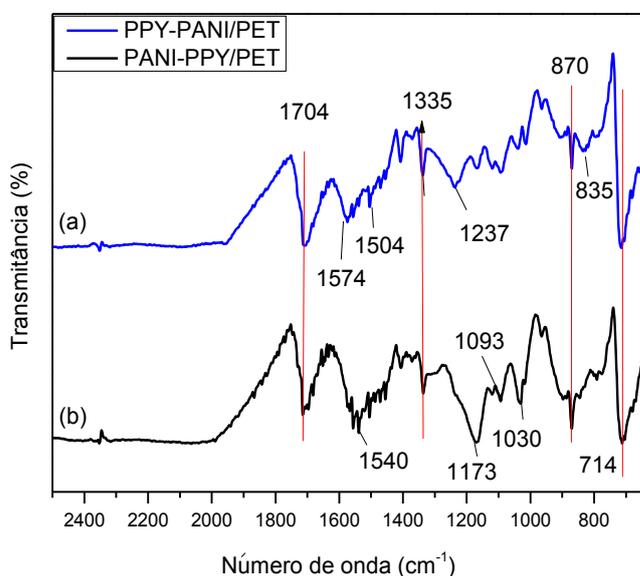


Figura 27 Espectros FTIR-ATR dos filmes PPY-PANI/PET (a) e PANI-PPY/PET (b).

4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi empregada para a visualização da morfologia dos filmes. Na Fig. 28 são mostradas as estrutura da folha de

PET (Fig. 28a), do filme PPY-PANI/PET (Fig. 28b) e do filme PANI-PPY/PET (Fig. 28c). Pode-se observar que a superfície da folha de PET é lisa e uniforme, sem nenhuma rugosidade. No filme PPY-PANI/PET pode ser observada uma estrutura composta por nanofibras alinhadas ao substrato (folha de PET com PPY), onde os pontos brancos correspondem às pontas das nanofibras. Essas são características típicas da polianilina (CHIOU et al., 2007; WANG et al., 2018).

No filme PANI-PPY/PET encontra-se uma morfologia granular uniforme, constituída de grãos microesféricos. Essa estrutura assemelha-se à morfologia do PPY (CHOUGULE et al., 2011; LIU; OLIVEIRA, 2007).

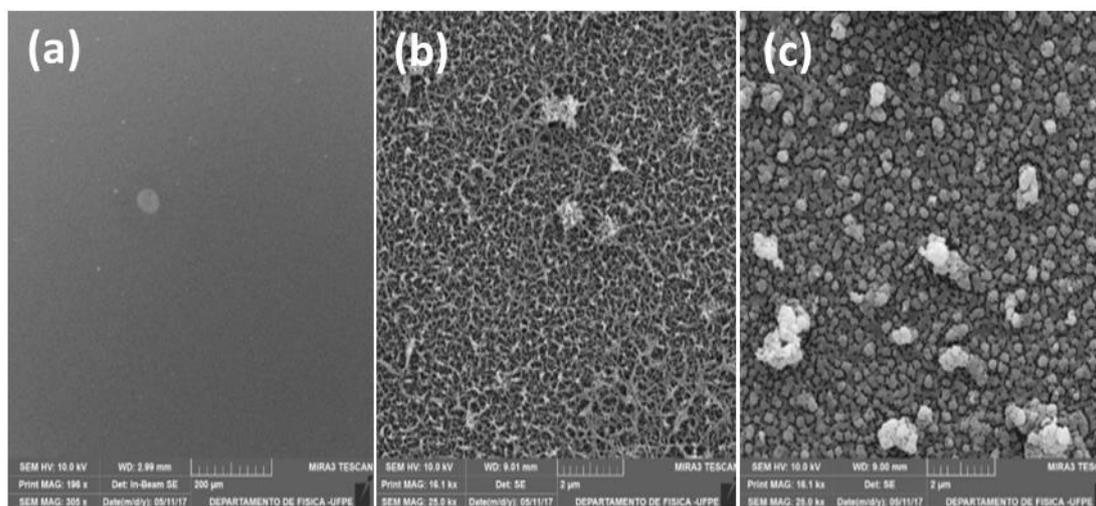


Figura 28 Imagens MEV de PET (a), filme bicamada Polipirrol- Polianilina/PET (b), filme bicamada Polianilina-Polipirrol/PET(c).

Quando a PANI é depositada na superfície do PPY, não há diferença morfológica na sua estrutura, em concordância com a afirmação do CHIOU et al. (2007) de que não existe diferença aparente na morfologia do revestimento da PANI para substratos condutores ou não condutores. Já o PPY, ao ser depositado na PANI, mostra uma pequena alteração na uniformidade do filme. A imagem obtida por MEV demonstrou que houve crescimento da bicamada polimérica em ambos os filmes.

5.2.4 Ângulo de contato

Para determinar o caráter hidrofóbico/hidrofílico dos filmes, foi realizada a medida de ângulo de contato (AC) da água com a superfície dos filmes. A medida do AC está relacionada à composição química, homogeneidade nas amostras e morfologia

da superfície. Se o AC for pequeno ($<90^\circ$), a molhabilidade é alta e a superfície da amostra é considerada hidrofílica. Já se o ângulo de contato é grande ($> 90^\circ$), a molhabilidade é menor e a superfície da amostra é considerada hidrofóbica (NAVALE et al., 2018). Conforme mostrado na Fig. 29, o filme PANI-PPY/PET demonstrou ter um caráter hidrofóbico, enquanto que o filme PPY-PANI/PET apresenta um caráter hidrofílico.

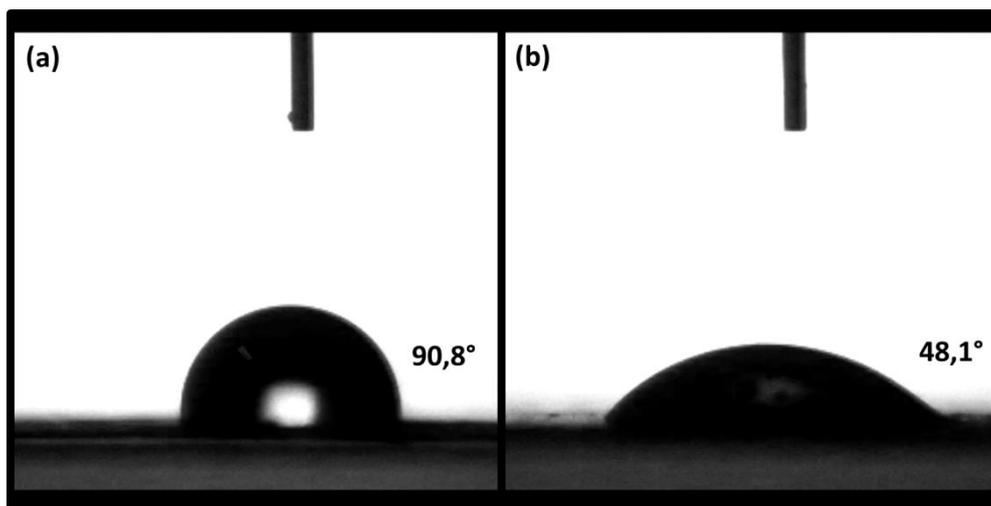


Figura 29 Ângulo de contato da água para: filme PANI-PPY/PET (a) e filme PPY-PANI/PET (b).

4.4 Aplicação dos filmes PPY-PANI/PET e PANI-PPY/PET para o diagnóstico rápido da Zika

A metodologia de detecção do DNA utilizada é baseada na supressão de fluorescência, conforme mostra o esquema da Figura 30. Os filmes de bicamada polimérica são polimerizados na superfície do PET. Após a polimerização, as sondas marcadas com FAM (ssDNA-FAM) são imobilizadas nos filmes, onde acontece a supressão do sinal de fluorescência, devido à proximidade entre o fluoróforo (FAM) e a superfície polimérica, via transferência de elétrons fotoinduzida. No entanto, ao serem colocados em contato com o DNA alvo, acontece a hibridização entre as fitas, que então se soltam do filme, restaurando assim o sinal de fluorescência.

Para comprovar a metodologia sugerida, foi utilizada uma sequência específica de oligonucleotídeos referente ao vírus Zika, marcada com um fluoróforo FAM (ssDNA-FAM). Essa sonda, foi imobilizada nos filmes PPY-PANI/PET e PANI-PPY/PET, que foram posteriormente colocados em uma solução contendo o DNA complementar. Na Fig. 31a é mostrado o espectro de fluorescência da sonda ssDNA-

FAM (50nM), antes (curva I), e depois da imobilização no filme de PPY-PANI/PET (curva II) e de PANI-PPY/PET (curva III). Pode ser observado que a solução inicial de sonda tem uma forte fluorescência, com sua intensidade diminuindo em 74% no filme de PPY-PANI/PET, e 91% no filme de PANI-PPY/PET, depois da imobilização. Isso permite comprovar a forte ligação entre a sonda ssDNA-FAM e os filmes.

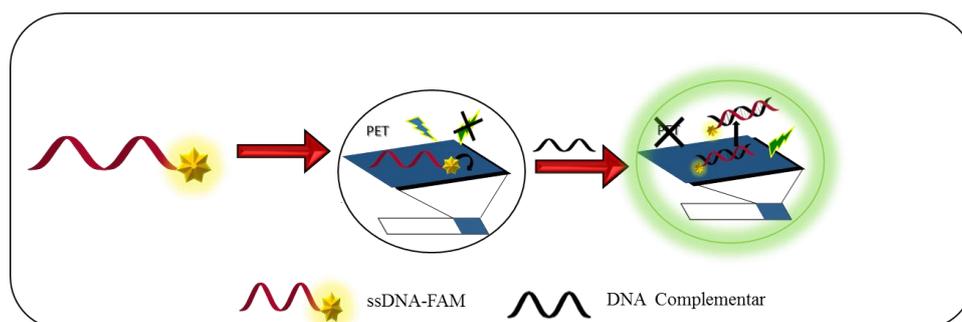


Figura 30 Esquema do mecanismo de detecção de ácidos nucleicos utilizando filmes nanoestruturados PIC /PET.

Depois de termos estabelecido que a sonda ssDNA-FAM foi de fato imobilizada nos filmes, os mesmos foram imersos em uma solução contendo o DNA alvo ou o DNA não complementar, na concentração de 50nM (Fig. 31b). Ao entrar em contato com o DNA alvo, ocorre a hibridização das fitas, que se desprendem do filme, o que leva à recuperação da fluorescência da solução. Pode ser observada a diferença entre a intensidade da fluorescência do DNA complementar e a do não complementar, comprovando que os filmes podem ser utilizados como supressores de fluorescência para a detecção de DNA.

Os filmes se ligam ao ssDNA-FAM através de interações de empilhamento π - π muito fortes entre as bases nitrogenadas do DNA e as ligações conjugadas (ricas em elétrons π) da PANI e do PPY. Isso leva a uma forte adsorção entre o DNA fita simples (ssDNA) e a superfície do filme, ao contrário do que acontece com o DNA fita dupla (dsDNA). No dsDNA existe a ausência de bases livres, o que oferece menos oportunidades de empilhamento- π com a superfície dos PICs, levando a uma fraca interação entre eles (LIU et al., 2011; LU et al., 2011). O mecanismo de detecção segue algumas etapas, como a imobilização do ssDNA-FAM na superfície dos filmes, através das interações hidrofóbicas, e depois a supressão da fluorescência, que se deve à proximidade entre o FAM e a superfície polimérica (PANI ou PPY), via transferência de elétron fotoinduzida (PET) dos PICs para o fluoróforo excitado. E, por último,

quando os filmes imobilizados entram em contato com o DNA complementar, há a formação do dsDNA, que se desprende do filme e vai para a solução, ocasionando a recuperação da fluorescência (LIU et al., 2011).

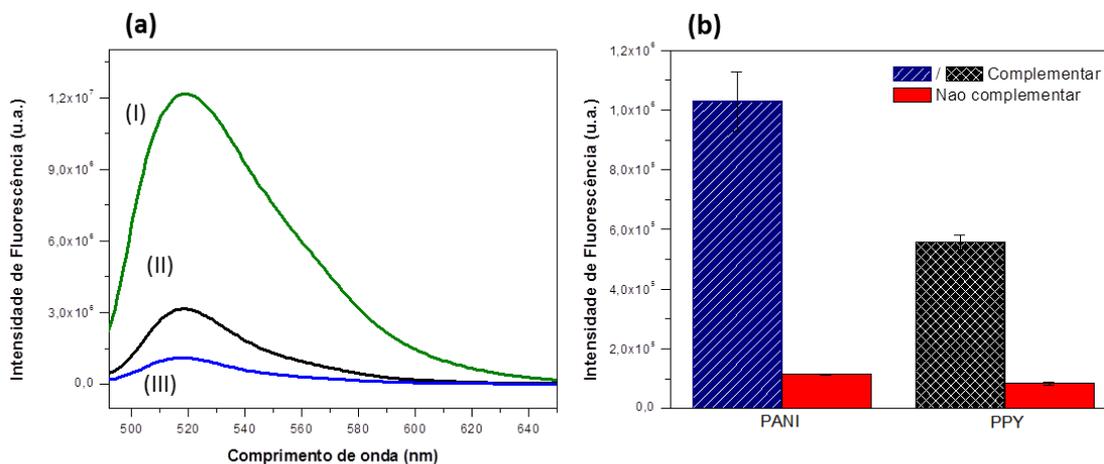


Figura 31 (a) Espectros de emissão de fluorescência da solução de ssDNA-FAM (50 nM) sob diferentes condições: antes (I) e após a interação com filmes PPY-PANI/PET (II) e PANI-PPY/PET (III). (b) Intensidade da fluorescência após interação dos sistemas ssDNA-FAM - PIC/PET com ssDNA alvo complementar e não complementar (50 nM).

4.4.1 Otimização dos filmes para a detecção de DNA

No intuito de melhorar os resultados apresentados, foi realizado um estudo de cinética de imobilização e de cinética de hibridização.

4.4.1.1 Cinética de imobilização

Antes da imobilização, os filmes foram desdopados através da lavagem com NaOH para retirada dos íons, deixando a polianilina no seu estado neutro (forma base esmeraldina), como demonstrado na análise dos espectros de UV-vis (tópico 4.2.1). Os filmes foram desdopados para uma melhor interação entre eles e a sonda de DNA, que é de natureza hidrofóbica, como demonstrado por Nakao et al. (2002).

Para melhor avaliar o tempo necessário para que ocorra a interação entre a sonda ssDNA-FAM e os filmes, foi realizado um estudo de cinética de imobilização. Para isso, a solução contendo a sonda fluorescente foi colocada em contato com os filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET, sendo então examinado o tempo para que ocorra a máxima quantidade de sonda ligada ao filme, o que é determinado pela saturação da extinção da

fluorescência da solução. Conforme a ligação entre os filmes e a sonda vai acontecendo, a fluorescência da solução vai diminuindo, o que ocorre devido à diminuição da concentração de sonda na solução. Como pode ser observado na Fig. 32, o tempo de imobilização é de 180 min para ambos os filmes, pois após esse tempo, a cinética se torna mais lenta e a quantidade de sonda imobilizada é praticamente inalterada. Assim, com isso estabelecido, em todos os experimentos seguintes, foi utilizado esse tempo de imobilização. Para a plotagem da curva foram utilizados apenas os pontos no comprimento de onda de 518 nm (o pico máximo) da intensidade de fluorescência.

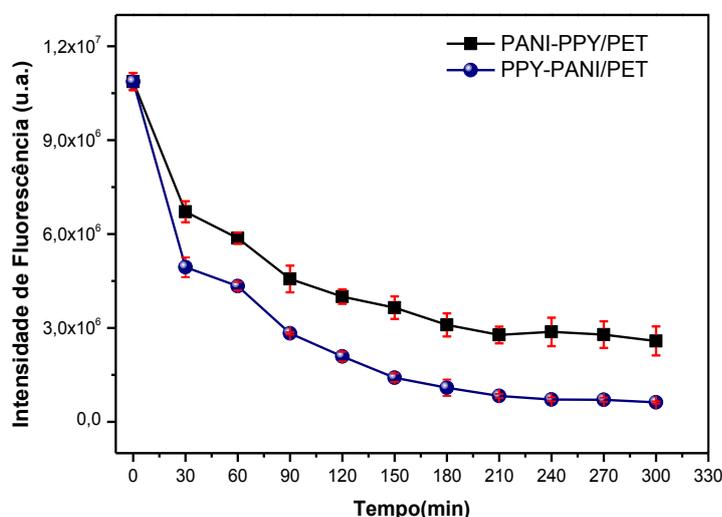


Figura 32 Cinética de imobilização ssDNA-FAM (50nM) diluído em Tris-HCl (pH 7,4), 518nm

4.4.1.2 Cinética de hibridização

Depois da imobilização, os filmes foram lavados 4 vezes com uma solução de Tris-HCl + 10 mM MgCl₂, cada lavagem durando 15 minutos. Essas lavagens servem para retirar as sondas que não interagiram fortemente com os filmes, de modo a aumentar a especificidade com o DNA alvo, diminuindo assim a ocorrência de eventos falso-positivos. A quantidade de lavagens e o tempo de lavagem foram avaliados pela fluorescência das soluções de lavagens, de modo a diminuir a intensidade de fluorescência do branco (solução contendo apenas o tampão Tris-HCl + 10 mM MgCl₂).

A cinética de hibridização foi examinada de modo a permitir uma melhor avaliação do tempo necessário para a máxima hibridização entre as sondas imobilizadas ssDNA-FAM-PIC (onde o PIC pode ser PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET). O ensaio consistiu em colocar os filmes em uma solução contendo o DNA alvo (50nM), com a

posterior análise da fluorescência da solução. Observando os gráficos da Fig. 33, nota-se que a máxima hibridização acontece por volta de 60 minutos de interação para ambos os filmes. Para a plotagem da curva foram utilizados apenas os pontos no comprimento de onda de 518 nm (o pico máximo) da intensidade de fluorescência.

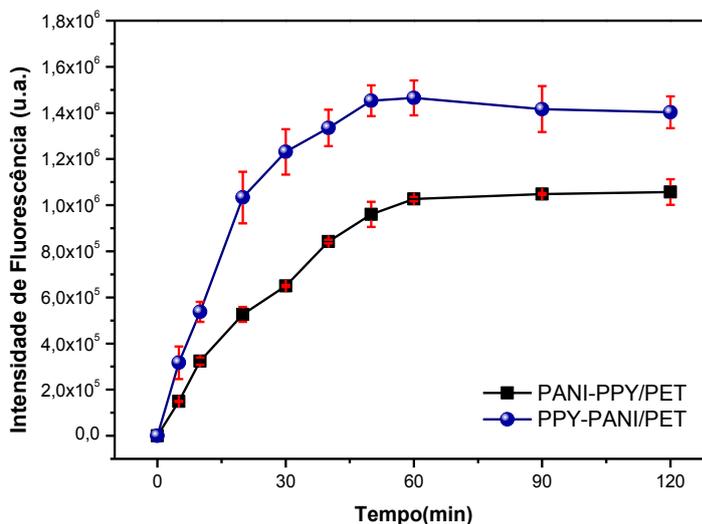


Figura 33 Cinética de hibridização. Recuperação da fluorescência devido à interação do ssDNA-FAM imobilizado nos filmes PIC/PET com o DNAC (50nM) diluído em Tris-HCl (pH 7,4), 518nm.

4.4.2 Limite de detecção

Após a otimização do tempo de imobilização (180 min) e hibridização (60min), foram feitas diluições seriadas (100, 75, 50, 25, 10, 5nM) utilizando a solução estoque de DNAC e diluídas com Tris-HCl + 10 mM MgCl₂. Após os 60 minutos para a hibridização, os filmes são retirados das soluções contendo o DNAC e medida a fluorescência dessas soluções. Na Figura 34 são apresentados os espectros de fluorescência dessas diluições, onde pode ser observada a recuperação de fluorescência em cada diluição realizada.

Quando os filmes imobilizados com ssDNA-FAM são colocados em contato com diferentes concentrações de DNA complementar, uma maior quantidade de sonda é liberada no meio, aumentando a intensidade de fluorescência das soluções medidas. Isso acontece devido à formação de cadeias dsDNA, por conta da hibridização das sondas ssDNA-FAM com o DNAC. Para avaliar o menor limite de detecção para os filmes, foi traçada uma curva linear de algumas concentrações. Para a plotagem da curva foram

utilizados apenas os pontos no comprimento de onda de 518 nm (o pico máximo) da intensidade de fluorescência.

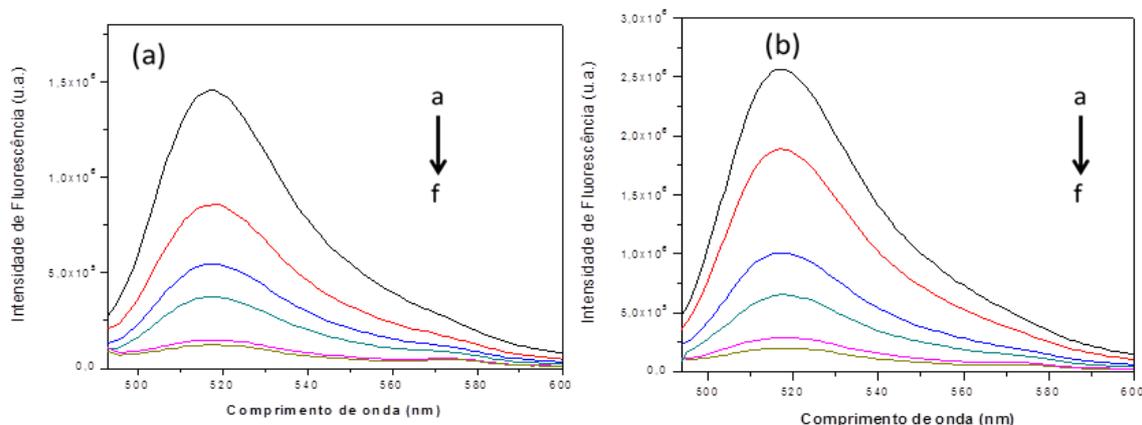


Figura 34 Espectros de fluorescência dos filmes PANI-PPY/PET(a) e PPY-PANI/PET(b) imobilizados com ssDNA-FAM e em diferentes concentrações de DNAC: a-100, b-75,c-50, d-25, e-10, f-5.

Podemos observar a diferença na intensidade de fluorescência em cada diluição. Os filmes PANI-PPY/PET tiveram o coeficiente de determinação (R^2) na reta igual a 0,976 e a relação linear, $I = 10780,0c + 66457,7$ (Fig. 35a), para a intensidade de fluorescência em 518 nm (I) e a concentração do DNA complementar (c). Já para os filmes PPY-PANI/PET o R^2 foi 0,9968 e a relação linear, $I = 24683,89c + 75642,09$ (Fig. 35b). Utilizando os valores do coeficiente angular da reta (S) e o desvio padrão do branco (σ), obtivemos os limites de detecção usando a relação $3\sigma / S$ (LIU et al., 2018). Os limites obtidos foram de 0,278 nM, para o filme PANI-PPY/PET, e 0,345 nM, para o PPY-PANI/PET. O branco foi realizado utilizando Tris-HCl + 10 mM MgCl₂ no lugar da solução de DNAC, com todos os demais parâmetros sendo mantidos.

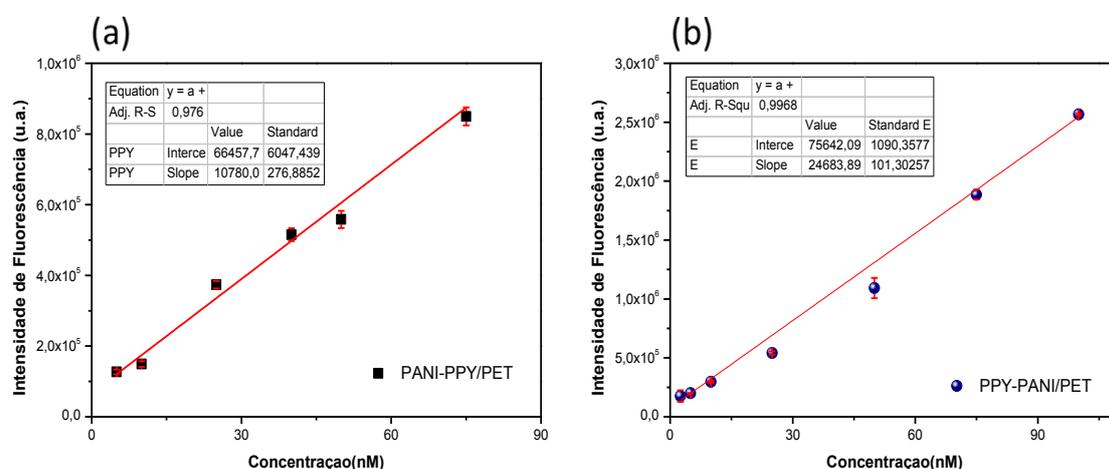


Figura 35 Espectro de fluorescência correspondente ao intervalo de resposta linear dos ensaios para o filme PANI-PPY/PET(a) e PPY-PANI/PET(b) (518nm).

4.4.3 Seletividade da detecção de DNA do vírus da Zika

Para saber o quão seletivos os filmes seriam para com o DNA alvo, foi realizado um ensaio específico, que consistiu em colocar os filmes já imobilizados com a sonda ssDNA-FAM em soluções contendo: um polinucleotídeos (longa cadeia de nucleotídeos) (Poli-A), ou DNA complementar com uma base diferente (T_1) e com duas bases diferente (T_2), ou DNAc ou o DNAnc. Todas as soluções foram diluídas para 50nM com o tampão de Tris-HCl + 10 mM MgCl₂. Foi escolhido o Poli-A para simular a presença de um DNA extenso. Também, os filmes foram colocados em contato com uma solução mista de Poli-A e o DNAc, ambos na concentração de 50nM, para simular um sistema real. Foi utilizado 1 mL de cada solução, sendo colocados os filmes já imobilizados com a sonda. Após 60 minutos, os filmes são retirados das soluções e a fluorescência dessas soluções medida. Na Fig. 36 são apresentados os espectros de fluorescência dessas diluições. Para a plotagem dos histogramas foram utilizados apenas os pontos no comprimento de onda de 518 nm (o pico máximo) da intensidade de fluorescência.

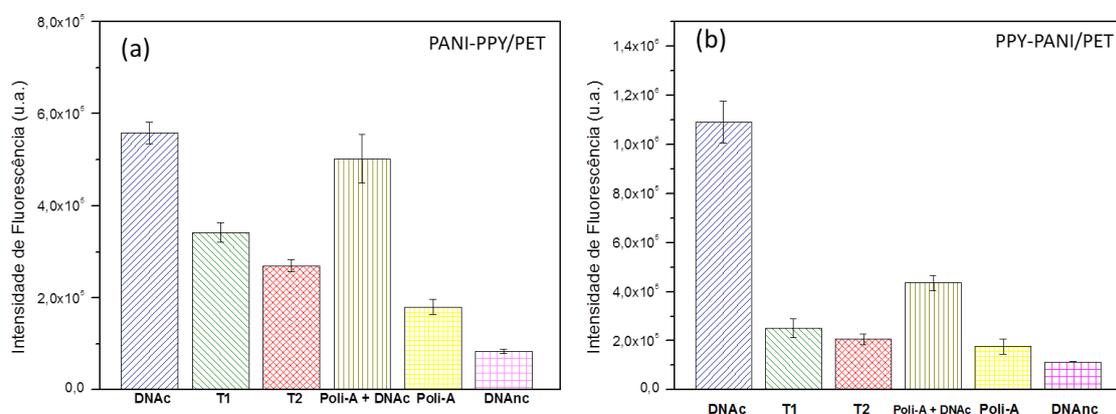


Figura 36 Histogramas da seletividade dos filmes (a) PANI-PPY/PET e (b) PPY-PANI/PET com relação à adição do Poli-A, Poli-A mais o DNAc, e os complementares com uma base errada (T1) e duas bases erradas (T2).

Analisando a Fig. 36, observamos que aconteceu a recuperação de fluorescência das soluções numa taxa de aproximadamente 61% para T1, 48% para T2 e 90% para o Poli-A nos filmes de PANI-PPY/PET (Fig. 36a), em comparação com o DNAc. Já para o filme PPY-PANI/PET (Fig. 36b), obtivemos valores de aproximadamente 23% para T1, 19% para T2 e 40% para o Poli-A. Observamos que, mesmo com a modificação de apenas uma base no DNA complementar, houve diferença na recuperação de

fluorescência, que se mostrou menor que a do DNA alvo, demonstrando que os filmes são de fato seletivos. Quando uma ou duas bases do DNAC eram alteradas, o filme de PPY-PANI/PET se mostrou mais seletivo do que o filme PANI-PPY/PET, ambos no entanto exibindo uma ótima seletividade.

Analisando a mistura Poli-A e DNAC, uma boa recuperação de fluorescência pôde ser observada, quando sua intensidade era comparada com a da Poli-A pura, comprovando que DNA muito longos não interferem com a seletividade dos filmes.

A seletividade é um parâmetro importante para medir o desempenho de um sensor, pois é necessária a interação específica com o alvo em relação a outros interferentes (LIU; SU, 2017). Podemos concluir que os filmes produzidos demonstraram potencial para o diagnóstico molecular, em uma indicação de que de fato essa plataforma de detecção é capaz de diferenciar entre sequências-alvo complementares e outras incompatíveis, que estejam inseridas em uma grande cadeia de DNA.

4.4.4 Comparação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET com outros supressores de fluorescência descritos na literatura

Na Tabela 5 é mostrada uma comparação entre nossos filmes e alguns sistemas de detecção baseados em supressores de fluorescência relatados na literatura, onde estão indicados o material utilizado, o limite de detecção e o tempo de análise. Como apontado anteriormente, os nossos filmes são constituídos de PANI e PPY formando uma dupla camada alternada. Conseguimos um limite de detecção igual a 0,345 nM para o filme PPY-PANI/PET e 0,278 nM para o filme PANI-PPY/PET, com o tempo de análise de 60 min.

Ao compararmos os resultados obtidos como uso de nossos filmes com os de biossensores anteriormente relatados na literatura, percebemos ser nosso sistema de detecção bastante promissor, permitindo obter um alto limite de detecção em um tempo razoável (60min). Em sua maioria, os sistemas discutidos na literatura correspondem a nanoestruturas particuladas que podem se aglomerar, e assim limitar a análise. Nossos filmes apresentam como vantagens comparativas, permitir um fácil manuseio e exibir um menor grau de aglomeração, além de serem de baixo custo. Isso indica que nosso trabalho pode ser usado no campo de diagnóstico molecular por biossensores fluorescentes.

Tabela 5 Comparação entre os filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET e alguns supressores de fluorescência.

Material	Limite de detecção (nM)	Alvo	Tempo de análise (min)	Referências
Nanoesferas PPY	1 (HIV)	DNA	45	LU et al., 2011
Nanofibras PANI	2.5 (HIV)	DNA	10	LIU et al., 2011
Nanofitas poly(p-fenilenodiamina)	30	DNA	60	WANG et al., 2011
Nanofios de Pd (Pd NWs)	0.3	DNA	60	ZHANG et al., 2012
NPs α -Fe ₂ O ₃	1.1	DNA	10	SONG; WANG; KONG, 2015
NPs de Au funcionalizadas com oligossacarídeos	1.8 (HIV)	DNA	30	YAN et al., 2015
MOF	0,196 (HIV) 0,073 (Ebola)	DNA RNA	90 30	YANG et al., 2015
Nanotubos de polidopamina	3.5 (HIV) 150 (ATP)	DNA	-	FAN et al., 2016
MOF	0,332 (Dengue) 0,192 (Zika)	DNA RNA	36 2	XIE et al., 2018
Filmes PPY-PANI/PET PANI-PPY/PET	0,345 nM (Zika) 0,278 nM	DNA	60	Nosso Trabalho

4.4.5 Comparação dos filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET com filmes de PANI e PPY com uma e duas camadas

O nosso trabalho teve o intuito de modificar um trabalho já realizado no Grupo PNC para obter um limite de detecção melhor no diagnóstico molecular. Na busca por essa resposta, comparamos nossos filmes com aqueles formados após um ou dois ciclos

de polimerização de PANI ou PPY. Todos os filmes foram obtidos da mesma forma, utilizando a síntese química e polimerizando no substrato de PET, mantendo os mesmos parâmetros, como o tempo de imobilização (180min) e de hibridização (60min). Para essa comparação, foram utilizados a sonda e os complementares referentes ao ZIKV, na concentração de 50nM. O branco, que foi realizado utilizando apenas o Tris-HCl + 10 mM MgCl₂, sem a adição do DNAC, foi usado para a observação da interação entre a sonda e os filmes, pois, se a interação for forte, a sonda não desprenderá facilmente dos filmes. Um branco muito alto pode interferir na análise, chegando a se tornar um fator limitante do limite de detecção.

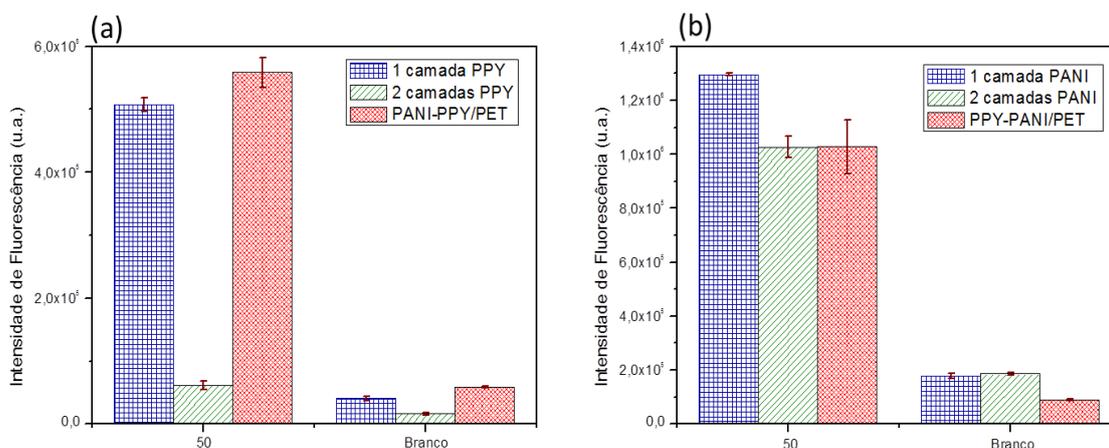


Figura 37 Histogramas da comparação entre os filmes (a) PANI-PPY/PET e (b) PPY-PANI/PET com relação à adição aos filmes de uma e duas camadas de PPY ou PANI.

A Fig. 37a, mostra que os nossos filmes de PANI-PPY/PET têm uma maior recuperação da fluorescência, como demonstrado pela intensidade da sonda, em comparação tanto com o filme de uma camada, como o de duas camadas de PPY. Isso demonstra que a presença do substrato de PANI abaixo do PPY interfere diretamente e modifica o comportamento do filme (se a PANI não modificasse o filme, o resultado seria semelhante ao filme de PPY-PPY/PET, por se tratar de uma dupla camada). Essa conclusão se mostra consistente com os demais resultados apresentados. O branco foi relativamente baixo para ambos os filmes.

No entanto, ao analisar a Fig. 37b, podemos perceber que a recuperação de fluorescência não foi tão intensa se comparada à do filme PANI/PET, sendo semelhante a aquela do filme PANI-PANI/PET. O branco, tanto para o PANI/PET como para o PANI-PANI/PET, é um pouco mais alto que o dos filmes PPY-

PANI/PET, demonstrando que esses filmes tem uma melhor interação com a sonda. Como já discutido anteriormente, e confirmado pelo ângulo de contato, devido à menor hidrofobicidade da PANI, os filmes contendo esse polímero em sua superfície têm uma menor interação com a sonda (ssDNS-FAM) e, conseqüentemente, exibem um maior sinal branco, pois a sonda se desprende mais facilmente.

Essa nova proposta de modificação dos filmes, com a alternância de camada de PANI e PPY, conseguiu baixar o limite de detecção dos filmes em comparação com os filmes bicamadas. Os limites alcançados pelos filmes de uma camada foram 1.3 nM para PANI/PET e 1.1 nM para PPY/PET, o que deve ser comparado com os valores de 0,345 nM para os filmes PANI-PANI/PET e 0,278 nM para os filmes PANI-PPY/PET, mostrando que os objetivos propostos foram alcançados.

4.5 Os filmes PANI-PPY/PET e PPY-PANI/PET para diagnóstico de outros vírus

A proposta do presente trabalho se baseia na produção de filmes nanoestruturados para um sistema modelo de diagnóstico molecular. Para examinar a validade de nosso sistema para a identificação de outros microrganismos, foi realizado um experimento preliminar para observação da resposta quando eram utilizadas a sonda e o complementar referentes ao vírus Papilomavírus Humano (HPV).

Esse vírus foi escolhido, tanto por ser de DNA (diferentemente do ZIKV, que é de RNA), quanto por fazer parte de uma numerosa família de pequenos vírus oncogênicos, a família *Papilomaviridae*. As infecções persistentes pelo HPV correspondem a um dos principais fatores que levam ao câncer do colo do útero (Câncer Cervical). Entre seus 13 tipos oncogênicos, o HPV16 e HPV18 são os mais comumente relacionados com o aparecimento da doença (CÂNDIDO et al., 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) mostram que o câncer do colo do útero ocupa o sétimo lugar no ranking mundial mais geral, sendo o quarto tipo mais comum na população feminina (BRASIL, 2018)

Realizamos uma curva de concentração utilizando sonda e complementar específico para HPV 18 respeitando todos os parâmetros já determinados anteriormente para os filmes em que foram utilizadas sequências do ZIKV. Conforme pode ser visualizado na Fig. 38, houve a recuperação de fluorescência, podendo ser notado que houve diferentes intensidades de fluorescência quando os filmes entraram em contato

com diferentes concentrações do DNAc. Mesmo que ainda preliminares, esses resultados, indicam a eficácia de nossa plataforma para a detecção de outros vírus.

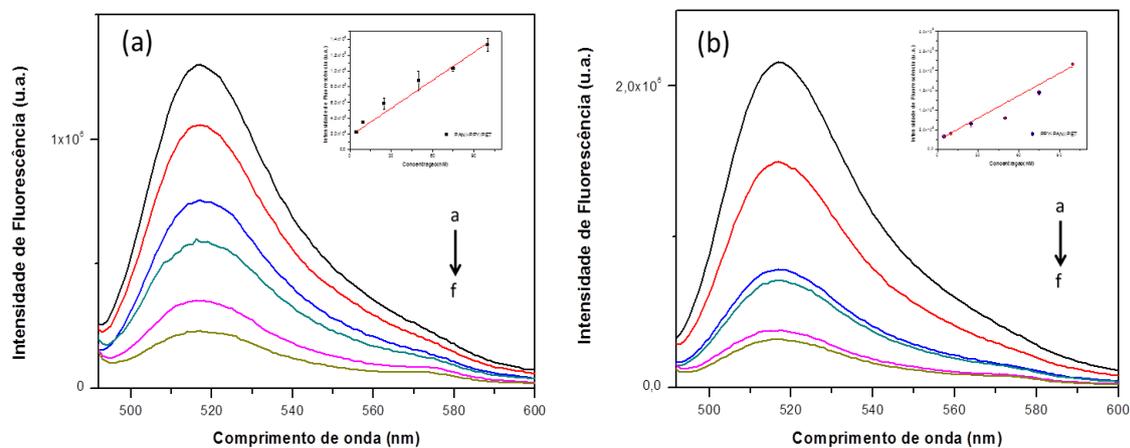


Figura 38 Espectros de fluorescência dos filmes PANI-PPY/PET (a) e PPY-PANI/PET (b) imobilizados com ssDNA-FAM para HPV-18 em diferentes concentrações de DNAc: a-100, b-75, c-50, d-25, e-10, f-5. Inset Espectro de fluorescência correspondente ao intervalo de resposta linear de dos ensaios para o filme PANI-PPY/PET(a) e PPY-PANI/PET(b).

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesse trabalho foram mostradas a síntese, a caracterização e a aplicação de filmes bicamadas poliméricas de PANI e PPY alternados em substrato PET, no diagnóstico molecular fluorescente da presença do DNA do ZIKV. Os filmes foram sintetizados por polimerização química *in situ*, que é um método simples e com um alto rendimento. Diversas técnicas como UV-vis, FTIR-ATR, MEV, ângulo de contato e espectroscopia de fluorescência, foram empregadas a fim de determinar as propriedades desses filmes, bem como comprovar sua composição.

Os filmes foram usados para a detecção do DNA do ZIKV, sendo a metodologia adotada baseada na supressão da fluorescência. Na superfície dos filmes foram imobilizadas sondas (ssDNA-FAM), cujo sinal de fluorescência se tornava suprimido devido à proximidade entre o fluoróforo (FAM) e a superfície polimérica. Ao entrar em contato com o DNA complementar, acontece a hibridização entre as fitas, que então se soltam do filme, restaurando assim o sinal de fluorescência. Posteriormente, ensaios foram realizados para determinar o tempo em que a sonda fluorescente se liga ao filme (180min) e também o tempo em que acontece a máxima recuperação da fluorescência, que ocorre devido à hibridização da sonda com o DNAC.

Os resultados indicam que essa plataforma de detecção para ácidos nucleicos proposta foi capaz de diferenciar efetivamente entre sequências de ácidos nucléicos complementares e não complementares. Essa plataforma foi desenvolvida para a utilização em diagnóstico da Zika, mas se mostrou também compatível para uso na identificação de outros vírus, como o HPV 18. Os filmes, que são de baixo custo e de fácil manuseio, demonstraram um alto limite de detecção, com alta sensibilidade e boa reprodutibilidade. Esses resultados sugerem que esse tipo de filmes de bicamadas poliméricas são materiais promissores para uso em diagnóstico molecular fluorescente.

Como perspectiva para a extensão desse trabalho, em termos de modificação dos filmes podemos avaliar diferentes sínteses químicas, variando a quantidade de monômero e o oxidante, bem como a síntese de um copolímero de anilina e pirrol para observação de suas propriedades como sensor. Temos ainda a ideia de adaptar esse biossensor de DNA para permitir a detecção de RNA, o que demandará estudos adicionais para avaliar a viabilidade dessa proposta. Uma outra perspectiva futura é a aplicação desse biossensor em amostras clínicas e não apenas em sistemas modelos.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, D. et al. An ultrasensitive electrogenerated chemiluminescence-based immunoassay for specific detection of Zika virus. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–11, 2016.
- AFSAHI, S. et al. Novel graphene-based biosensor for early detection of Zika virus infection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, n. June 2017, p. 85–88, 2018.
- ARANTES, C. et al. Dessorção iônica e degradação de filmes de polipirrol dopado com dodecilsulfato induzidas por elétrons de alta energia. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 61–65, 2008.
- ARAVINDAN, N.; SANGARANARAYANAN, M. V. Influence of solvent composition on the anti-corrosion performance of copper-polypyrrole (Cu-PPy) coated 304 stainless steel. **Progress in Organic Coatings**, v. 95, p. 38–45, 2016.
- BATISTELA, V. R. Estudos de derivados de fluoresceína visando o desenvolvimento de fármacos para Terapia Fotodinâmica. **Speech Communication**, v. 51, n. 7, p. 640–655, 2007.
- BLINOVA, N. V. et al. Polyaniline and polypyrrole: A comparative study of the preparation. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 6, p. 2331–2341, 2007.
- BORGES-OSÓRIO, Maria R.; ROBINSON, Wanyce M. Genética Humana 3ed. Artmed Editora, 2013.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em 20 jul. 2018.
- BRYCE, C. F. A.; PACINI, D. The Structure and Function of Nucleic Acids. Biochemical Society, Reino Unido: 1994.
- CALIL, S. S.; ROBERTO, P. Biossensores : estrutura, funcionamento e aplicabilidade. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, p. 1–20, 2011.
- CALLISTER, D. W.; RETHWISCH, D. G. Materials Science and Engineering, An Introduction. 7th Ed. ed. **John Willey & Sons**, 2007.
- CÂNDIDO, S. A. et al. Infecção por Papilomavírus Humano de alto risco Oncogênico em mulheres atendidas no Programa de Saúde da Família da Cidade de Serra Talhada , Pernambuco. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 11, p. p.270-278, 2017.
- CANEVAROLO JR., S. V. Ciência dos Polímeros - Um texto básico para tecnólogos e engenheiros. Artliber, 2006.
- CARDOSO, C. W. et al. Outbreak of Exanthematous Illness Associated with Zika , Chikungunya , and Dengue Viruses , Salvador , Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 12, p. 2274–2276, 2015.
- CECCHETTO, J. et al. The capacitive sensing of NS1 Flavivirus biomarker. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, n. June 2016, p. 949–956, 2017.
- CHIOU, N. R. et al. Growth and alignment of polyaniline nanofibres with superhydrophobic, superhydrophilic and other properties. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 6, p. 354–357, 2007.
- CHOUGULE, M. A. et al. Synthesis and Characterization of Polypyrrole (PPy) Thin Films. **Soft Nanoscience Letters**, v. 1, n. 1, p. 6–10, 2011.
- CUI, M. et al. A highly sensitive biosensor for tumor maker alpha fetoprotein based on poly(ethylene glycol) doped conducting polymer PEDOT. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 79, p. 736–741, 2016.
- CUNHA, A. T. M.; CARVALHO, J. O.; DODE, M. A. N. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 4365, 2015.
- CUNHA, R. V. DA et al. Zika: Abordagem clínica na atenção básica. **Fiocruz Mato Grosso do Sul**, v. 1, p. 72, 2016.

- DAI, H. et al. An electrochemical sensor based on phytic acid functionalized polypyrrole/graphene oxide nanocomposites for simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II). **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 150–155, 2016.
- DE PAOLI, M. A. et al. All polymeric solid state electrochromic devices. **Electrochimica Acta**, v. 44, n. 18, p. 2983–2991, 1999.
- SILVA, A. P. de; MOODY, T. S.; WRIGHT, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. **Analyst**, v. 134, n. 12, p. 2385–2393, 2009.
- DIAS, A. DE B. V. G. Construção de Biossensores de ADN para a Avaliação da Capacidade Antioxidante. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Computação e Instrumentação Médica), Instituto Superior de Engenharia do Porto, 2014.
- DIAZ, A. F.; KANAZAW, K. K. Electrochemical Polymerization of Pyrrole. **Molecular Crystals and Liquid Crystals Incorporating Nonlinear Optics**, v. 160, n. 1, p. 79–88, 1979.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (i). Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 46, n. 5, 1952.
- DOOSE, S.; NEUWEILER, H.; SAUER, M. Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: A reporter for conformational dynamics of macromolecules. **ChemPhysChem**, v. 10, n. 9–10, p. 1389–1398, 2009.
- DULGERBAKI, C.; OKSUZ, A. U. Fabricating polypyrrole/tungsten oxide hybrid based electrochromic devices using different ionic liquids. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 27, n. 1, p. 73–81, 2016.
- EBOIGBODIN, K. E. et al. Rapid molecular diagnostic test for Zika virus with low demands on sample preparation and instrumentation. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 4, p. 369–371, 2016.
- EL-SHAZLY, A. H.; AL-TURAIIF, H. A. Improving the corrosion resistance of buried steel by using polyaniline coating. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 1, p. 211–221, 2012.
- FAEZ, R. et al. Polímeros Condutores. **Química Nova na Escola**, v. 11, p. 13–18, 2000.
- FAN, D. et al. Polydopamine Nanotubes as an Effective Fluorescent Quencher for Highly Sensitive and Selective Detection of Biomolecules Assisted with Exonuclease III Amplification. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 18, p. 9158–9165, 2016.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2636, 2014.
- FERREIRA, E. S. et al. Introdução às espectroscopias de absorção e fluorescência: aplicações farmacêuticas. **Caderno de Física da UEFS. Feira de Santana**, v. 12, n. 2, p. 41–55, 2014.
- FLAVEL, B. S. et al. Patterned polyaniline & carbon nanotube-polyaniline composites on silicon. **Soft Matter**, v. 5, n. 1, p. 164–172, 2009.
- FRANÇA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Novos compósitos de polianilina e exopolissacarídeos com aplicações em biomateriais: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, no 1, p. 37–46, 2007.
- GALIANI, P. D. et al. Compósitos de borracha natural com polianilina. **Polímeros**, v. 17, p. 93–97, 2007.
- GIZZIE, EVAN A.; NIEZGODA, J. SCOTT; ROBINSON, MAXWELL T.; HARRIS, ANDREW G.; JENNINGS, G. KANE; ROSENTHAL, S. J. AND C.; E., D. Photosystem I-Polyaniline/TiO₂ Solid-State Solar Cells: Simple Devices for Biohybrid Solar Energy Conversion. **The Royal Society of Chemistry**, 2016.
- HARPER, A.; ANDERSON, M. R. Electrochemical glucose sensors-developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. **Sensors**, v. 10, n. 9, p. 8248–8274, 2010.
- HÜMMELGEN, I. A.; ROMAN, L. S.; LIMA, J. R. DE. Polímeros conjugados como camada ativa de diodos emissores de luz e fotodetectores. **Polímeros**, v. 8, n. 3, p. 55–63, 1998.

- INZELT, G. Conducting Polymers A New Era in Electrochemistry. **Springer Science & Business Media**, 2012.
- LAKOWICZ, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3. ed. Berlin: **Springer**, 2006.
- LI, Y. et al. Colloids of polypyrrole nanotubes/nanorods: A promising conducting ink. **Synthetic Metals**, v. 221, p. 67–74, 2016.
- LIU, A. ; OLIVEIRA, M. A. Electrodeposition of polypyrrole films on aluminum from tartrate aqueous solution. **Journal of Brazil Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 143–152, 2007.
- LIU, H. et al. Exonuclease I assisted fluorometric aptasensor for adenosine detection using 2-AP modified DNA. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 256, p. 413–419, 2018.
- LIU, S. et al. Polyaniline nanofibres for fluorescent nucleic acid detection. **Nanoscale**, v. 3, p. 967–969, 2011.
- LIU, X. et al. An ultrasensitive label-free biosensor for assaying of sequence-specific DNA-binding protein based on amplifying fluorescent conjugated polymer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, n. 1, p. 218–224, 2013.
- LIU, Z.; SU, X. A novel fluorescent DNA sensor for ultrasensitive detection of *Helicobacter pylori*. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 66–72, 2017.
- LU, W. et al. Polypyrrole colloidal nanospheres as an effective fluorescent sensing platform for DNA detection. **Synthetic Metals**, v. 161, n. 15–16, p. 1766–1770, 2011.
- MAIA, D. J. et al. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 204–215, 2000.
- MALINAUSKAS, A. Chemical deposition of conducting polymers. **Polymer**, v. 42, n. 9, p. 3957-3972, 2001.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. Introdução a Polímeros. 2ª Ed. São Paulo: **Edgar Blücher**, 2004.
- MATTOSO, L. H. C. Polianilina: Síntese, estruturas e propriedades. **Química Nova**, 1996.
- MAZEIKO, V. et al. Gold nanoparticle and conducting polymer-polyaniline-based nanocomposites for glucose biosensor design. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 189, p. 187–193, 2013.
- MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 2: Aplicações em Sensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n 3 p. 62–77, 2012a.
- MEDEIROS, E. S. et al. Uso de Polímeros Condutores em Sensores. Parte 1: Introdução aos Polímeros Condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n 2 p. 62–77, 2012b.
- MELO, C. P. de. Polímeros Condutores. **Ciência hoje**, v. 36, p. 38-38, 1987.
- MOTA, A. A. R. et al. Fotofísica teórica (DFT) de sondas fluorescentes benzotriazolídicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 357–389, 2015.
- MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. Microbiología médica. **Elsevier** Brasil, 2010.
- MUTHUKUMAR, N.; THILAGAVATHI, G.; KANNAIAN, T. Polyaniline-coated nylon lycra fabrics for strain sensor and electromagnetic interference shielding applications. **High Performance Polymers**, v. 27, n. 1, p. 105–111, 2015.
- NAKAO, H., HAYASHI, H., YOSHINO, T., SUGIYAMA, S., OTOBE, K., OHTANI, T. Development of Nove Polymer-Coated Substrates for Straightening and Fixing DNA. **Nano Letters** 2(5), 475-479, 2002.
- NAVALE, S. T. et al. Highly selective and sensitive room temperature NO₂ gas sensor based on polypyrrole thin films. **Synthetic Metals**, v. 189, n. 2, p. 94–99, 2014.
- NAVALE, Y. H. et al. Specific capacitance, energy and power density coherence in electrochemically synthesized polyaniline-nickel oxide hybrid electrode. **Organic Electronics: physics, materials, applications**, v. 57, p. 110–117, 2018.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry 6th ed. 6. ed. ed. Porto Alegre: 2013.
- NEVES, S. DAS. Propriedades Fotoeletroquímicas da Polianilina. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 1997.

- NGUYEN, H. D. et al. pH sensitivity of emeraldine salt polyaniline and poly(vinyl butyral) blend. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 4, 2014.
- NICOLINI, A. M.; MCCRACKEN, K. E.; YOON, J. Y. Future developments in biosensors for field-ready Zika virus diagnostics. **Journal of Biological Engineering**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2017.
- OLIVEIRA, J. E. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8.1, p. 1–11, 2013.
- PAN, T. J. et al. Electrodeposited conductive polypyrrole/polyaniline composite film for the corrosion protection of copper bipolar plates in proton exchange membrane fuel cells. **Journal of Power Sources**, v. 302, p. 180–188, 2016.
- PARDEE, K. et al. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1255–1266, 2016.
- PARK, J. W. et al. Polypyrrole nanotube embedded reduced graphene oxide transducer for field-effect transistor-type H₂O₂ biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1822–1828, 2014.
- PARK, K. H. et al. High performance dye-sensitized solar cell by using porous polyaniline nanotubes as counter electrode. **Chemical Engineering Journal**, v. 260, p. 393–398, 2015.
- RAD, Ali Shokuhi et al. Ab-initio study of interaction of some atmospheric gases (SO₂, NH₃, H₂O, CO, CH₄ and CO₂) with polypyrrole (3PPy) gas sensor: DFT calculations. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 220, p. 641–651, 2015.
- RADHAKRISHNAN, S. et al. Polypyrrole-poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-Ag (PPy-PEDOT-Ag) nanocomposite films for label-free electrochemical DNA sensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 47, p. 133–140, 2013.
- RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016.
- REGAÇO, M. P. Sensor de amônia baseado em filmes finos de polianilina para criadouros de frango de corte. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo. 2006.
- REUNG-U-RAI, Amparat et al. Synthesis of highly conductive polypyrrole nanoparticles via microemulsion polymerization. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 18, n. 2, p. 27–31, 2008.
- SALGE, A. K. M. et al. Infecção pelo vírus Zika na gestação e microcefalia em recém-nascidos: revisão integrativa de literatura, 2016. Acesso em Disponível em <<http://dx.doi.org/10.5216/ree.v18.39888>>. Acesso em 10 jun. 2018.
- SALUNKHE, R. R. et al. Large-scale synthesis of reduced graphene oxides with uniformly coated polyaniline for supercapacitor applications. **ChemSusChem**, v. 7, n. 6, p. 1551–1556, 2014.
- SHI, Y. et al. Nanostructured conductive polypyrrole hydrogels as high-performance, flexible supercapacitor electrodes. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 17, p. 6086–6091, 2014.
- SHUKLA, S. et al. Rapid Detection Strategies for the Global Threat of Zika Virus: Current State, New Hypotheses, and Limitations. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. October, p. 1–15, 2016.
- SILVA, A. O. Materiais nanoestruturados baseados em polímeros condutores: estudo teórico/experimental da obtenção do material polipirrol com o 4, 5-bis (carboximetilsulfanil)-1, 3-ditiola-2-tiona, ppy/[(CH₂COO) 2dmit] 2. ppy/[(CH₂COO) 2DMIT]. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Itajubá, Itajubá-MG, 2010.
- SONG, B. H. et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 50–64, 2017.
- SONG, C.; WANG, G. Y.; KONG, D. M. A facile fluorescence method for versatile biomolecular detection based on pristine α -Fe₂O₃nanoparticle-induced fluorescence quenching. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 68, p. 239–244, 2015.
- SONG, J. et al. Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 14, p. 7289–7294, 2016.
- SPINACÉ, M. A. DA S.; PAOLI, M. A. DE. Revisão. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 65–72, 2005.

- STEJSKAL, J.; SAPURINA, I. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 815–826, 2005.
- STEPAKOV, A. et al. Modified Synthesis of 6-carboxyfluorescein (6-FAM): Application to Probe Labeling for Conventional Cytogenetics. **British Journal of Applied Science & Technology**, v. 7, n. 4, p. 423–428, 2015.
- SZÖLLÖSI, J.; ALEXANDER, D. R. The application of fluorescence resonance energy transfer to the investigation of phosphatases. **Methods in enzymology**, v. 366, p. 203–24, 2003.
- TAN, H. et al. Magnetic porous carbon nanocomposites derived from metal-organic frameworks as a sensing platform for DNA fluorescent detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, p. 136–142, 2016.
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. Microbiologia. São Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2012.
- VALEUR, B. **Molecular fluorescence: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2001.
- VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. A brief history of fluorescence and phosphorescence before the emergence of quantum theory. **Journal of Chemical Education**, v. 88, n. 6, p. 731–738, 2011.
- VOET, Donald; VOET, Judith G. Bioquímica. **Artmed Editora**, 2013.
- WAN, E.; GALEMBECK, E.; GALEMBECK, F. Como se fazem macromoléculas: a conectividade das substâncias químicas. **Química Nova na Escola**, v. Edição Esp, p. 5–8, 2001.
- WANG, H. et al. Photoelectric characteristics of the p-n junction between ZnO nanorods and polyaniline nanowires and their application as a UV photodetector. **Materials Letters**, v. 162, p. 83–86, 2016.
- WANG, J. et al. High conductivity graphene-like MoS₂/polyaniline nanocomposites and its application in supercapacitor. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 619, p. 38–43, 2015.
- WANG, K. et al. Cascaded multiple amplification strategy for ultrasensitive detection of HIV/HCV virus DNA. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 87, p. 116–121, 2017.
- WANG, L. et al. Conjugation polymer nanobelts: A novel fluorescent sensing platform for nucleic acid detection. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 6, p. 2–7, 2011.
- WANG, Y. et al. Oriented growth of polyaniline nanofiber arrays onto the glass and flexible substrates using a facile method. **Applied Surface Science**, v. 428, p. 315–321, 2018.
- WENG, B. et al. Gemini surfactant doped polypyrrole nanodispersions: An inkjet printable formulation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1918–1924, 2011.
- 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, p. 216–222, 2012.
- WU, T.-F.; HONG, J.-D. Humidity sensing properties of transferable polyaniline thin films formed at the air–water interface. **RSC Adv.**, v. 6, n. 99, p. 96935–96941, 2016.
- XIE, B. P. et al. Simultaneous detection of Dengue and Zika virus RNA sequences with a three-dimensional Cu-based zwitterionic metal–organic framework, comparison of single and synchronous fluorescence analysis. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 254, p. 1133–1140, 2018.
- YAN, J. K. et al. Highly selective and sensitive nucleic acid detection based on polysaccharide-functionalized silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, p. 17–21, 2015.
- YANG, S. P. et al. Platforms Formed from a Three-Dimensional Cu-Based Zwitterionic Metal-Organic Framework and Probe ss-DNA: Selective Fluorescent Biosensors for Human Immunodeficiency Virus 1 ds-DNA and Sudan Virus RNA Sequences. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 12206–12214, 2015.
- YUAN, J.; GAPONIK, N.; EYCHMÜLLER, A. Application of polymer quantum dot-enzyme hybrids in the biosensor development and test paper fabrication. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 11, p. 5047–5052, 2012.

- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *v. 110*, n. June, p. 569–572, 2015.
- ZHANG, L. et al. Pd nanowires as new biosensing materials for magnified fluorescent detection of nucleic acid. **Analytical Chemistry**, *v. 84*, n. 8, p. 3568–3573, 2012.
- ZHANG, X. et al. A new photoelectrochemical biosensors based on DNA conformational changes and isothermal circular strand-displacement polymerization reaction. **Biosensors and Bioelectronics**, *v. 39*, n. 1, p. 338–341, 2013.
- ZHANG, Y. et al. Preparation and Characterizing of PANI/PDMS Elastomer for Artificial Muscles. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, *v. 301*, n. 1, p. 0–5, 2018.
- ZHAO, C. E. et al. Employing a Flexible and Low-Cost Polypyrrole Nanotube Membrane as an Anode to Enhance Current Generation in Microbial Fuel Cells. **Small**, *v. 11*, n. 28, p. 3440–3443, 2015.
- ZOPPI, R. A.; DE PAOLI, M.-A. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: Perspectivas atuais. **Química Nova**, 1993.

ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE OS REAGENTES UTILIZADOS

Reagente	Fórmula Molecular	Fabricante	Origem
Anilina	$C_6H_5NH_2$	Nuclear	Brasil
Pirrol	C_4H_5N	Sigma Aldrich	EUA
Cloreto de ferro III hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Dinâmica	Brasil
Persulfato de amônio (APS)	$(NH_4)_2S_2O_8$	Sigma Aldrich	EUA
Ácido Clorídrico	HCl	Química Moderna	Brasil
Tris (Hidroximetil) aminometano	$(CH_2OH)_3CNH_2$	Promega	EUA
Hidróxido de sódio	NaOH	Química Moderna	Brasil
Cloreto de Magnésio hexahidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Vetec	EUA
poli(tereftalato de etileno) - PET	$(C_xH_yO_2)_n$	Filiperson	Brasil

**ANEXO B – SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS UTILIZADA NOS
EXPERIMENTOS DE HPV 18**

OLIGONUCLEOTÍDEO	SEQUÊNCIA
DNA marcado com fluoróforo FAM (ssDNA-FAM)	5'- FAM-CCG AGC ACG ACA GGA ACG ACT - 3'
DNA complementar (DNAc)	5'- AGT CGT TCC TGT CGT GCT CGG - 3'