

NAYRIM BRIZUELA GUERRA

**Sensor eletroquímico de quitosana e polidopamina fabricados por
tecnologia de eletrofiação para detecção de íons Ca^{2+} em fluidos
biológicos**

Relatório de Pós-doutorado realizado
na Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Faculdade de Ciências,
Bauru.

Supervisor: Prof. Dr. Paulo Noronha
Lisboa Filho.

Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe UNESP) - 5534

**Bauru
2025**

RELATÓRIO CIENTÍFICO FINAL - PROPe 5534

1. Objetivo do projeto

Desenvolver um sensor eletroquímico composto principalmente por fibras eletrofiadas de quitosana e polidopamina para detecção não invasiva de íons de Ca^{2+} em fluidos biológicos.

2. Principais atividades realizadas

Inicialmente, foram propostas três rotas de sínteses, sendo que as duas rotas com fibras de quitosana pura [(i) e (ii)] não foram possíveis de obter. Várias tentativas foram realizadas, contudo, todas sem sucesso. De acordo com Koosha *et al.*, a quitosana por ser um polímero polieletrólito catiônico com ricas porções amino, apresenta forte repulsão eletrostática entre suas porções positivas, dificultando o emaranhamento da cadeia, fato essencial para a formação da fibra. Em função disso, a terceira rota proposta (iii) foi desenvolvida com algumas modificações adicionais que não estavam descritas na proposta inicial.

O álcool polivinílico (PVA) é um polímero hidrofílico, biocompatível, biodegradável e com abundantes grupos hidroxila, tendo como principal atrativo sua excelente eletrofiação. Nesse sentido, preparamos soluções com 10 wt% de PVA e 3 wt% de solução de quitosana em 2% de ácido acético, com o intuito de aumentar a fiabilidade da quitosana. Todas os procedimentos foram realizados à temperatura ambiente e diferentes proporções de misturas foram preparadas: 50/50, 60/40 e 70/30 (PVA/CS). Vários parâmetros de *electrospinning* foram testados, *e.g.*, razão de fluxo de 0,5; 0,6 e 0,7 mL/h, onde as melhores fibras foram com 0,5 mL/h, e voltagens inferiores a 15 kV não favoreceram a formação de fibras. Finalmente, os parâmetros escolhidos foram: distância da agulha até coletor (12 cm), fluxo (0,5 mL/h), voltagem (20 kV) e tempo (10 minutos).

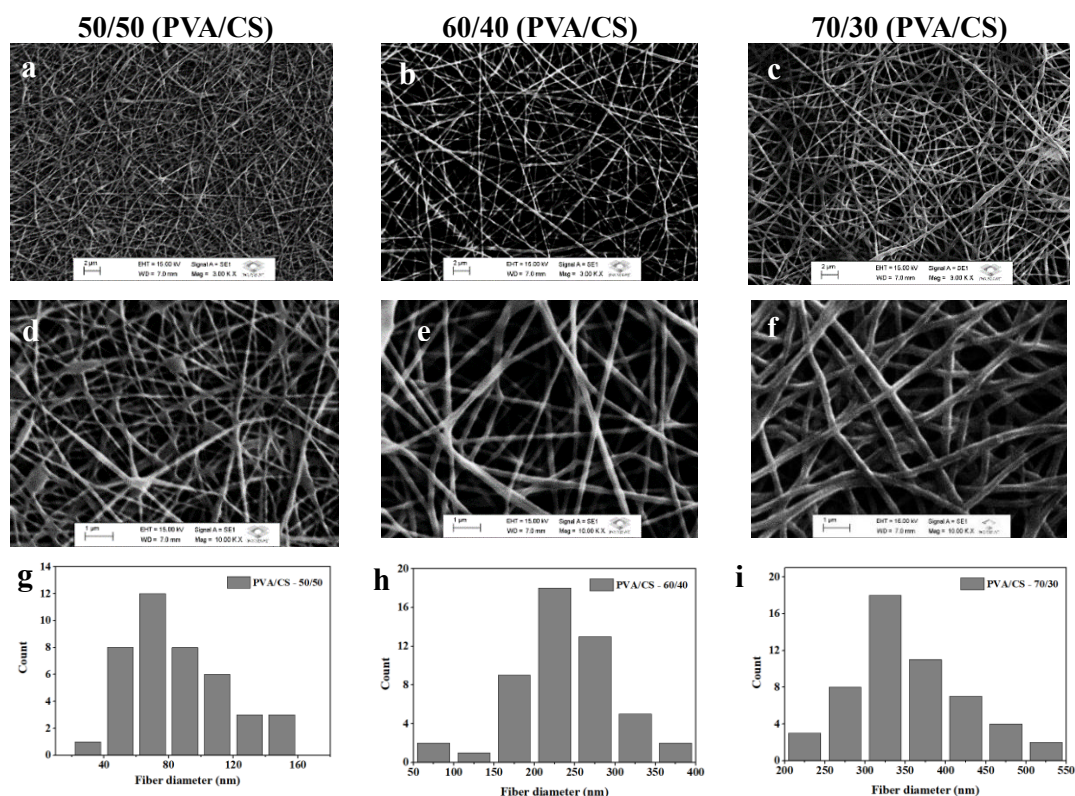


Figura 1: Imagens de microscopias eletrônicas de varredura das fibras de PVA/CS (a,d) 50/50, (b,e) 60/40 e (c,f) 70/30 com ampliação de 3000× e 10,000×, respectivamente. (Microscópio Eletrônico de Varredura (Zeiss EVO-LS15)). (g-i) Histogramas da distribuição dos tamanhos das fibras nas amostras PVA/CS 50/50, 60/40 e 70/30, respectivamente (*OriginPro* 9.0).

Notamos que houve aumento no diâmetro das fibras, sugerindo maior espessura nas amostras com maior quantidade de PVA (Figura 1), obtendo valores médios dos diâmetros de: 85, 220 e 350 nm, respectivamente. As nanofibras exibiram superfícies fibrilar lisa e homogêneas com estrutura interligada clara. Posteriormente, as nanofibras de PVA/CS de menor diâmetros (50/50) foram escolhidos para realizar a funcionalização com a dopamina (DA). Para isso adicionamos 0,05 g e 0,1 g de DA nas soluções de PVA/CS e agitamos por 15 minutos (PVA/CS/DA_{0,05} e PVA/CS/DA_{0,1}). A partir das soluções homogêneas de cada mistura e utilizando os mesmos parâmetros de *electrospinning* descritos anteriormente, fabricamos novas membranas fibrosas sobre substratos de carbono vítreo previamente lavados (Figura 2).

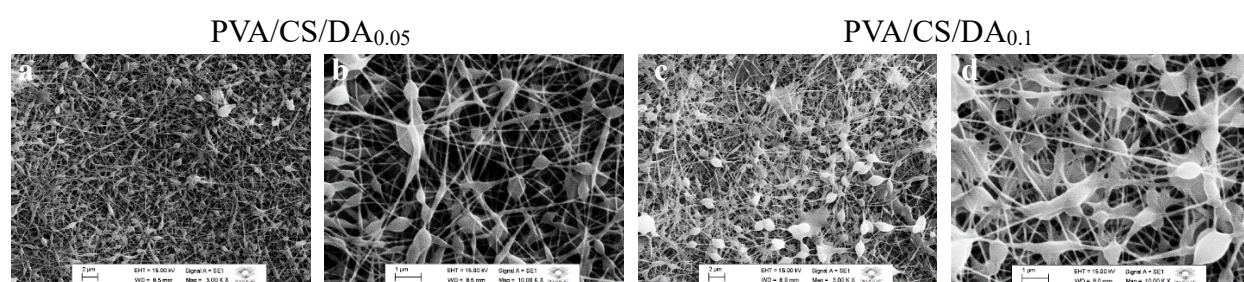


Figura 2: Imagens de microscopias eletrônicas de varredura das fibras de PVA/CS/DA_{0,05} e PVA/CS/DA_{0,1} com ampliação de (a,c) 3000× e (b,d) 10,000×, respectivamente.

Após adição da DA, notamos que as fibras preservaram tanto o diâmetro, como sua morfologia, porém, houve aparecimento de partículas poliméricas com formato arredondados, existindo maior quantidade destes agregados nas fibras com maior concentração de DA. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Shin *et al.* que estudaram a modificação química de nanofibras de PCL por PDA e evidenciaram que a morfologia da superfície era dependente da concentração da solução de dopamina.

A preparação do sensor eletroquímicos fabricados pela técnica de eletrofiação proporcionou grande área superficial e boa interconexão o que fez as membranas fibrosas interessantes para identificação de elementos. Por outra parte, a quitosana que contém um alto teor de porções hidroxila e carboxila e os grupos amina e catecol da PDA fornecem a possibilidade de complexar com vários íons metálicos polivalentes para formar quelatos. Nesse sentido, as fibras PVA/CS/DA_{0,1} foram depositadas sobre eletrodos de carbono impressos (Drop Sens 110, Metrohm) com área ativa de 0,11 cm². Para avaliar a identificação de íons Ca²⁺, prévio aos testes eletroquímicos, as amostras foram submersas em solução de 0.5 M CaCl₂. Os íons de cálcio desempenham um papel crucial em vários processos fisiológicos no corpo humano. Portanto, a estimativa dos íons de cálcio é essencial por várias razões. Primeiramente, para manter a saúde óssea, descrever as funções musculares, estudar a função nervosa, o comportamento hormonal.

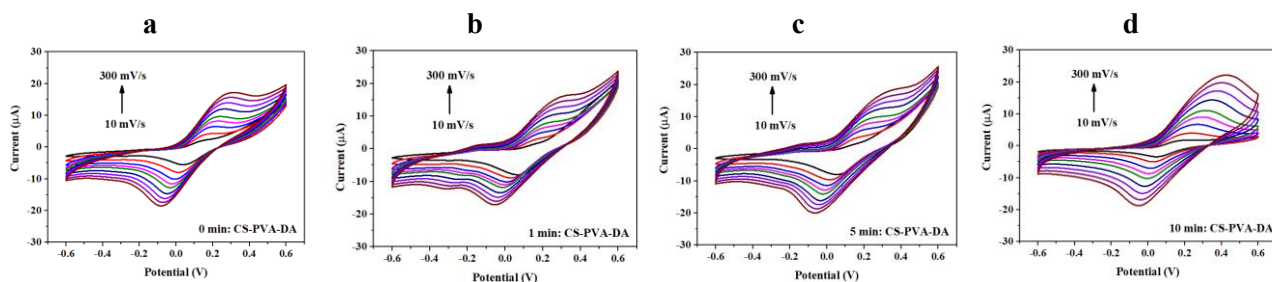


Figura 3: Voltamogramas dos filmes com taxa de varredura de 10 mV/s a 300 mV/s submersas em (a) 0, (b) 1, (c) 5 e (d) 10 minutos em 0.5 M CaCl_2 .

As análises foram realizadas pela imersão do eletrodo em 10 mL de uma solução de 10 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 100 mM KCl com varredura de -0,6 V a 0,6 V e uma taxa de varredura de 10 mV/s, 25 mV/s, 50 mV/s, 75 mV/s, 100 mV/s, 150 mV/s, 200 mV/s, 250 mV/s e 300 mV/s e extração de dados no software Nova 2.1. Na Figura 3, observamos variações na reatividade de superfície para tempo de contato dos eletrodos revestidos com as fibras e a taxa de varredura no processo redox (Figura 3). Observamos que os filmes sem ter contato com os íons de cálcio, apresentaram ligeiramente menor corrente de pico anódico (P_a) e pico catódico (P_c), com um aumento nos valores nos diferentes tempos de imersão (Tabela 1). Esse comportamento sugere uma organização supramolecular, com aumento de sítios eletroativos, possíveis íons cálcios ancorados na molécula de dopamina.

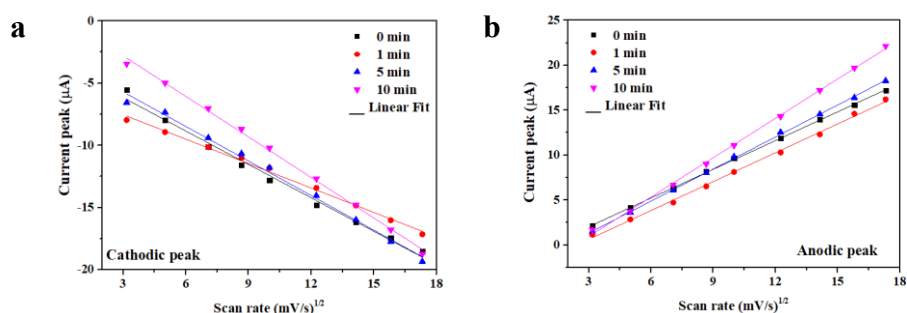


Figura 4: Gráficos da corrente de (a) pico catódico e (b) anódico pela raiz quadrada da velocidade de varredura de todas os sensores.

Tabela 1: Resumo dos valores de pico anódico (P_a), pico catódico (P_c), coeficiente de variação angular do pico anódico (CA_{Pa}), coeficiente de variação angular do pico catódico (CA_{Pc}) com seus respectivos valores de confiabilidade dos resultados (χ^2) e variação dos potenciais de oxidação e redução (ΔE_P).

Amostras	P_a (μA)	P_c (μA)	CA_{Pa}	χ^2	CA_{Pc}	χ^2	ΔE_P (mV)
0 min	15.33	-16.12	-0.89	0.9903	1.06	0.9996	395
1 min	16.26	-17.16	-0.65	0.9905	1.07	0.9975	370
5 min	18.34	-19.34	-0.92	0.9930	1.18	0.9994	397
10 min	22.13	-18.75	-1.08	0.9971	1.46	0.9986	468

Diferentes valores de taxa de varredura foram testados em todas as amostras, e observamos um aumento gradual na corrente de pico com o aumento da taxa de varredura, além de um deslocamento na direção positiva para P_a e na direção negativa para P_c . A Figura 4 mostra comportamento linear em todas as amostras para ambos os picos. Os valores de coeficiente angular (CA) foram apresentados na Tabela 1, e observamos um aumento em CA_{Pa} e CA_{Pc} na medida que

aumentou o tempo de imersão. Em todos os casos, houve uma correlação linear entre a taxa de varredura e o crescimento potencial, com boa concordância entre os resultados demonstrados pelo valor de χ^2 acima de 0,99. Os dados de ΔE_p aumentam com o aumento do tempo de contato entre o sensor e a solução de CaCl_2 , apoiando o comportamento de complexação entre os íons de cálcio e a dopamina.

O impacto do aumento da concentração de íons Ca^{2+} [0.1, 0.25, 0.5, 0.75 e 1 M] na resposta voltamétrica cíclica da corrente foi estudado. À medida que a concentração de íons cálcio aumentou de 0.1 M para 1M, a resposta da corrente catódica demonstrou um aumento significativo. A Figura 5 mostra o gráfico de calibração de diferentes concentrações de íons Ca^{2+} correspondentes à voltametria cíclica a uma taxa de varredura de 300 mV/s. O sensor testado de PVA/CS/DA apresentou resposta linear de 0.1 M a 1 M e a equação de regressão linear (Eq. (1)) para a curva de calibração pode ser expressa da seguinte forma: $I_{pc}(\mu\text{A}) = 17.41 [\text{Ca}^{2+}](\text{M}) + 6.39$; $R^2 = 0,94$.

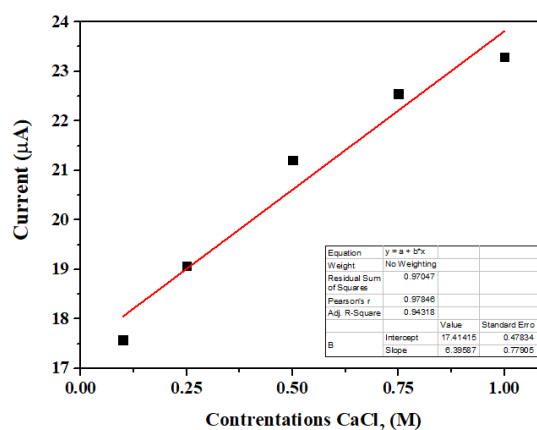


Figura 5: Curva de calibração obtida a partir de medições voltamétricas cíclicas para diferentes concentrações de íons Ca^{2+} em solução aquosa.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LDQ) foram calculados usando as equações (2) e (3). $\text{LD} = (3 \times \sigma)/s$ (Eq. (2)) e $\text{LDQ} = (10 \times \sigma)/s$ (Eq. (3)); onde “ σ ” é o desvio padrão da interceptação em y e “s” é a inclinação da curva de calibração e O LD e o LDQ do sensor desenvolvido de PVA/CS/DA em relação à detecção de íons cálcio foram calculados em 0.22 M e 0.73 M, respectivamente.

Após os testes eletroquímicos, foram realizadas caracterizações físico-químicas na área ativa do dispositivo (fibras PVA/CS/DA), assim como na solução de eletrolítica utilizada ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$). A análise por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida para estudar as interações químicas dos componentes do compósito, evidenciadas por mudanças nas bandas espectrais características. Os espectros da Figura 6a indicaram o aumento da intensidade da banda larga associada à presença de estiramento -OH (3650 cm^{-1} e 2900 cm^{-1}) com aumento do tempo de imersão dos sensores na solução aquosa de CaCl_2 . Mesmo comportamento foi evidenciado com o pico em 2355 cm^{-1} relacionada com o estiramento simétrico O–H. As alterações mencionadas nos espectros com o aumento do tempo em solução alcalina de CaCl_2 , assim como a identificação das bandas relacionadas com os polímeros PVA/CS/DA indicam que os cátions Ca^{2+} podem promover a oxidação *in situ* de dopamina. Os espectros Raman das fibras puras e depois de 10 minutos em contato com solução de CaCl_2 são apresentados na Figura 6b. As vibrações de interações dos íons metálicos (formação de quelatos, íon-DOPA) são observadas na região de $500\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$. Note-se a maior intensidade dessa banda na amostra após 10 minutos de incubação na

solução de CaCl_2 . Além disso, uma banda em 1240 cm^{-1} também é indicativa de quelatos metálicos. As soluções eletrolíticas de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ após os diferentes períodos de imersão foram avaliadas pela espectroscopia de UV-Vis, com o intuito de verificar se houve alguma liberação de cálcio durante as análises eletroquímicas. Na Figura 6c observamos as três transições permitidas por spin nos espectros UV-Vis do ferrocianeto (310, 330 e 480 nm). Não foram observados deslocamentos significativos, sugerindo que não houve desprendimento de material durante as caracterizações eletroquímicas.

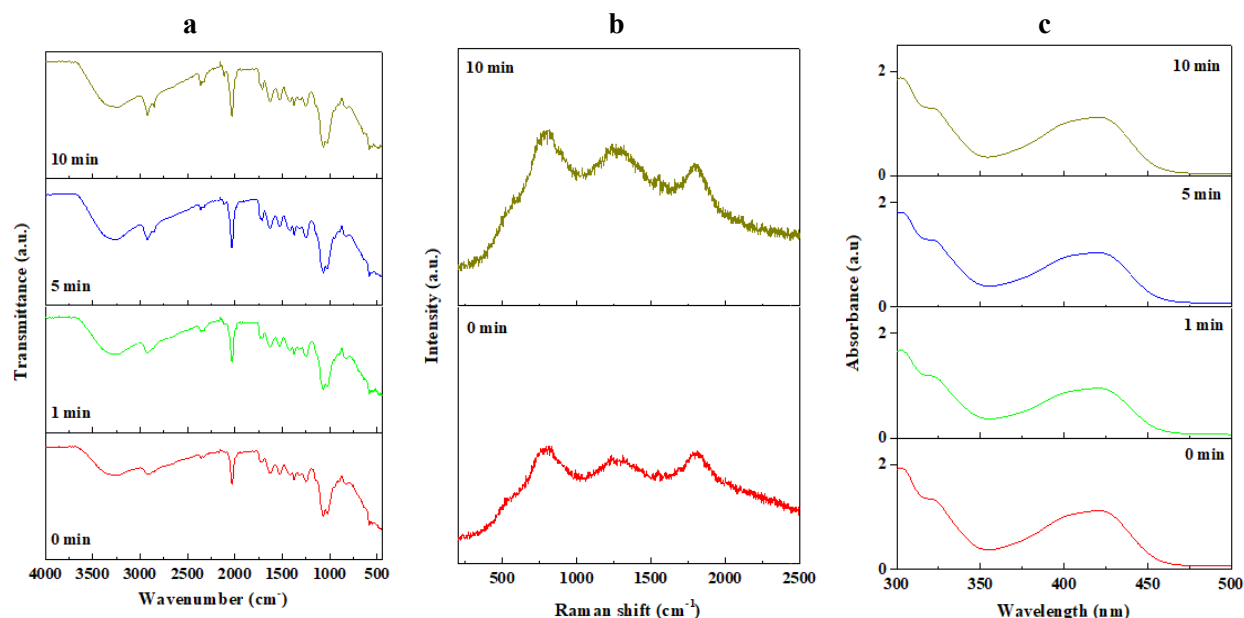


Figura 6: Espectros de (a) FTIR e (b) Raman das fibras PVA/CS/DA depositadas nos sensores; (c) UV-Vis da solução de eletrolítica após os testes eletroquímicos.

Em resumo, obtivemos um sensor eletroquímico composto por fibras eletrofiadas de quitosana, PVA e dopamina para detecção não invasiva de íons de cálcio. A técnica de eletrofiação permitiu obter fibras com grande área superficial e boa interconexão, propriedades atraentes para identificação de elementos. A introdução da dopamina não apenas melhorou a estabilidade das nanofibras em fluidos, como também forneceu sítios de ligação ativos para os íons Ca^{2+} . O desempenho do sensor eletroquímico foi avaliado através de caracterizações eletroquímicas, estimando os limites de detecção dos íons de cálcio em uma faixa de concentrações.

3. Produção bibliográfica

- Electrochemical sensors developed through electrospinning technique for detecting calcium II in biological fluids. **EM PREPARAÇÃO**
- Maximizing surface reactivity: The impact of electrochemical oxidation as a polydopamine modification step (2025) *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*. Teixeira JV; Gonçalves L; Guerra NB, Ribeiro CG, Roberto M, Noronha P. **PUBLICADO**
- Probing n-Type Conduction in Eumelanin Using Organic Electrochemical Transistors. (2025) *Acs Applied Electronic Materials*. Nozella N, Paulin JV, Nogueira G, Guerra NB, Furlan R, Graeff C. **PUBLICADO**

4. Atividades complementares

- Coorientação da aluna de mestrado Gabrieli Andriotti e aluno de I. Científica Giovanni Ramos.
- Treinamento prático e teórico de Espectroscopia Raman acoplado a Eletroquímica.