

Desenvolvimento de sensores eletroquímicos para o monitoramento de bactérias

Development of electrochemical sensors for monitoring bacteria

Danilo Mota Zulianelli¹, Douglas José Coutinho²

RESUMO

As limitações físicas do espectrofotômetro UV-Vis o impedem de diferenciar baixas concentrações de células. Desse modo, este estudo buscou detectar íons intracelulares da bactéria *E. coli* utilizando medidas elétricas para, futuramente, estimar o número de unidades formadoras de colônia. Essas medidas elétricas foram obtidas por dois métodos. No primeiro, usou-se transistores eletroquímicos construídos a partir da deposição de um filme fino de PEDOT:PSS sobre um canal com ou sem adição de etilenodiamina. No segundo método, colocou-se 50 µL de solução padrão de NaCl em várias concentrações sobre um canal de dimensões 1,5 x 0,2 cm. Quanto ao canal, este foi obtido pela corrosão ácida de um substrato de vidro com deposição de óxido de índio estanho (ITO). Com este dispositivo, foi obtida a impedância em função da frequência do eletrólito por espectroscopia de impedância. Foram também preparadas amostras de lisados de *E. coli* em ciclos de centrifugação e troca do meio líquido por água deionizada três vezes, seguida de uma etapa de ultrasonicação. Ao final, destacou-se a capacidade de aferir as baixas concentrações de íons intracelulares dos lisados, mas ainda se faz conveniente propor um método direto de relacionar a impedância com o número de células.

PALAVRAS-CHAVE: impedância, íons, transistor.

ABSTRACT

The physical limitations of the UV-Vis spectrophotometer prevent it from differentiating low concentrations of cells. Therefore, this study sought to detect intracellular ions from the *E. coli* bacteria using electrical measurements to, in the future, estimate the number of colony-forming units. These electrical measurements were obtained by two methods. In the first, electrochemical transistors were used built from the deposition of a thin film of PEDOT:PSS on a channel with or without the addition of ethylenediamine. In the second method, 50 µL of standard NaCl solution at various concentrations was placed in a channel measuring 1.5 x 0.2 cm. As for the channel, it was obtained by acid etching of a glass substrate with deposition of indium tin oxide (ITO). With this device, the impedance was obtained as a function of the electrolyte frequency by impedance spectroscopy. *E. coli* lysate samples were also prepared using centrifugation cycles and exchanging the liquid medium for deionized water three times, followed by an ultrasonication step. In the end, the ability to measure low concentrations of intracellular ions in lysates was highlighted, but it is still convenient to propose a direct method of relating impedance to the number of cells.

KEYWORDS: impedance, ions, transistor.

INTRODUÇÃO

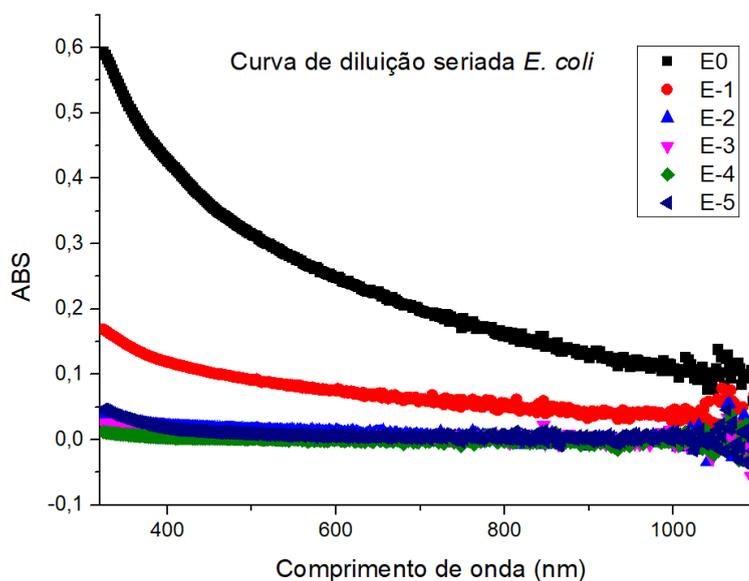
As limitações físicas do espectrofotômetro UV-Vis na detecção de baixas concentrações celulares motivaram inicialmente este trabalho. Estas limitações são geradas pela necessidade de uma concentração mínima, mas elevada, necessária para

¹ Bolsista da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: danilomotazulianelli@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 9152680783056200.

² Docente do Núcleo de Física (NUFIS). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: douglasjcoutinho@gmail.com. ID Lattes: 1916064207740861.

ser detectada pelo equipamento e pelo efeito da dispersão de luz sobre as células que mascaram concentrações diluídas conforme observado na figura 1.

Figura 1 – Dispersão de luz no espectrofotômetro UV-Vis de *E. coli* diluições de 10^0 a 10^{-5}



Fonte: Autores.

Desse modo, este estudo visa superar esse desafio, investigando a detecção de íons, anteriormente intracelulares, em soluções aquosas de lisados para estimar, posteriormente, a concentração inicial do microrganismo. Para tal objetivo, a nova abordagem se dá por meio de dispositivos eletroquímicos orgânicos com o polímero PEDOT:PSS, e dispositivos inorgânicos à base de óxido de índio estanho (ITO).

Em relação aos constituintes, o polímero PEDOT:PSS se compreende como uma associação de dois polímeros sendo estes o poli(etilenodioxítiofeno):poli(estireno sulfonato), enquanto que o ITO é um semicondutor metálico. O PEDOT, originalmente, se apresenta sem cargas, entretanto a interação deste com o PSS promove a formação de lacunas, tornando o sistema um semicondutor dopado (KEENE, *et al.* 2013).

Ainda no presente trabalho, este tem como objetivo, também, avaliar aditivos externos ao polímero que possam ampliar a sensibilidade natural (razão On/Off) como etilenodiamina (EDA). O composto tem o propósito de atuar como desdopante no dispositivo orgânico (VAN DER POL, *et al.* 2019).

MATERIAIS E MÉTODOS

O POLÍMERO DE PEDOT:PSS

O polímero foi preparado utilizando 4275 μL de PEDOT:PSS PH1000, 216 μL de etilenoglicol, 9 μL de tetraetoxisilano (TEOS) e 45 μL de ácido dodecilbenzeno sulfônico (DBSA) para formar 4,5 mL de polímero denominado “puro” ou “pristine”. A deposição consistia na aplicação de 200 μL do polímero PEDOT:PSS por meio de spin coating a 1500 RPM durante 2 minutos, seguido de tratamento térmico a 100 °C por 10 minutos

(KEENE, *et al.* 2013). Sua utilização se deu por medidas de output de transistor e espectroscopia de impedância.

Foi avaliado o efeito com e sem a adição da etilenodiamina (EDA) no polímero. A adição consistiu numa atmosfera de vapor do composto sobre o polímero por 20 minutos. Logo após isso, foi colocado o dispositivo novamente em chapa de aquecimento a 100 °C por 10 minutos para minimizar os efeitos de degradação.

O DISPOSITIVO

O dispositivo utilizado para as medições elétricas foi um chip de óxido de índio estanho (ITO) depositado sobre vidro com um canal de 1,5 x 0,2 cm produzido por um tratamento ácido. Ele foi utilizado para os testes com concentrações de $5 \cdot 10^{-6}$ mol/L a 3 mol/L de NaCl e avaliação do polímero em espectroscopia de impedância. O volume de amostra utilizado para todos os testes foi de 50 μ L.

PREPARO DO LISADO

A bactéria escolhida para os testes biológicos foi a *Escherichia coli*. Ela foi cultivada em tubos falcon com caldo Luria Bertani (LB) a 35 °C em 200 RPM até atingir a fase estacionária de crescimento microbiano. Devido à elevada concentração de íons do meio de cultivo, após o crescimento do microrganismo até sua fase estacionária, as amostras foram submetidas a um processo de centrifugação para separar o fluido, descarte e ressuspensão da massa celular em água deionizada três vezes, método esse, desenvolvido experimentalmente.

Esse método foi crucial para assegurar que as análises posteriores pudessem fornecer dados precisos sobre a relação entre os íons internos e as UFC, minimizando quaisquer interferências provenientes do meio de cultura inicialmente utilizado. Antes da análise da amostra, uma alíquota foi coletada para determinar o número inicial de íons.

Em seguida, um processo de ultrasonicação foi aplicado durante 15 minutos para a lise completa das células antes de prosseguir com as medições de impedância. O tempo de ultrasonicação foi determinado experimentalmente e comprovado pelo plaqueamento das amostras lisadas em LB sólido.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, se fez necessário entender o funcionamento do PEDOT:PSS para compreender seus comportamentos em cada teste. O PEDOT, isoladamente, não se apresenta como um bom condutor, entretanto os grupos SO_3^- do PSS induzem a formação de lacunas eletrônicas ao interagir com a ressonância dos anéis de tiofeno do PEDOT. Graças a essas lacunas o sistema, como um todo, passa a se comportar como um semicondutor orgânico (KIM, *et al.* 2019) caracterizando um Estado On (ligado).

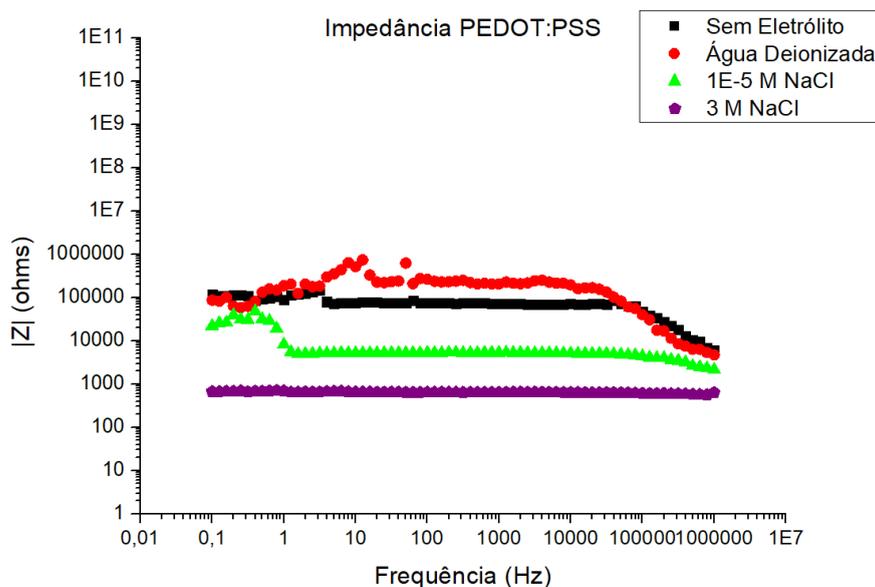
Quando uma tensão positiva é aplicada no gate de um transistor contendo esta associação de polímeros, os íons em solução (cátions) penetram na matriz e neutralizam o PSS. Por consequência, as lacunas induzidas no PEDOT se desfazem tendendo a aumentar a resistência do material (KIM, *et al.* 2019), caracterizando um Estado Off (desligamento).

Porém ao analisar a variação, em ordem de grandeza, deste estado On e Off do sistema puro em um transistor, pôde ser observada a variação de apenas uma ordem, podendo indicar que o polímero ainda estava muito ligado. Pensando neste novo problema, a utilização da etilenodiamina (EDA) permitiu um pré-tratamento do dispositivo deixando previamente mais desligado pois também poderia neutralizar o PSS (VAN DER POL, *et al*, 2019). A adição de EDA causou, como esperado, um aumento da razão para duas ordens de grandeza.

Um aumento na razão pode significar que o dispositivo teria uma capacidade melhor de diferenciar baixas variações de concentração de cátions em solução pois estaria mais desligado, logo uma pequena quantidade de cátions já teria uma resposta maior. Entretanto, ainda este modelo carece de melhorias nessa sensibilidade, mas em paralelo, a adição de EDA aumentou a degradação do PEDOT:PSS em água por aumento de solubilidade.

Dadas estas novas condições preferiu-se avaliar por espectroscopia de impedância o comportamento do polímero para descrever melhor suas características eletrônicas. Conforme observado na figura 2, a variação de 10^{-5} a 3 mol/L de NaCl causou uma resposta muito baixa prejudicando a eficiência de um sensoriamento iônico.

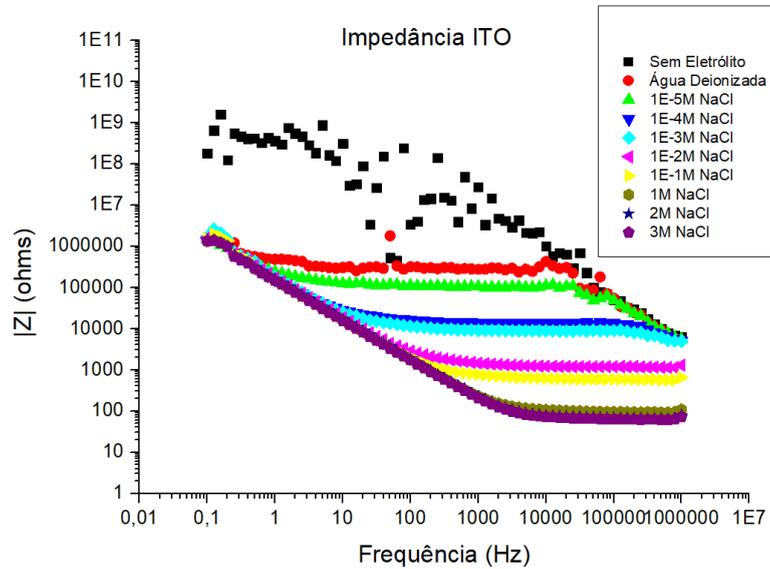
Figura 2 – Impedância do polímero puro



Fonte: Autores.

Porém, ao se analisar a mesma variação de concentração em um teste de impedância apenas com o substrato de vidro contendo ITO, este obteve uma resposta em três ordens de grandeza, logo sendo mais promissor que o próprio polímero. Este comportamento pode ser observado conforme a figura 3.

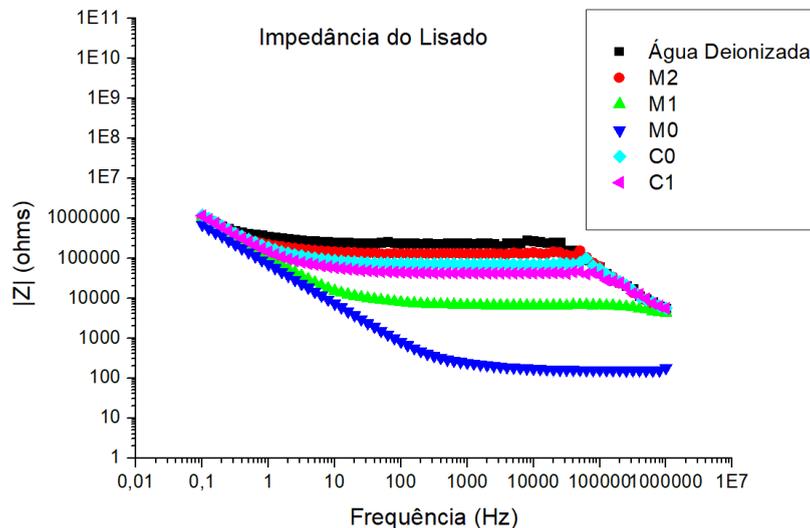
Figura 3 – Impedância do dispositivo de ITO



Fonte: Autores.

Em seguida, foram preparadas as amostras de *E. coli* em caldo LB. Essas amostras teriam naturalmente uma baixa impedância devido a alta concentração de íons do meio de cultura. Nesse sentido foi proposto o método de pré-tratamento das amostras com a troca dos fluidos por água deionizada, conforme pode ser observado na figura 4.

Figura 4 – Impedância das soluções lisadas



Fonte: Autores.

Na figura 4, pode ser comprovada a alta concentração de íons presentes no meio de cultura (M0). Nas trocas de solventes subsequentes (M1) e (M2) se observou uma queda de concentração que fez M2 se aproximar do perfil da água deionizada.

Já em relação a concentração de células, as não lisadas (C0) tiveram como esperado uma impedância maior do que a solução de células lisadas (C1), o que pode indicar que a lise celular liberou os íons intracelulares no meio líquido e aumentou

ligeiramente a concentração. Desse modo, a impedância das amostras lisadas pode vir a se tornar um forma promissora de estudo para a quantificação de células em regiões que um espectrofotômetro UV-Visível não seja capaz de distinguir.

CONCLUSÃO

Ao decorrer do presente trabalho, podemos concluir que ainda existem diversos desafios a serem solucionados para alcançar um sensor eficiente, de fácil manipulação e com significado físico elucidado. Para isso, nos futuros trabalhos, se faz necessário resolver problemas como a instabilidade do polímero, possivelmente usando uma técnica de blenda, bem como propor um método para correlacionar diretamente o número de UFC com a concentração de íons presente em soluções lisadas.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) pelo apoio concedido na forma da bolsa de iniciação científica, ao Instituto Nacional de Eletrônica Orgânica (INEO) e ao Laboratório Multiusuário Central Analítica (LABCA) pelo espaço e equipamentos cedidos. Esta oportunidade foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e profissional, permitindo-me mergulhar em projetos de pesquisa relevantes e desafiadores. A bolsa não apenas aliviou parte do ônus financeiro associado aos estudos, mas também me proporcionou uma valiosa experiência de aprendizado prático, interação com mentores experientes e acesso a recursos essenciais para minha pesquisa. Estou profundamente agradecido pelo investimento da UTFPR em meu desenvolvimento acadêmico e por contribuir para o avanço do conhecimento.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- VAN DER POL, Tom P. A. *et al.* The Mechanism of Dedoping PEDOT:PSS by Aliphatic Polyamines. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 123, p. 24328-24337, set. 2019.
- KEENE, Scot T. *et al.* Enhancement-Mode PEDOT:PSS Organic Electrochemical Transistors Using Molecular De-Doping. **Advanced Materials**, v. 32, p. 1-8, 2020.
- KIM, Nara *et al.* Electric Transport Properties in PEDOT Thin Films from: Conjugated Polymers, Properties, Processing, and Applications. **CRC Press**, cap. 3, p. 55-61, abr. 2019.